



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

“ESTUDIO DE LA ESPECIE *Anoda cristata* (L.) SCHLTDL. (MALVACEAE)  
COMO FUENTE POTENCIAL DE AGENTES ÚTILES PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS Y SUS COMPLICACIONES”

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. KRUTZKAYA JUÁREZ REYES

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MÉXICO, D. F., ABRIL DEL 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“ESTUDIO DE LA ESPECIE *Anoda cristata* (L.) SCHLTDL. (MALVACEAE)  
COMO FUENTE POTENCIAL DE AGENTES ÚTILES PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS Y SUS COMPLICACIONES”**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

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

**M. en C. KRUTZKAYA JUÁREZ REYES**

**DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**



México, D. F., Abril del 2016

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Ricardo Reyes Chilpa</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Francisco Hernández Luis</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. José Fausto Rivero Cruz</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra. Myrna Déciga Campos</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava</b>

### **Lugar donde se realizó la tesis:**

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

---

M. en C. Krutzkaya Juárez Reyes

**Sustentante**

---

Dra. Rachel Mata Essayag

**Tutora**

**PARTE DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO SE PRESENTARON**

**EN:**

- La 10a Reunión internacional de Investigación en Productos Naturales “Dr. Leovigildo Quijano”. Mayo de 2014, Mérida, Yucatán.
- American Society of Pharmacognosy [ASP] 2014 Annual Meeting. August de 2014, Oxford MS.
- QuimiUNAM 2015. Noviembre de 2011, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- American Society of Pharmacognosy [ASP] 2015 Annual Meeting. July de 2015, Copper Mountain, Colorado, U.S.A.

**PUBLICACIONES:**

Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology*, **161**, 36–45.

▪

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que mediante el Posgrado en Ciencias Químicas me ha permitido ampliar mi formación académica y profesional.

Al CONACyT por el apoyo otorgado para realizar mis estudios de doctorado mediante la beca con número 240011.

Al CONACyT y a DGAPA-UNAM por los apoyos otorgados para realizar este trabajo. Proyectos: DGAPA-UNAM (IN212913) y CONACyT 150906.

A la Dra. Rachel Mata, por el tiempo invertido en el desarrollo de este proyecto de tesis, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación y por todos los conocimientos que he adquirido durante estos años.

A los miembros del jurado asignado para la revisión de este proyecto de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A las Dras. Araceli Pérez e Isabel del Carmen Rivero de la Facultad de Química, por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis.

Al Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.

A la Q. Georgina Duarte Lisci de la Facultad de Química, por su valioso apoyo durante la realización de los análisis de CG-EM y la búsqueda realizada en la base de datos para determinar la composición del aceite esencial y de los compuestos volátiles de la planta.

■

A la M.V.Z. Lucía Macías Rosales y el M. en C. Héctor Ariel Rico Morales, Técnicos Académicos Asociados "C" T.C. adscritos a la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química, por su apoyo en lo referente a las técnicas de manejo animal.

■  
**ÍNDICE**

	<b>Página</b>
1. Resumen	1
1.1 Abstract	3
2. Antecedentes	5
2.1. <i>Anoda cristata</i>	5
2.1.1. Generalidades de la especie	5
2.1.2 Composición química	8
2.1.3 Estudios farmacológicos	8
2.2 Generalidades sobre diabetes y síndrome metabólico (SM)	8
2.2.1 Tratamiento de la diabetes	11
2.3 Eficacia, seguridad y control de calidad de las plantas medicinales	21
3. Planteamiento del problema y objetivos	25
3.1 Hipótesis	27
4. Estrategia metodológica	28
4.1. Material vegetal	28
4.2. Preparación de extractos	28
4.2.1. Extracto acuoso total (EAT)	28
4.2.2 Extracto acuosos libre de mucilago (EA-LM)	28
4.2.3. Obtención de la fracción orgánica de la infusión (EO-In)	29
4.3. Análisis cromatográficos	29
4.4. Aislamiento y caracterización de la diosmetina y acetina del EO-In	29
4.5. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	30
4.6. Establecimiento del perfil cromatográfico	30
4.7. Validación del método analítico	31



	<b>Página</b>
4.7.1 Selectividad	31
4.7.2. Linealidad del sistema	32
4.7.3. Linealidad del método y exactitud	32
4.7.4. Precisión del método	33
4.7.5. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	33
4.7.6. Estabilidad	33
4.7.7. Cuantificación de los compuestos 1 y 2 presentes en el EO-In de diferentes colectas de droga cruda de <i>A. cristata</i>	33
4.8. Establecimiento de la seguridad y eficacia preclínica	34
4.8.1. Determinación de la toxicidad aguda	34
4.8.2. Evaluación de la actividad antidiabética	35
4.8.2.1. Determinación de los niveles de glucosa sanguínea	35
4.8.2.2. Modelo de inducción de hiperglucemia en los animales de experimentación	35
4.8.2.3. Ensayo hipoglucemiante agudo	35
4.8.2.4. Tolerancia a glucosa oral (PTGO)	36
4.8.2.5. Tolerancia a sacarosa oral (PTSO)	36
4.8.2.6. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los compuestos acacetina y diosmetina	37
4.8.3. Determinación del mecanismo de acción del EA-LM y los compuestos acacetina y diosmetina	37
4.8.3.1. Tolerancia a la insulina de EA-LM	37
4.8.3.2. Bloqueo de canales de calcio (Ca <sup>2+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> )	37
4.8.4. Efecto del EA-LM en ratas con Síndrome metabólico (SM)	38

	<b>Página</b>
4.8.4.1. Inducción de síndrome metabólico en ratas SD	38
4.8.4.2. Tolerancia a la glucosa oral	39
4.8.4.3. Evaluación del extracto acuoso libre de mucilago	39
4.8.4.4. Obtención de muestras biológicas (sangre, hígado y grasa abdominal)	39
4.8.4.5. Evaluación de parámetros físicos y bioquímicos	40
4.8.5. Evaluación de la actividad antinociceptiva y antihiperalgésica del EA LM y los compuestos acacetina y diosmetina	40
4.8.5.1. Inducción de hiperglucemia	41
4.8.5.2. Modelo de la formalina	41
4.8.5.3. Preparación de muestras	41
4.8.5.4. Evaluación del mecanismo de acción antihiperalgésico	41
4.9. Evaluación de la actividad antioxidante del EA-LM <i>in vitro</i>	42
4.9.1. Ensayo de atrapamiento del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	42
4.9.2. Ensayo de atrapamiento del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )	43
4.9.3. Ensayo de atrapamiento del anión peroxinitrilo ( $ONOO^-$ )	43
4.9.4. Ensayo de atrapamiento de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	43
4.9.5. Ensayo de atrapamiento de singulete de oxígeno ( $^1O_2$ )	43
4.9.6. Ensayo de atrapamiento de ácido hipocloroso (HOCl)	44

	<b>Página</b>
4.9.7. Ensayo de atrapamiento del radical peroxilo (ROO·)	44
4.10. Análisis estadístico.	44
5. Resultados y discusión	45
5.1. Aislamiento y caracterización de la acacetina (1), la diosmetina (2) y la 5,3'5'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (3).	45
5.2. Establecimiento de pruebas de control de calidad para la droga cruda de <i>Anoda cristata</i>	48
5.2.1. Parámetros de identidad selectos	48
5.2.1.1. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	49
5.2.1.2. Establecimiento del perfil cromatográfico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a espectrometria de masas (CLUE-EM)	56
5.2.2. Validación de un método analítico (CLUE-EM) para cuantificar las flavonas diosmetina y acacetina en la droga cruda de <i>A. cristata</i>	58
5.2.2.1. Selectividad	58
5.2.2.2. Linealidad del sistema	59
5.2.2.3. Linealidad del método y exactitud	63
5.2.2.4. Precisión del método	67
5.2.2.5. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	69
5.2.2.6. Estabilidad	70
5.2.2.7. Cuantificación de los compuestos 1 y 2 presentes en el EO-In de diferentes colectas de droga cruda de <i>A. cristata</i>	71
5.3. Establecimiento de la seguridad y eficacia preclínica	72

■

	<b>Página</b>
5.3.1. Determinación de la toxicidad aguda	72
5.3.2. Evaluación de la actividad antidiabética	73
5.3.2.1. Ensayo hipoglucemiante agudo	73
5.3.2.2. Tolerancia a glucosa (PTGO)	75
5.3.2.3. Tolerancia a sacarosa (PTSO)	78
5.3.2.4. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los compuestos acacetina (1) y diosmetina (2)	81
5.3.3. Determinación del mecanismo de acción antidiabético del extracto acuoso libre de mucílago (EA-LM) y de acacetina (1) y diosmetina (2)	82
5.3.3.1. Prueba de tolerancia a la insulina	83
5.3.3.2. Bloqueo de canales de calcio (Ca <sup>2+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> )	84
5.3.4. Efecto del EA-LM en ratas con síndrome metabólico (SD)	86
5.3.5. Evaluación de la actividad antinociceptiva y antihiperalgésica del EA-LM y los compuestos acacetina (1) y diosmetina (2)	94
5.3.6. Evaluación del potencial antioxidante	102
6. Conclusiones	104
7. Bibliografía	106
8. Anexo I. Publicación. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant <i>Anoda cristata</i> .	121

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> A) partes aéreas, B) fruto y C) flores de <i>Anoda cristata</i>	5
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de <i>Anoda cristata</i> (Tomado de <a href="http://naisn.org/species/Anoda-cristata/">http://naisn.org/species/Anoda-cristata/</a> 11-sep-15 /18:00)	6
<b>Figura 3. Figura 3.</b> Principales complicaciones de la diabetes (Tomado y modificado de <a href="http://www.idf.org/node/23538">http://www.idf.org/node/23538</a> 23-sep-15)	12
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de la metformina. Tomado y modificado de Foretz <i>et al.</i> , 2014	14
<b>Figura 5.</b> Estructura de los compuestos aislados de la infusión de <i>A. cristata</i>	45
<b>Figura 6.</b> Cromatograma del aceite esencial de <i>Anoda cristata</i>	53
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de la coelución del EA-In y el compuesto acacetina (1)	57
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de la coelución del EA-In y el compuesto diosmetina (2)	57
<b>Figura 9.</b> Espectros de UV de la respuesta analítica observada para los compuestos A) acacetina y B) diosmetina	59
<b>Figura 10.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema de la acacetina (1)	62
<b>Figura 11.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema de la diosmetina (2)	62
<b>Figura 12.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método para el compuesto acacetina	65
<b>Figura 13.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método para el compuesto diosmetina	66
<b>Figura 14.</b> Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso total EAT de <i>A. cristata</i> en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ .	74

**Página**

- Figura 15.** Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso libre de mucilago EA-LM de *A. cristata* en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ . 74
- Figura 16.** Efecto hipoglucemiante agudo del mucilago M de *A. cristata* en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ . 75
- Figura 17.** Curva de tolerancia a la glucosa (PTGO) luego de la administración del extracto acuoso total (EAT) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ . 77
- Figura 18.** Curva de tolerancia a la glucosa (PTGO) luego de la administración del extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ . 78
- Figura 19.** Curva de tolerancia a la glucosa (PTGO) luego de la administración del mucilago (M) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ . 78

	<b>Página</b>
<b>Figura 20.</b> Curva de tolerancia a la sacarosa (PTSO) luego de la administración del extracto acuoso total (EAT) de <i>A. cristata</i> en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $*** p < 0.001$ .	79
<b>Figura 21.</b> Curva de tolerancia a la sacarosa (PTSO) luego de la administración del extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) de <i>A. cristata</i> en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $*** p < 0.001$ .	80
<b>Figura 22.</b> Curva de tolerancia a la sacarosa (PTSO) luego de la administración del mucilago (M) de <i>A. cristata</i> en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $*** p < 0.001$ .	80
<b>Figura 23.</b> Efecto hipoglucemiante agudo de los compuestos acacetina (1) y diosmetina (2) en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLL: glibenclamida 15 mg/Kg. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $*** p < 0.001$ .	82
<b>Figura 24.</b> Efecto del EA-LM sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos después de la administración de una carga de insulina. ABC: área bajo la curva, MTF: metformina 200 mg/kg. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $*** p < 0.001$ .	84

- Figura 25.** Efecto de la acetina (1) sobre los niveles de glucosa en sangre, previo tratamiento con A: DZX y B: NIF. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg, VEH: vehículo, NIF: nifedipino 13.6 mg/kg y DZX: diazóxido 2 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ , respecto al grupo VEH+GLI. 85
- Figura 26.** Efecto de la diosmetina (2) sobre los niveles de glucosa en sangre, previo tratamiento con A: DZX y B: NIF. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg, VEH: vehículo, NIF: nifedipino 13.6 mg/kg, y DZX: diazóxido 2 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ , respecto al grupo VEH+GLI. 86
- Figura 27.** Efecto del EA-LM sobre el peso de ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ , respecto al control de fructosa (FRU). 88
- Figura 28.** Efecto del EA-LM sobre la cantidad de grasa abdominal de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 88
- Figura 29.** Efecto del EA-LM sobre índice de Lee (I Lee) de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 89



	<b>Página</b>
<p><b>Figura 30.</b> Efecto del EA-LM sobre la concentración de glucosa en suero de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio <math>\pm</math> EEM para los animales de cada grupo (<math>n=6</math>). <math>*p &lt; 0.05</math>, <math>**p &lt; 0.01</math> y <math>*** p &lt; 0.001</math>.</p>	90
<p><b>Figura 31.</b> Efecto del EA-LM sobre la cantidad de triglicéridos en suero de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio <math>\pm</math> EEM para los animales de cada grupo (<math>n=6</math>). <math>*p &lt; 0.05</math>, <math>**p &lt; 0.01</math> y <math>*** p &lt; 0.001</math>.</p>	90
<p><b>Figura 32.</b> Efecto del EA-LM sobre los niveles de ácido úrico de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio <math>\pm</math> EEM para los animales de cada grupo (<math>n=6</math>). <math>*p &lt; 0.05</math>, <math>**p &lt; 0.01</math> y <math>*** p &lt; 0.001</math>.</p>	91
<p><b>Figura 33.</b> Efecto del EA-LM sobre los niveles de insulina de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio <math>\pm</math> EEM para los animales de cada grupo (<math>n=6</math>). <math>*p &lt; 0.05</math>, <math>**p &lt; 0.01</math> y <math>*** p &lt; 0.001</math>.</p>	91
<p><b>Figura 34.</b> Efecto del EA-LM sobre los valores de colesterol de ratas con SM. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio <math>\pm</math> EEM para los animales de cada grupo (<math>n=6</math>). <math>*p &lt; 0.05</math>, <math>**p &lt; 0.01</math> y <math>*** p &lt; 0.001</math>.</p>	92

- Figura 35.** Efecto del EA-LM sobre los valores de glucógeno de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 92
- Figura 36.** Efecto del EA-LM en una PTGO de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 93
- Figura 37.** Efecto nociceptivo e hiperalgésico debido a la administración de formalina al 2% en animales normoglucémicos y al 1% en roedores hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 94
- Figura 38.** Efecto antinociceptivo del EA-LM en animales normoglucémicos después de la administración de formalina al 2%. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 95
- Figura 39.** Efecto antihiperalgésico del EA-LM en animales hiperglucémicos después de la administración de formalina al 1%. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 96
- Figura 40.** Efecto antihiperalgésico del compuesto acetina en animales hiperglucémicos después de la administración de formalina al 1% A. Fase 1, B. Fase 2. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $*** p < 0.001$ . 97

	<b>Página</b>
<b>Figura 41.</b> Efecto antihiperalgésico del compuesto diosmetina en animales hiperglucémicos después de la administración de formalina al 1% A. Fase 1, B. Fase 2.. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ .	98
<b>Figura 42.</b> Determinación mecanismo de acción antihiperalgésico del compuesto acacetina (1). A. Compuestos que no producen pérdida del efecto de 1. B. Compuestos que inhiben la actividad del compuesto 1. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ .	100
<b>Figura 43.</b> Determinación mecanismo de acción antihiperalgésico del compuesto diosmetina (2). A. Compuestos que no producen pérdida del efecto de 2. B. Compuestos que inhiben la actividad del compuesto 2. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ .	101
<b>Figura 44.</b> Actividad inhibitoria del radical peroxílo, debida el EA-LM. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM de tres réplicas de cada grupo ( $n=3$ ).	103

## II. ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico	9
<b>Tabla 2.</b> Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE-MS para el establecimiento del perfil cromatográfico de <i>A. cristata</i>	31
<b>Tabla 3.</b> Datos de RMN del compuesto Acacetina	46
<b>Tabla 4.</b> Datos de los espectros de RMN de la Diosmetina	47
<b>Tabla 5.</b> Datos de los compuestos <b>1-3</b>	47
<b>Tabla 6.</b> Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de <i>A. cristata</i> obtenido por hidrodestilación	50
<b>Tabla 7.</b> Resultados experimentales de la curva de calibración de los compuestos <b>1 y 2</b>	60
<b>Tabla 8.</b> Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema	63
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la linealidad del método de acacetina: cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel	64
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la linealidad del método de diosmetina: cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel	65
<b>Tabla 11.</b> Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método	67
<b>Tabla 12.</b> Resultados experimentales de repetibilidad	68
<b>Tabla 13.</b> Resultados experimentales de precisión intermedia	69
<b>Tabla 14.</b> Determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	70
<b>Tabla 15.</b> Estabilidad de los estándares bajo diferentes condiciones	70
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación de los metabolitos presentes en muestras de <i>A. cristata</i>	71

♦  
**III. ÍNDICE DE CUADROS**

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Fármacos utilizados en el tratamiento de diabetes	17
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de <i>A. cristata</i> obtenido por hidrodestilación	54

♦  
**IV. LISTA DE ABREVIATURAS**

°C	Grados Celsius
5-HT	5-Hidroxitriptamina
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido fórmico
AHPA	American Herbal Products Association (Asociación Americana de Productos a Base de Plantas)
ANADEVA	Análisis de varianza
CC	Cromatografía en columna
CCA	Cromatografía en columna abierta
CG	Cromatografía de gases
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de variación

dL	decilitro
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Enzima Dipeptidil Peptidasa-4
DZX	Diazóxido
EAT	Extracto acuoso total
EA-LM	Extracto acuoso libre de mucilago
EEM	Error estándar de la media
EO-In	Extracto organico de la infusión
EtOH	Etanol
eV	Electronvolts
FBPasa	fructosa-1,6-bifosfatasa
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
FLU	Flumazenil
FM	Fórmula Molecular.
FRU	Fructosa
g	Gramos
G	Gravedades
G <sub>f</sub>	Glucemia al tiempo n
GABA	Ácido gaba amino butírico
G <sub>i</sub>	Glucemia al tiempo cero
GIP	Polipéptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa
GLI	Glibenclamida
GLP-1	Péptido 1 Análogo de Glucagón

GLUT2	Transportador 2 de glucosa
h	horas
H <sub>2</sub> O	Agua
I Lee	Índice de Lee
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
ICDRA	Conferencia Internacional sobre Autoridades Reguladoras de Medicamentos
IDF	Federación Internacional de Diabetes
INS	Insulina
IR	Índice de retención
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
KET	Ketanserina
kg	Kilogramo
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
L-NAME	Metil ester de <i>N</i> <sub>ω</sub> -Nitro-L-arginina
MeOH	Metanol
M	Mucilago
m	Metros
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercurio
mmol	Milimol



MTF	Metformina
<i>n</i>	Número de animales
NA	Nicotinamida
NIF	Nifedipino
NLX	Naloxona
nm	Nanometros
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PPAR $\gamma$	Receptor nuclear activado por el factor proliferador de peroxisomas
ppm	Partes por millón
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
PTSO	Prueba de tolerancia a la sacarosa oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p.o.</i>	Administración oral
seg	segundos
SGLT	Transportador de glucosa dependiente de sodio
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta

## 1. RESUMEN

*Anoda cristata* (L) Schlttdl (Malvaceae) es una de las especies de quelites más representativas del país; se le conoce con diferentes nombres comunes como “alache”, “quelite de violeta”, “malva”, “amapola de campo”, entre otros. El consumo como alimento incluye las hojas tiernas y brotes, los cuales se cocinan solos o en combinación con chayotes, frijoles y maíz. Esta especie es utilizada también para el tratamiento de diversas afecciones entre las que se puede mencionar distintos problemas estomacales, respiratorios, aftas bucales, dolores renales y la diabetes.

Con base en estas consideraciones el presente proyecto se realizó con el propósito de establecer las pruebas de calidad (identidad química y composición), inocuidad y la eficacia preclínica como agente antidiabético de la planta. Todo ello con el fin de garantizar su uso racional.

En relación a las pruebas de identidad química, se analizó el aceite esencial, obtenido de las partes aéreas por hidrodestilación, utilizando la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. De esta forma se identificaron 70 metabolitos secundarios que representan aproximadamente el 99% de la composición de la esencia. Entre los mayoritarios se encuentran: terpinen-4-ilo (**19**),  $\beta$ ,4-dimetil-3-ciclohexen-1-etanol (**33**), timol (**34**), (*E,Z*)-2,4-decadienal (**35**), 1-metoxi-4-metil-[2.2.2]bicyclooctano (**36**), (*E,E*)-2,4-decadienal (**38**), *cis*-2,3-dihidro-1*H*-indene-1,2-diol (**46**), 4-(2,6,6-trimetilciclohexa-1,3-dienil)-3-buten-2-ona (**47**), metil *n*-hexadecenil cetona (**67**), dietilmalonoato de 2-etilfenil pentilo (**71**). Algunos de estos compuestos presentan efectos biológicos que podrían contribuir a las propiedades benéficas de la especie.

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de las flavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**). El método fue selectivo, lineal, exacto y preciso. La aplicación del método permitió determinar la concentración de las dos flavonas en diferentes muestras de *A. cristata*.

La prueba de toxicidad de Lorke permitió comprobar que el extracto acuoso total (EAT), el mucilago (M) y el extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) son

inocuos para roedores ya que presentaron una  $DL_{50}$  mayor a 5000 mg/kg. En ningún caso se observó daño macroscópico en órganos.

En los ensayos para determinar el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico mediante las pruebas hipoglucemiante aguda, de tolerancia a la glucosa (PTGO) y a la sacarosa (PTSO) oral los extractos EAT, M y EA-LM, a diferentes dosis (31.6-316 mg/kg), se demostró que presentan efectos hipoglucemiantes y antihiper glucémicos. Estos efectos se deben a diferentes mecanismos como son: incremento del transporte de glucosa (transportador de glucosa dependiente de sodio, SGLT o el transportador GLUT2), la promoción de la liberación de insulina, a un mecanismo mecánico de atrapamiento por parte del mucilago que impide la absorción de glucosa por el intestino y a la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Los compuestos acetina (**1**) y diosmetina (**2**) producen un importante efecto hipoglucemiante a las dosis de (3-31.6 mg/kg), su mecanismo de acción es el bloqueo de los canales  $K^+_{ATP}/SUR1/Kir6.2$  y a la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  en la célula  $\beta$ -pancreática.

El EA-LM presenta una actividad importante en una serie de parámetros bioquímicos usualmente alterados en ratas que padecen síndrome metabólico (SM) inducido por fructosa; de tal forma que, el tratamiento con el EA-LM, a las dosis de 100 y 316 mg/kg, provocó una disminución de la grasa abdominal, el índice de Lee, los niveles de glucosa, triglicéridos y ácido úrico en suero. También se observó un aumento en los niveles de insulina. El extracto disminuye significativamente del pico postprandial de animales con síndrome metabólico durante una PTGO.

En lo referente a la actividad antinociceptiva y antihiperalgésica el EA-LM (10-100  $\mu$ g/pata) presenta un efecto dependiente de la concentración; la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) fue de 66.21  $\mu$ g/pata como antinociceptivo y 97.21  $\mu$ g/pata como antihiperalgésico; los compuestos **1** y **2**, también fueron activos. La acetina (**1**) actúa activando receptores GABA y como agonista de receptores opioides; la diosmetina (**2**) es un agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>. En este caso no se podría descartar que el compuesto **2** también actúe sobre algún otro receptor serotoninérgico.

Finalmente, se comprobó el potencial antioxidante el EA-LM como atrapador del radical peróxilo ( $ROO\cdot$ ), el extracto presentó una  $CI_{50}=3.72\pm 0.06$   $\mu$ g/mL.

## 1.1 ABSTRACT

*Anoda cristata* (L) Schltdl (Malvaceae) commonly known as "alache", "mallow", and "poppy field", is consumed as food, and medicinally for the treatment of stomach and respiratory problems, mouth sores, kidney pains and diabetes.

This work was undertaken to establish the quality control tests as well as preclinical efficacy and toxicity tests.

Thus, as part of the identity tests, the essential oil obtained from the aerial parts; by hydrodistillation was analyzed by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry. Seventy one secondary metabolites, representing approximately 99% of the essence, were characterized.

An analytical method to quantify acacetin (**1**) and diosmetin (**2**) was developed and validated. The method was selective, linear, accurate and precise. The method was successfully applied to determine the concentration of these flavones in different collections of *A. cristata*.

Lorke's acute toxicity test of the total aqueous extract (EAT), mucilage (M) and free mucilage aqueous extract (EA-LM) revealed that they were safe for rodents. The LD<sub>50</sub> was higher than 5000 mg/kg in all cases.

EAT, M and EA-LM showed hypoglycemic and antihyperalgesic effects at different doses (31.6-316 mg/kg), both in normoglycemic and hyperglycemic animals. These effects can be attributed to different mechanisms of action. Compounds **1** and **2** produces a significant hypoglycemic effect at doses in the range between 3 and 31.6 mg/kg; its mode of action involved blocking of the K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>/SUR1/Kir6.2 channels and opening the of Ca<sup>2+</sup> channels in the β-cell.

EA-LM at doses of 100 and 316 mg/kg had a significant activity in rats with metabolic syndrome (MS) decreasing abdominal fat, Lee index as well as blood glucose, triglycerides and uric acid levels. On the other hand, the treatments increased insulin levels.

EA-LM (10-100 µg/paw) showed antinociceptive and antihyperalgesic effect in mice; the medium effective concentrations (EC<sub>50</sub>) were 66.21 and 97.21 µg/paw, respectively. The effects were related with the presence of compounds **1** and **2**.

Acacetin (**1**) activated GABA receptors and behaved as an opioid agonist; diosmetin (**2**) was an agonist of 5-HT<sub>2A</sub> receptor.

Finally, EA-LM behaved as peroxy radical (ROO•) trapped, its IC<sub>50</sub> was 3.72 ± 0.06 µg/mL.

Overall the information generated through this research can support the beneficial potential of the species *Anoda cristata*, for the treatment of diabetes and related problems.

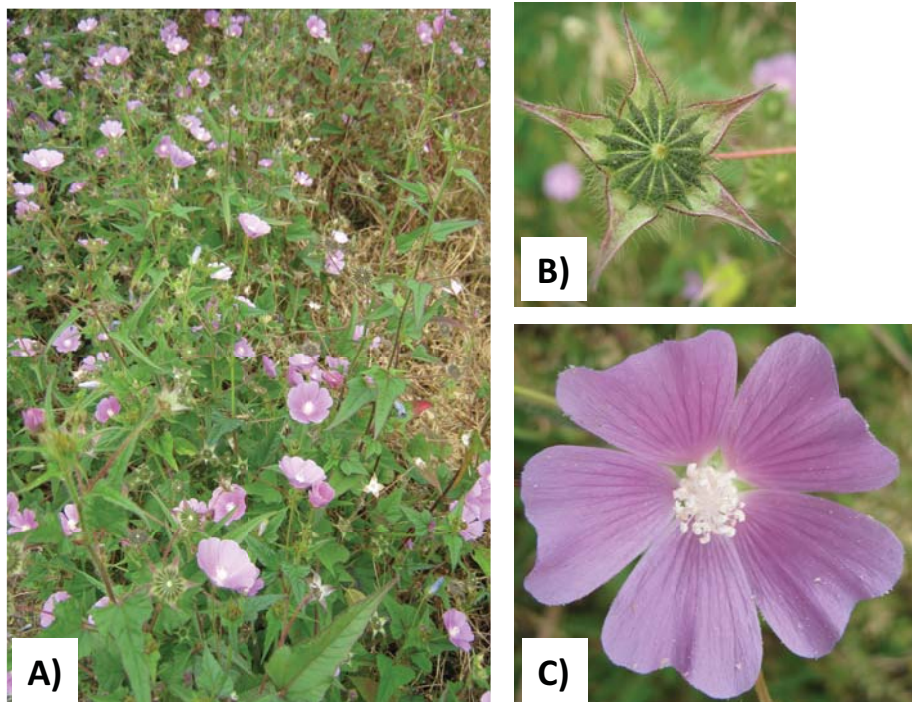
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Anoda cristata*

#### 2.1.1. Generalidades de la especie

El género *Anoda* de la familia (Malvaceae) se encuentra ampliamente distribuido en México; a la fecha se han descrito 23 especies, de las cuales 17 son endémicas del país. Las plantas son hierbas pequeñas con alta variabilidad en la forma y tamaño de las hojas; sus flores son variables en medida y color y sus frutos son esquizocarpos en forma de disco. Las especies crecen en zonas perturbadas de distintos tipos de vegetación, principalmente en selva baja caducifolia y bosques de pino encino (Contreras-Díaz & Cruz-Duran, 2014).

*Anoda cristata* (L) Schlttdl es una hierba de hasta 1 m de alto. Presenta hojas de formas variables; sus flores son pedúnculos largos, axilares, con cáliz de 5 a 10 mm de longitud, de colores lila o morado, los pétalos miden de 8 a 26 mm; el fruto es pubescente de 8 a 15 mm de diámetro (**Figura 1**) (Rendón *et al.*, 2001).

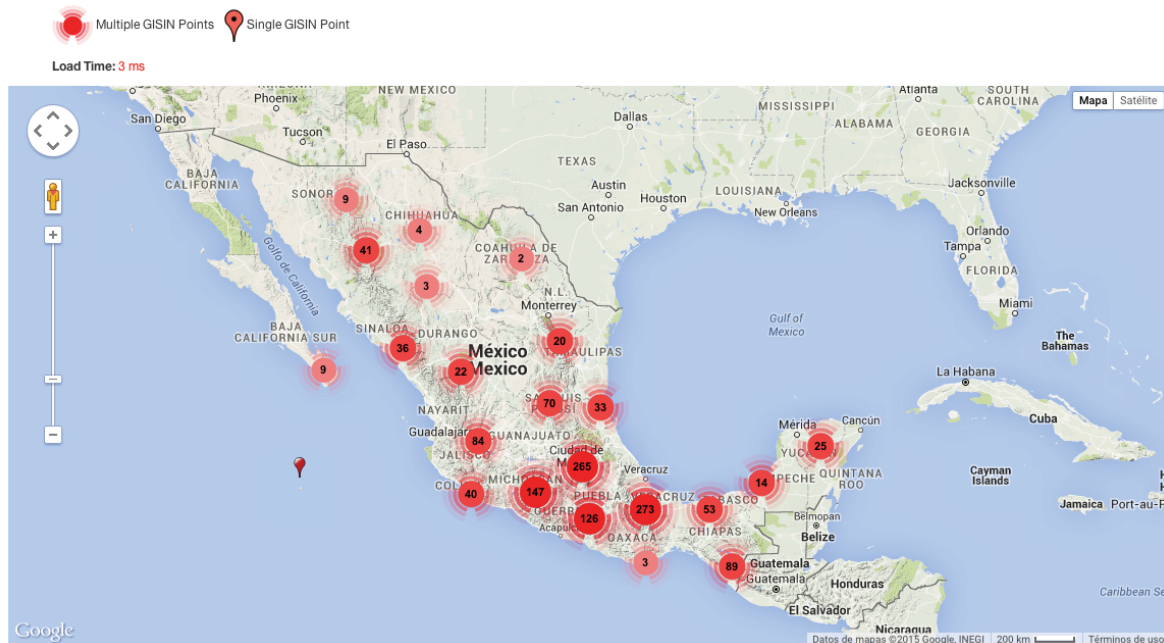


**Figura 1.** A) partes aéreas, B) fruto y C) flores de *Anoda cristata*

*Anoda cristata* se puede encontrar en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, su desarrollo se da entre el nivel del mar hasta 2600 m de altura. Crece en terrenos de cultivo abandonados, a orillas de caminos, arroyos y ríos; se asocia a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino. En México es abundante (**Figura 2**), y se ha reportado su presencia en casi todos los estados, principalmente en Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Villaseñor & Espinosa, 1998; Rendón *et al.*, 2001).

#### Distribution

GISIN Records: 1369



**Figura 2.** Distribución geográfica de *Anoda cristata*

(Tomado de <http://naisn.org/species/Anoda-cristata/> 11-sep-15 /18:00)

*Anoda cristata* se considera una maleza ya que afecta varios cultivos, principalmente los de algodón; aunque también es encontrada frecuentemente en los



cultivos de maíz, alfalfa, ajo, arroz, avena, cacahuete, cebada, cártamos, cebolla, chile, frijol, garbanzo, girasol, jitomate, lenteja y linaza (Villaseñor & Espinosa, 1998).

La planta se conoce comúnmente como alache, pero recibe otros nombres como son quelite de violeta, malva, amapola de campo, flor decampante, genciana, hierba mora, malvavisco, malvón de campo, quesitos, requesón, violeta de campo, violeta de monte, malva cimarrona, panelita, amapolita azul, malva abrisca, malvilla, botón, alachi, altea, alushi, bimalva, campanita, hierba del ojo, malva de castilla, momol, pie de gallo, rehue y tulipancillo (Rendón *et al.*, 2001).

En lo referente a sus usos medicinales, la infusión de las partes aéreas de alache se emplea para reducir la inflamación estomacal. El cocimiento de la raíz es utilizado en Guanajuato, Michoacán y Oaxaca para dolor de estómago. En Guerrero se usa para la indigestión y el tratamiento de aftas bucales (Rendón *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 1998).

En el estado de Puebla las partes aéreas se ingieren o se usan como fomentos, en combinación con sauco (*Sambucus mexicana*), hierba dulce (*Phylla scaberrima*), mano de gato (*Geranium seemannii*), hierba del golpe (*Oenothera rosea*), tomate (*Physalis aequata*), lima (*Citrus aurantifolia*), escoba (*Sida rhombifolia*), espino (*Sechium edule*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), entre otras, para el tratamiento de la bilis (Rendón *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 1998).

La especie se recomienda también para tratar algunos problemas respiratorios. Así, en caso de tos se ingiere el cocimiento de las flores secas, y para la tosferina el de las hojas; para los problemas respiratorios se mezcla con gordolobo, bugambilia, tejocote y canela (Rendón *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 1998).

El cataplasma de las hojas se utiliza para tratar contusiones, heridas y llagas; también es usada el agua de cocción aplicada en forma local para detener la caída del cabello o hacerlo crecer. Finalmente, el alache se usa contra la fiebre, hemorroides, el dolor de riñones y la diabetes (Rendón *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 1998).

*Anoda cristata* es una de las especies de quelites representativas del país. Las hojas tiernas y brotes se consumen, solos o en combinación con chayotes, frijoles y maíz (Rendón *et al.*, 2001; Linares & Bye, 2015). Estudios relacionados con su valor nutricional refieren su alto contenido de proteínas (4.1% de peso fresco), y



polisacáridos (6.43%) (Bautista-Cruz *et al.*, 2011). También está reportado su uso como forraje.

### **2.1.2 Composición química**

Desde el punto de vista fitoquímico *A. cristata* ha recibido poca atención, de tal manera que Echevarria-Machado y colaboradores (2005) reportaron la presencia de mucilagos en la especie, una característica que comparte con otras especies de la familia (Milin *et al.*, 2003; Bautista-Cruz *et al.*, 2011).

Los estudios sobre otras especies de malváceas indican que es frecuente la presencia de mucilagos, eicosanoides, flavonoides, cumarinas y otros compuestos aromáticos (Darwish & Reinecke, 2003; Veshkurova *et al.*, 2006; Cutillo *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2012).

### **2.1.3 Estudios farmacológicos**

En un estudio preliminar al presente trabajo se estableció que un extracto orgánico de *A. cristata* provocaba una disminución en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos; también se demostraron sus propiedades hipoglucemiantes en ratas hiperglucémicas durante un experimento subcrónico de catorce días (Brindis, 2011).

## **2.2 Generalidades sobre diabetes y síndrome metabólico (SM)**

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2006), el síndrome metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones que aumentan el riesgo de ataques cardíacos: prediabetes, obesidad, colesterol alto e hipertensión cardiovasculares (**Tabla 1**) (IDF, 2006). Se estima que del 20 al 25 % de la población mundial padece síndrome metabólico, lo que aumenta al doble sus posibilidades de muerte prematura y al triple la de padecer un ataque cardíaco. Las personas con éste síndrome tienen también cinco veces más la posibilidad de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, para que una persona sea diagnosticada con síndrome metabólico debe presentar obesidad central (definida

como la circunferencia de la cintura con valores específicos de acuerdo a la etnia) y más de dos de los factores que se describen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.-** Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico (Tomado de IDF, 2006)

Factor	Valores
Triglicéridos elevados	$\geq 150$ mg/dL (1.7 mmol/L) o tratamiento para esta anormalidad lipídica
Bajos niveles de colesterol HDL	$< 40$ mg/dL (1.03 mmol/L) en hombres $< 50$ mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres o tratamiento para esta anormalidad lipídica
Hipertensión	Presión sistólica $\geq 130$ o presión diastólica $\geq 85$ mm Hg o tratamiento para hipertensión
Niveles altos de glucosa plasmática en ayuno	(FPG) $\geq 100$ mg/dL (5.6 mmol/L) o diabetes tipo 2 diagnosticada

La diabetes es uno de los desórdenes metabólicos más comunes; se caracteriza por un estado de hiperglucemia crónico, consecuencia de defectos en la secreción de insulina y/o en la acción de esta hormona (Guariguata *et al.*, 2014). La enfermedad es en la actualidad una epidemia a nivel global, con alrededor de 415 millones de personas afectadas. La incidencia de la enfermedad ha incrementado rápidamente en los últimos años, y se estima que para el año 2040 el número de personas afectadas sea de 642 millones (IDF, 2015). De acuerdo con las diferentes autoridades sanitarias del mundo la enfermedad es la principal causa de problemas cardiovasculares, ceguera, amputaciones no traumáticas y fallo renal. Ésta problemática implica una demanda económica importante por parte del sector salud para el tratamiento de la enfermedad y sus diversas complicaciones. Según los reportes de la IDF, México ocupa el sexto lugar en número de enfermos a nivel mundial; las organizaciones nacionales

revelan que más de 6.9 millones de personas padecen diabetes y 6 millones más aún no están diagnosticados (INEGI, 2013).

Existen tres tipos principales de diabetes: diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y diabetes gestacional.

La DMT1 es resultado de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas debida a la respuesta inflamatoria mediada por las células T (insulinitis) así como a una respuesta humoral (células B); esto lleva a una deficiencia en la producción de insulina. Puede afectar a personas de cualquier edad, pero se presenta predominantemente en niños o adultos jóvenes; las personas con este padecimiento requieren la administración diaria de insulina para mantener sus niveles de glucosa (IDF, 2013).

Los síntomas clásicos de un paciente diabético incluyen la polifagia debido al incremento del desdoblamiento de las proteínas de los músculos para la gluconeogénesis; este aumento de consumo calórico causa aumento de la glucosa sanguínea que el organismo excreta vía urinaria (glucosuria); a su vez, este desbalance osmótico en la orina provoca poliuria. Este incremento en la diuresis también induce cambios en el organismo, ya que la pérdida de líquidos y la hiperglucemia incrementan la osmolaridad del plasma incitando a que el organismo ingiera mayor cantidad de agua (polidipsia). Otros síntomas incluyen, la pérdida de peso, cicatrización lenta, infecciones recurrentes y visión borrosa (IDF, 2013; Kharroubi & Darwish, 2015). La DMT1 constituye del 5 al 10% de los casos de diabetes.

La DMT2 se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas, debido a las deficiencias en la secreción y/o acción de la insulina; el tipo 2 es el predominante con aproximadamente el 90 % de casos reportados. Existen diversos factores que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad, entre los que podemos mencionar la edad, obesidad, falta de actividad física, una mala alimentación, antecedentes familiares, etnia; así como factores genéticos (Rodríguez-Saldaña & Mejía-Pedraza, 2006; Kharroubi & Darwish, 2015; IDF, 2013). En este tipo de diabetes el cuerpo produce insulina, sin embargo la cantidad de la misma puede resultar insuficiente; o los órganos blanco no responden

correctamente a su acción. Es importante destacar que este tipo de diabetes tiende a no ser detectada durante largos periodos de tiempo debido a que los estados de hiperglucemia tempranos no producen los síntomas clásicos de la diabetes. Los pacientes no diagnosticados o que no están bajo tratamiento médico tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares, debidas al daño en arterias (problemas cardiovasculares y cerebrovasculares) y microvasculares, por el daño en vasos sanguíneos (retinopatías, nefropatías y neuropatías). También se ha relacionado a la diabetes con depresión, demencia y disfunción sexual (**Figura 3**) (Rodríguez-Saldaña & Mejía-Pedraza, 2006; Kharroubi & Darwish, 2015).

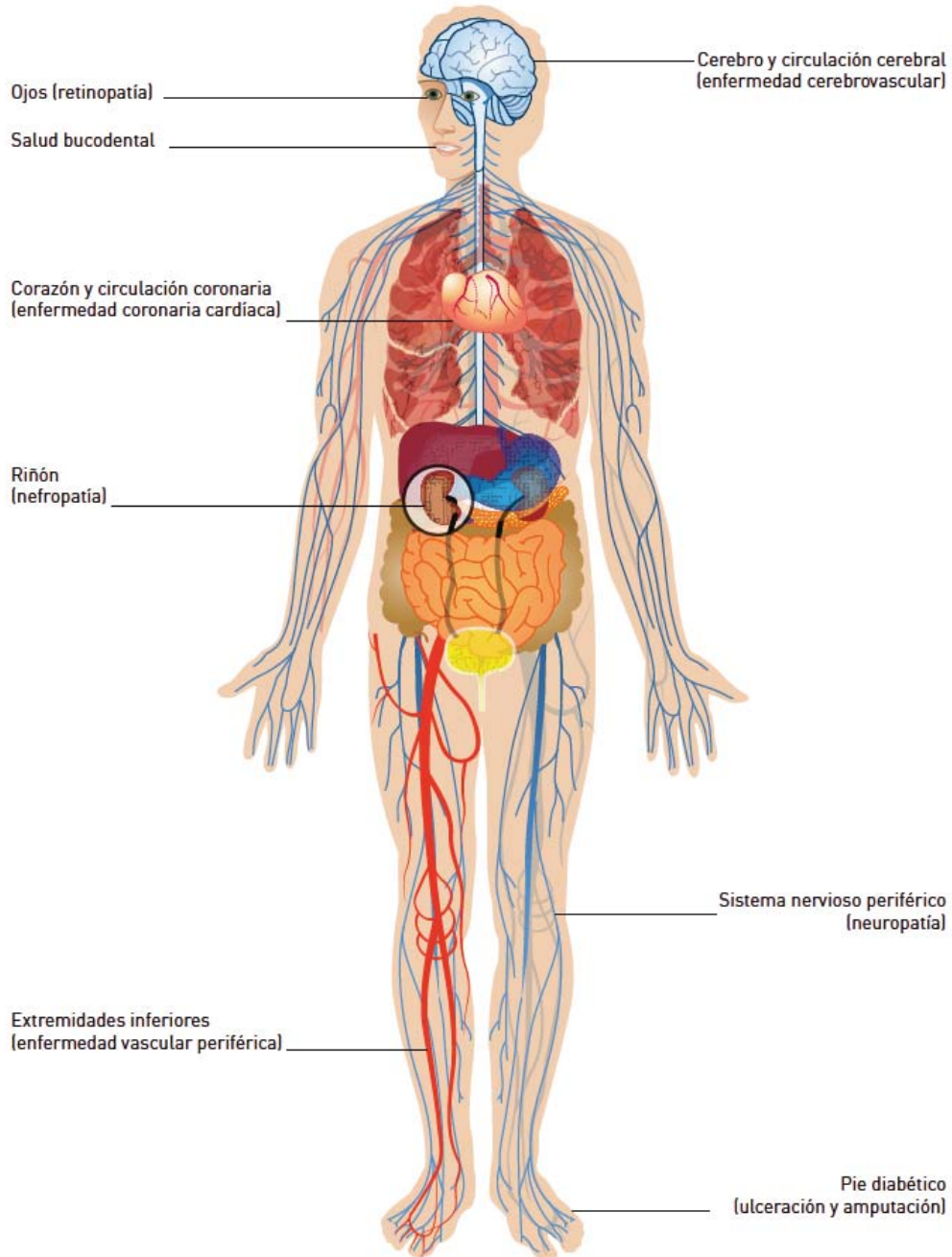
Los problemas cardiovasculares causan la muerte de la mitad de los pacientes diabéticos; los desórdenes vasculares más comunes son aterosclerosis, infarto al miocardio, así como alteraciones de la función cardiaca. La nefropatía diabética se caracteriza por el desarrollo de proteinuria que subsecuentemente produce una disminución en la velocidad de filtración glomerular. Los problemas renales son un factor que aumenta el riesgo de complicaciones macrovasculares (Marks & Raskin, 2000).

La retinopatía conlleva a la pérdida de la visión; esta complicación se caracteriza por lesiones en la retina, que incluye cambios de la permeabilidad vascular, microaneurismas, degeneración capilar y neovascularización (Forbes & Cooper, 2013).

Finalmente, las neuropatías diabéticas, que son desarrolladas por al menos el 50% de los enfermos de diabetes, aumentan la posibilidad de amputación de extremidades. El deterioro de las fibras nerviosas altera la sensibilidad a las vibraciones y a los umbrales térmicos, llevando a la pérdida de percepción sensorial. Los pacientes diabéticos pueden también sufrir hiperalgesia (respuesta aumentada ante un estímulo doloroso), parestesia y alodinia (Forbes & Cooper, 2013).

### **2.2.1 Tratamiento de la diabetes**

El tratamiento de la diabetes presenta dos principales vertientes, la farmacológica y las opciones no farmacológicas.



**Figura 3.** Principales complicaciones de la diabetes (Tomado y modificado de <http://www.idf.org/node/23538> 23-sep-15)

El tratamiento no farmacológico consiste en un cambio del estilo de vida, aumentando la actividad física y reduciendo el consumo calórico; los beneficios de estas acciones a corto plazo implican la activación de mecanismos celulares que

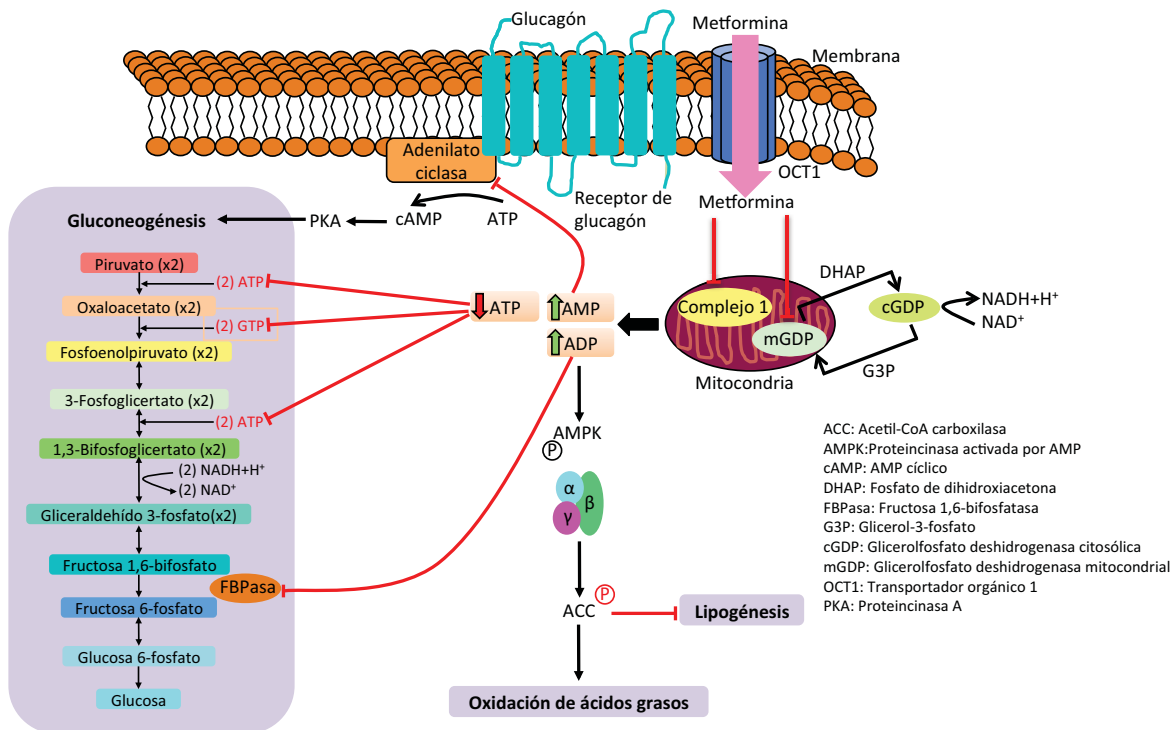
protegen al organismo, disminuyendo la generación de radicales libres, mejorando la función mitocondrial y mejorando la respuesta de los órganos a la insulina; asimismo se puede observar una disminución de la presión sanguínea, de las concentraciones de glucosa y lípidos en sangre y de la concentración de grasa hepática cuando hay una disminución de peso debida al cambio de estilo de vida (Divins, 2009; Carver & Abrahamson, 2009).

No obstante las medidas señaladas en el párrafo anterior pueden resultar insuficientes en algunos casos, por lo que es importante la administración conjunta de la terapia farmacológica. Este tipo de tratamiento tiene como principales objetivos la prevención y/o mejora de las diversas complicaciones observadas en pacientes diabéticos, evitar la ganancia de peso y la hipoglucemia. La adherencia al tratamiento es fundamental para la eficacia del mismo.

Los diferentes fármacos existentes para el tratamiento de diabetes tienen diferentes blancos de acción; algunos incrementan los niveles de insulina, mediante su administración o por efecto de agentes que estimulan su secreción (secretagogos). Otros mejoran la sensibilidad de los tejidos a la insulina, o reducen la absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal (Israili, 2011). En la **Cuadro 1** se enlistan los principales fármacos y se incluyen sus estructuras y mecanismo de acción.

La metformina, una biguanida, es el fármaco de elección para el tratamiento de la DMT2. Su mecanismo de acción consiste en reducir la producción de glucosa hepática y aumentar la sensibilidad de los diferentes tejidos a la acción de la insulina. Uno de los principales efectos de este fármaco es la reducción de la gluconeogénesis debido al déficit de ATP causado por la inhibición parcial del complejo 1 de la cadena respiratoria en la mitocondria, en consecuencia los niveles de AMP y ADP incrementan y la actividad de la enzima FBPasa (fructosa-1,6-bifosfatasa) disminuye. Esta última enzima cataliza la transformación de fructosa 1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato, precursor de la glucosa en el proceso de gluconeogénesis. La metformina también ejerce un efecto sensibilizador de insulina mediante la supresión de la síntesis de lípidos ocasionada por la fosforilación del AMPK (**Figura 4**) (Foretz *et al.*, 2014; Madiraju *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2014). Este tipo de fármacos tienen bajo riesgo de producir hipoglucemia ya que no estimulan la producción de insulina y no causan

aumento de peso; puede provocar acidosis láctica y no se recomienda en pacientes con fallo renal (Freeland & Farber, 2015).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de la metformina. Tomado y modificado de Foretz *et al.*, 2014

Las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina y representan los agentes orales más antiguos utilizados para el tratamiento de la DMT2; su efecto hipoglucemiante fue descubierto por Janbon en 1942. La primera generación de estos fármacos incluyó a la carbutamida, fármaco sintético que se retiró del mercado por sus efectos adversos. La segunda generación, de amplio uso actual, incluye a la gliclazida, la glimepirida, la glipizida y la glibenclamida. Estos fármacos tienen la desventaja de que provocan hipoglucemia y efectos a nivel cardiovascular. A largo plazo estos fármacos pierden su efecto debido a la disminución progresiva de la producción pancreática de insulina (Israili, 2011).

El mecanismo de acción de las sulfonilureas implica la unión a un receptor específico (SUR) en las células  $\beta$  pancreáticas que bloquea el flujo de potasio ( $K^+$ ) a través del canal dependiente de ATP; la disminución de  $K^+$  causa una despolarización de la membrana, abriendo los canales de calcio, lo que ocasiona el incremento de  $Ca^{2+}$



dentro de la célula  $\beta$  y la consiguiente liberación (exocitosis) de insulina (Sola *et al.*, 2015).

Otro tipo de secretagogos son las glinidas (nateglinida y repaglinida). Estos compuestos estimulan la secreción de insulina, por un mecanismo similar al de las sulfonilureas, la diferencia radica en su sitio de unión (Kir6.2/SUR1). Su acción es rápida y de corta duración, por lo que se reduce el riesgo de hipoglucemia (Winkler *et al.*, 2007; Israili, 2011).

Las tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona) tienen diferentes efectos sobre las células  $\beta$ . Actúan como sensibilizadores de insulina uniéndose selectivamente al receptor nuclear activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ); este receptor forma heterodímeros con el receptor retinoide X (RXR), estimulando o reprimiendo la transcripción genética; el receptor PPAR $\gamma$  se expresa en tejido adiposo, macrófagos y osteoblastos. En las células pancreáticas la activación de PPAR $\gamma$  por las tiazolidinedionas resulta en la expresión de varios genes, incluidos los que codifican para los transportadores de glucosa. En consecuencia, la captación de glucosa en los tejidos adiposo, muscular y hepático incrementa entre un 30 y 50% (Israili, 2011; Majumdar & Inzucchi, 2013). Estos fármacos provocan ganancia de peso, falla cardíaca y riesgo de fracturas.

Un enfoque más reciente en el tratamiento de la diabetes consiste en el uso de análogos de incretinas o de sustancias que inhiben su degradación. Las incretinas [Péptido 1 Análogo de Glucagón (GLP-1) y Polipéptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa (GIP)] son péptidos secretados en el intestino y que regulan también la liberación de insulina. GLP-1 y GIP se secretan en las células L de íleon y colon, y por las K en duodeno y yeyuno, respectivamente (Majumdar & Inzucchi, 2013; Harris & McCarty, 2015).

GLP-1 estimula la producción de insulina ante altas concentraciones de glucosa, retrasa el vaciamiento gástrico y suprime el apetito y la liberación de glucagón. Existen fármacos agonistas del receptor GLP-1, entre los que se pueden mencionar la exenatida, liraglutida y lixisenatida. La unión de GLP-1 a su receptor causa un incremento en la producción de AMPc, activa el canal de K<sup>+</sup> dependiente de



ATP mediado por  $\beta$ -arrestina-1 provocando entonces un aumento en la síntesis y liberación de insulina (Gallwitz, 2011).

GIP incrementa la secreción de insulina de manera dependiente de la concentración de glucosa, pero no ejerce ningún efecto sobre la producción de glucosa hepática, la motilidad gástrica, la saciedad o la pérdida de peso; sin embargo induce lipogénesis y disminuye la secreción de ácido gástrico (Stonehouse *et al.*, 2012).

Las incretinas endógenas poseen tiempos de vida de minutos debido a la acción de la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). Entre los fármacos que inhiben la degradación de las incretinas por DPP-4 se encuentran la sitagliptina y saxagliptina. Su efecto se detiene cuando los niveles de azúcar en sangre se normalizan (Israili, 2011).

Los efectos adversos de los agonistas del receptor GLP-1 e inhibidores de DPP-4 no se han establecido claramente, sin embargo existen reportes de efectos como daño pancreático, náusea, dispepsia, vómito y diarrea (Israili, 2011; Stonehouse *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

Otros fármacos actúan sobre los cotransportadores de glucosa dependiente de sodio (SGLT) los cuales aumentan la excreción renal de glucosa. Existen dos tipos de cotransportadores, el SGLT-1 que se expresa en segmento S<sub>3</sub> del túbulo proximal y se estima que reabsorbe un 10% de glucosa; el segundo, el SGLT-2, se encuentra en el segmento S<sub>1</sub> y se encarga de reabsorber el 90% restante (Chao & Henry, 2010). Los más importantes son los inhibidores de SGLT-2 como la canagliflozina, la dapagliflozina y la empagliflozina. Estos tres productos inhiben la reabsorción renal de glucosa incrementando la excreción de glucosa en orina. No presentan riesgo de hipoglucemia debido a que no interfieren con el metabolismo de glucosa, no afectan el peso y reducen la presión sanguínea; sin embargo, aumentan el riesgo de infecciones genitourinarias (Israili, 2011; Misra, 2013; Scheen, 2015).

Los inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa como acarbosa, miglitol y voglibosa, disminuyen la absorción intestinal de glucosa ya que inhiben las alfa-glucosidasas responsables de la hidrólisis de oligo y polisacáridos en monosacáridos (glucosa, galactosa y fructosa) en las microvellosidades intestinales. Su principal desventaja consiste en que los carbohidratos que no se hidrolizan permanecen en el

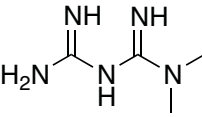
intestino y colon donde son metabolizados por bacterias, ocasionando flatulencia (78%), diarrea (14%) e inflamación intestinal (Van de Laar, 2008; Kalra, 2014).

Los secuestradores de ácidos biliares como colesevelam, disminuyen significativamente los niveles de colesterol LDL y pueden reducir también los niveles de glucosa sanguínea (Israili, 2011).

Por muchos años los usuarios de la medicina tradicional de diversas culturas han empleado plantas para el tratamiento de diabetes y sus complicaciones (Li *et al.*, 2012). Así, estudios etnobotánicos recientes estiman que más de 1200 especies se emplean a nivel global para controlar la enfermedad (Rahimi, 2015; Govindappa, 2015). Algunas de estas plantas cuentan con estudios experimentales clínicos y preclínicos que podrían sustentar su uso vernáculo. Muy a menudo, los mecanismos de acción de los preparados elaborados a partir de esas plantas son los mismos que presentan los fármacos convencionales (Prabhakar & Doble, 2011; Majumdar & Inzucchi, 2013; Govindappa, 2015), con la diferencia que un preparado de esta naturaleza usualmente presenta varios mecanismos de acción. Esta polivalencia se debe a la presencia en las plantas de diferentes componentes activos con diferentes mecanismos de acción (Israili, 2011; Chang *et al.*, 2013).

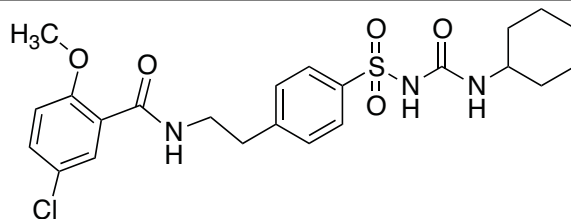
Finalmente, cabe destacar que existe una amplia gama de fármacos en desarrollo, entre los que destacan inhibidores de acetil coenzima A carboxilasa 1 y 2 (ACC), activadores de adenosin-5' monofosfato activado por proteincinasas (AMPK), agonistas del receptor de cannabinoides-1, inhibidores de fructosa-1,6-bifosfato, antagonistas del receptor grelina, antagonistas del receptor de glucagón, activadores de glucosinasa, inhibidores de gluconeogénesis entre otros (Israili, 2011).

**Cuadro 1.** Fármacos utilizados en el tratamiento de diabetes

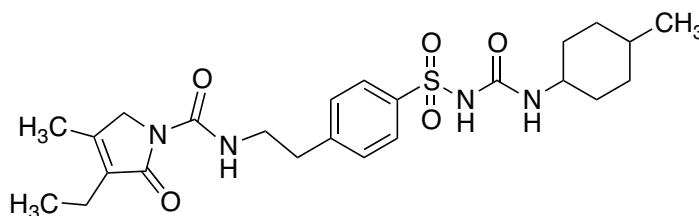
<b>Biguanidas</b>	Inhiben gluconeogénesis y aumentan sensibilidad a insulina
 <p><b>Metformina</b></p>	

**Cuadro 1.** Fármacos utilizados en el tratamiento de diabetes (Continuación)

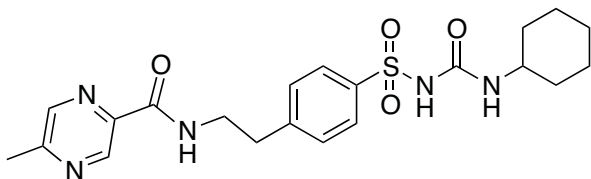
<b>Sulfonilureas</b>	Aumentan secreción de insulina
----------------------	--------------------------------



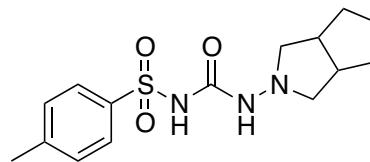
**Glibenclamida**



**Glimepirida**

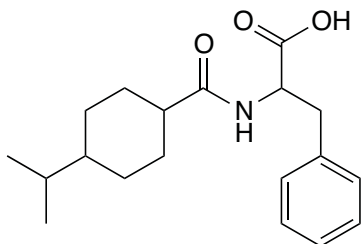


**Glipizida**

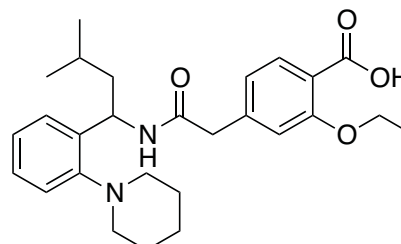


**Gliclazida**

<b>Glínicas</b>	Aumentan secreción de insulina
-----------------	--------------------------------



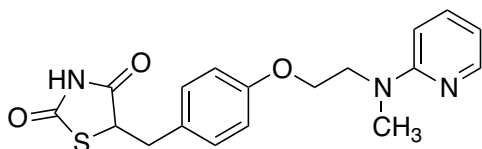
**Nateglinida**



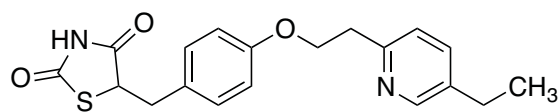
**Repaglinida**

**Cuadro 1.** Fármacos utilizados en el tratamiento de diabetes (Continuación)

<b>Tiazolidinedionas</b>	Activador de PPAR- $\gamma$
--------------------------	-----------------------------



**Rosiglitazona**



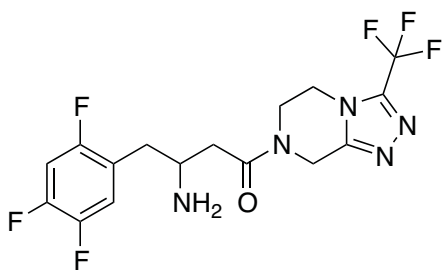
**Pioglitazona**

<b>Miméticos de incretinas</b>	Activa receptores GLP-1
--------------------------------	-------------------------

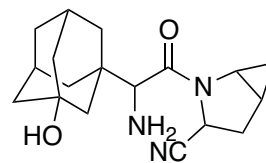
H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>

**Exenatida**

<b>Inhibidores de DPP-4</b>	Inhiben la actividad de DPP-4, aumentando las concentraciones de GLP-1
-----------------------------	--



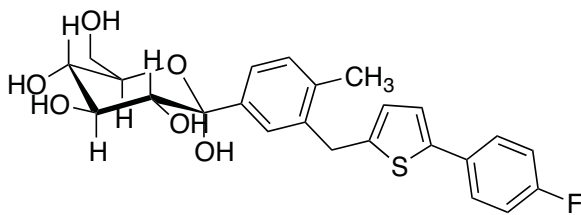
**Sitagliptina**



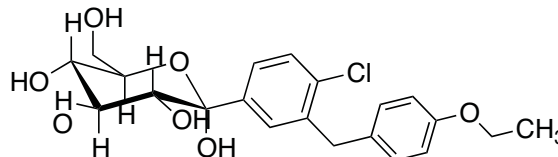
**Saxagliptina**

**Cuadro 1.** Fármacos utilizados en el tratamiento de diabetes (Continuación)

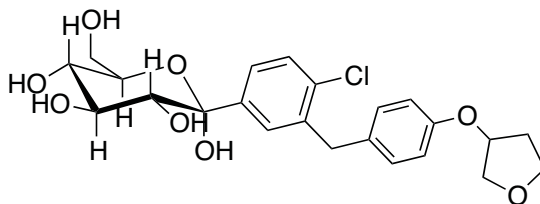
<b>Inhibidores SGLT-1</b>	Inhiben la reabsorción de glucosa en riñón
---------------------------	--



**Canagliflozina**

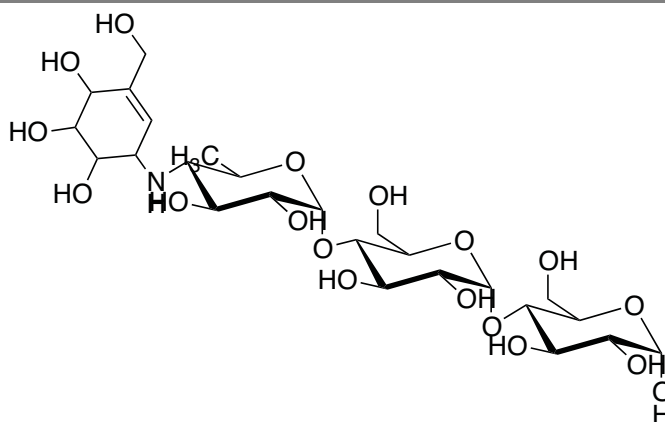


**Dapagliflozina**

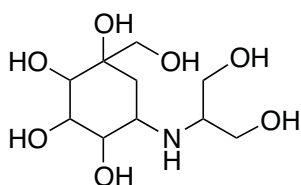


**Empagliflozina**

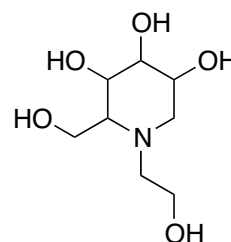
<b>Inhibidores de <math>\alpha</math>-glucosidasas</b>	Inhiben a las enzimas $\alpha$ -glucosidasas, disminuyendo la absorción de glucosa intestinal
--	---



**Acarbosa**



**Voglibosa**



**Miglitol**

### 2.3 Eficacia, seguridad y control de calidad de las plantas medicinales

El control de calidad de plantas medicinales es vital para garantizar su seguridad y eficacia; la falta de calidad puede repercutir en reacciones adversas atribuidas a adulteraciones, sustituciones o a la contaminación con sustancias tóxicas. Las especificaciones y métodos de control de calidad de productos herbolarios terminados y sus drogas crudas son más complejos que para otros productos farmacéuticos; además, está influenciada por las características de la droga cruda, las buenas prácticas de cultivo y recolecta, el periodo de recolecta, los mecanismos de secado y almacenamiento, entre otras (Shetti *et al.*, 2011; Masullo *et al.*, 2015).

En general, los parámetros utilizados para asegurar la calidad de las drogas crudas y sus preparados implican pruebas de identidad (botánica y química para el establecimiento de huellas digitales), pruebas de pureza (para identificar adulterantes y/o contaminantes) y pruebas de composición (que permitan establecer el contenido de principios activos y/o compuestos marcadores). Para asegurar la calidad, en primera instancia el material vegetal debe ser identificado correctamente haciendo uso de la definición botánica, descripción y estado de la parte de la planta utilizada en la preparación. Otra parte fundamental del aseguramiento de la calidad es la especificación de los constituyentes marcadores y/o activos característicos, y si es posible de los límites de contenido de sustancias extrañas, impurezas y microorganismos que pueden ser causa de efectos tóxicos (Li *et al.*, 2008).

La OMS establece que los criterios de inocuidad de los productos herbolarios son los mismos que los de cualquier medicamento. Sin embargo, aquellos productos herbolarios con un uso tradicional de muchos años y sin evidencias de efectos adversos pueden quedar exentos de las medidas de reglamentación restrictivas. Si se presentaran efectos adversos o secundarios es importante documentarlos y notificarlos a la autoridad sanitaria conforme a los procedimientos normales de farmacovigilancia, aunque la fuente más común de información sobre efectos adversos e interacción con medicamentos alopáticos son los ensayos clínicos. Cabe mencionar que los efectos tóxicos de una preparación a base de plantas puede ser atribuida principalmente a las características de sus constituyentes, a las malas

prácticas de manufactura o bien por contaminación, de allí la importancia de las pruebas de pureza antes señaladas.

Para evaluar la toxicidad de las drogas crudas y sus preparados existen varias metodologías *in vivo e in vitro* extensamente documentados por la OMS (IUPAC, 2008; WHO, 2002a).

Finalmente, la descripción y especificación de los efectos farmacológicos y clínicos es importante para asegurar la eficacia de los productos medicinales a base de plantas. Cuando se trata de medicamentos tradicionales para el tratamiento de trastornos leves o con indicaciones inespecíficas, los requisitos para comprobar su eficacia pueden ser menos estrictos, y se toma en cuenta la antigüedad de su uso. En estos casos solo se solicitan anécdotas o tradición oral; así como la realización de pruebas de eficacia preclínica basadas en ensayos farmacológicos sencillos. Cuando no se haya determinado el uso tradicional, será necesario realizar pruebas clínicas, reportes de casos, series de casos y ensayos clínicos aleatorizados (IUPAC, 2008; WHO, 2002a).

En el caso de la medicina herbolaria las anécdotas o tradición oral son importantes componentes de la evaluación de la eficacia; esto debido a la falta de información científica acerca de una gran cantidad de especies y el conocimiento sobre los usos y beneficios de las mismas que están limitados a curanderos de comunidades aisladas (Arab, 2000; Pferschy-Wenzig & Bauer, 2015).

Los informes de casos son el punto de partida de las pruebas de eficacia; éstos pueden representar las primeras pistas en la identificación de efectos secundarios desconocidos. Estos informes pueden ser retrospectivos o prospectivos.

Las series de casos son el conjunto de los informes de casos individuales y van a permitir explorar una asociación particular de efectos adversos o beneficios, con este tipo de información es posible la formulación de una hipótesis.

Los ensayos clínicos aleatorizados son la mejor opción para evaluar la eficacia de los medicamentos herbolarios; sin embargo, no siempre pueden ser implementados (Ernst & Pittler, 2002).

Con la finalidad de aportar las metodologías necesarias para la investigación y aseguramiento de la calidad, eficacia y seguridad de los productos herbolaros, la OMS ha publicado una serie de documentos entre los que destaca *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*. Este documento fue adoptado en la sexta reunión de la ICDRA celebrada el año de 1991 en Ottawa, Canadá. En esta reunión se recomendó que la OMS desarrollara los modelos de monografías científicas de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo, con la finalidad de establecer los parámetros de inocuidad, eficacia, control y aseguramiento de la calidad de dichas plantas (WHO, 1999). Así, en 1999 se publicó un primer tomo con 28 monografías de plantas medicinales de amplio uso en el mundo. Estas servirían de modelo para que los países miembros elaborasen los documentos de sus plantas autóctonas. En el año 2001 se publicó un segundo tomo con 30 monografías más; un tercer volumen apareció en 2007 con 31 nuevas plantas y durante 2009 se publicó un cuarto volumen con 28 nuevas monografías; existe además un documento publicado en 2010, que incluye la información sobre 30 plantas de amplio uso en los nuevos estados independientes de Europa y actualizaciones de monografías anteriores (WHO, 1999; 2002b; 2007; 2009; 2010). Estos documentos proporcionan información científica sobre la seguridad, eficacia y control de calidad de plantas medicinales y constituyen herramientas valiosas para la regulación, adecuación e incorporación de los remedios tradicionales al sistema de salud oficial. Además, constituyen modelos idóneos para ayudar a las naciones partícipes a desarrollar las monografías de sus especies vernáculas, para lograr armonizar a nivel global el uso de hierbas medicinales y así regular el creciente comercio de drogas vegetales entre la sociedad en general.

Como respuesta a las iniciativas de la OMS, y debido al interés del público por consumir productos herbolaros adecuados, muchos países han publicado una serie de documentos de carácter oficial que tratan de resumir los aspectos más relevantes de los métodos de análisis para determinar la identidad, pureza, composición y eficacia de las drogas crudas y sus preparados fitofarmacéuticos.

México, país con una enorme tradición en el uso de hierbas con fines curativos, no ha quedado exento de la influencia de todos los cambios ocurridos en el desarrollo y comercialización de los fitomedicamentos. Como una respuesta al llamado de la



OMS, la Secretaría de Salud de México ha publicado dos ediciones de la Farmacopea Herbolaria. En estos textos se incluyen los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas y los derivados, que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios; también se incluyen las monografías de varias plantas y aceites esenciales medicinales de amplio uso en México y los procedimientos para su control de calidad (FHEUM, 2001; 2013). Cabe mencionar que doce de las nuevas monografías de plantas y dos de aceites esenciales incluidas en la última edición de la Farmacopea son el resultado de investigaciones realizadas por científicos mexicanos (FHEUM, 2013).

A pesar de estos esfuerzos, aún es necesario documentar la eficacia, seguridad e inocuidad de cientos de plantas de reconocido uso tradicional en México.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Al igual que en otros países del mundo, en México la diabetes representa un grave problema de salud que conlleva a un gasto millonario por parte del sector salud. Para resolver este importante problema se han realizado grandes campañas de salud enfocadas no solo a las medidas preventivas de la enfermedad sino también a la importancia de utilizar terapias seguras y eficaces.

A pesar de ello, las estadísticas indican que del número total de diabéticos únicamente el 25% recibe tratamiento farmacológico, y no todos lo siguen correctamente por múltiples factores que incluyen los socioeconómicos y los efectos adversos que ocasionan algunos medicamentos alopáticos.

En México existen alrededor de 383 especies de plantas utilizadas para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Mata *et al.*, 2013). Sin embargo, son pocas las especies que cuentan con estudios científicos relacionados con su eficacia, inocuidad, composición química y parámetros de calidad tan necesarios para sustentar su uso de manera racional. Además, esos recursos no están regulados por los organismos sanitarios oficiales. Cabe señalar, también que muchos pacientes diagnosticados con diabetes sustituyen sus tratamientos alopáticos por productos herbolarios. Asimismo, otros pacientes combinan ambos tipos de terapias sin considerar las interacciones farmacológicas potenciales. De ahí la necesidad de generar información científica sobre múltiples aspectos de esas plantas, desde su explotación, abasto continuo y comercio hasta todos aquellos que garanticen su eficacia, seguridad y calidad (Rates, 2001).

Entonces, las plantas medicinales podrían representar una terapia alternativa para el tratamiento de la diabetes en México; son de fácil acceso y gozan de amplia aceptación entre la población mexicana debido a la tradición ancestral en el uso de estos recursos. Por otro lado, el interés global por el uso de medicamentos herbolarios ha conllevado a que la población prefiera estos productos (Soumyanath, 2006; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Con base en las consideraciones anteriores este proyecto de investigación se realizó con el objetivo de generar la información científica necesaria para establecer

algunos parámetros de identidad, inocuidad y eficacia preclínica antidiabética de la especie *Anoda cristata* (L) Schldtl (Malvaceae) con la finalidad de garantizar su uso racional para el tratamiento de diabetes.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- \* Determinar la composición del aceite esencial obtenido por hidrodestilación a partir de la droga cruda *A. cristata* mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- \* Obtener el perfil cromatográfico de la infusión de la planta y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas (CLUE-EM) que permita la cuantificación de los principios activos y/o marcadores de *A. cristata*, así como la estandarización de sus preparados.
- \* Establecer la inocuidad preclínica de preparados derivados de la planta mediante la determinación de su toxicidad aguda en roedores aplicando el método de Lorke.
- \* Determinar el potencial hipoglucemiante y antihiper glucémico de los distintos preparados obtenidos de la droga cruda de *A. cristata* en ratones utilizando experimentos farmacológicos clásicos de tipo agudo y las pruebas de tolerancia a glucosa y sacarosa (PTGO y PTSO).
- \* Aislar y caracterizar los principios activos de la especie a través de la aplicación de los procedimientos fitoquímicos convencionales.
- \* Evaluar el potencial antidiabético de los compuestos obtenidos utilizando los ensayos antes indicados, así como determinar sus posibles mecanismos de acción.
- \* Evaluar el efecto de algún preparado de *A. cristata* en un modelo de síndrome metabólico en rata.
- \* Evaluar el potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de la especie, utilizando la prueba de formalina en ratón.
- \* Evaluar el potencial antihiperalgésico de los compuestos y su posible mecanismo de acción, utilizando la prueba de formalina en ratón.

### 3.1 HIPÓTESIS

Los antecedentes etnobotánicos de *Anoda cristata* (Malvaceae) sugieren que la planta contiene metabolitos con propiedades hipoglucemiantes y/o antihiperoglucémicos, así como analgésicos potenciales, y que una vez procesados pueden generar nuevos agentes para el tratamiento de la diabetes.

## 4. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 4.1. Material vegetal

Las partes aéreas de *Anoda cristata* se recolectaron en Tepeaca (Puebla, México) en el mes de noviembre de 2012; a partir de este lote se prepararon los extractos utilizados para las pruebas analíticas y farmacológicas. Un espécimen de referencia fue identificado por el Dr. Robert Bye y depositado en el Herbario Nacional (MEXU), UNAM (voucher Bye y Linares. 2755). Adicionalmente se utilizaron muestras coletadas el mes de julio y octubre; una colecta de CU y otra de Nepantla, Estado de México.

### 4.2. Preparación de extractos

El material vegetal se secó a temperatura ambiente, posteriormente se fragmentó utilizando un molino de cuchillas Thomas Wiley, tamaño de partícula de 2 mm (Laboratory Mill, Thomas Scientific, EE. UU.).

#### 4.2.1. Extracto acuoso total (EAT)

Para la obtención del extracto acuoso total (EAT) se aplicó el método de infusión. Cincuenta gramos de material vegetal seco y molido se sometieron a extracción con 2 L de agua hirviendo, la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos, se filtró utilizando gasa y posteriormente papel filtro. La infusión fue evaporada a sequedad bajo presión reducida utilizando una bomba de vacío (Vacuum Pump V710; BUCHI, Suiza), de éste procedimiento fueron obtenidos 6 gramos de EAT.

#### 4.2.2 Extracto acuosos libre de mucilago (EA-LM)

El extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) se obtuvo adicionando etanol (1:1) a la infusión (Bhatty, 1993); el precipitado resultante del tratamiento con EtOH se separó por centrifugación (10000 g; 10 min), el sobrenadante se concentró a presión reducida; por cada 6 g de EAT se obtienen 4 g de EA-LM y 1 g de mucilago. Este último se obtuvo tras secar el precipitado obtenido de la centrifugación a 37 °C, en una estufa.

#### 4.2.3. Obtención de la fracción orgánica de la infusión (EO-In)

Para la preparación de la fracción orgánica de la infusión (EO-In) se re-suspendieron 170 g del EA-LM en agua destilada, posteriormente se realizó un proceso de reparto con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 L  $\times$  3) y AcOEt (1 L  $\times$  3); las fases orgánicas se combinaron y concentraron *in vacuo*, de este extracto se obtuvieron 2.152 g.

#### 4.3. Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 mm ASTM). Los análisis cromatográficos por CCF, analítico o preparativo (CCFP), se realizaron sobre placas de aluminio y de vidrio, respectivamente, de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F254 Merck, malla 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales y empleando diversos sistemas de elución, como agente revelador se empleó una solución de sulfato sérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110 °C durante un minuto.

#### 4.4. Aislamiento y caracterización de la diosmetina y acetina del EO-In

Un gramo del EO-In fue sometido a un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta; como fase estacionaria se utilizó gel de sílice, como fase móvil, un gradiente de hexano-acetato de etilo (10:0  $\rightarrow$  0:10) y acetato de etilo-metanol (10:0  $\rightarrow$  0:10); de este fraccionamiento se obtuvieron 17 fracciones secundarias (F1-F17). De las fracciones F8 y F11 cristalizaron 20 mg de acetina (**1**) y 25 mg de diosmetina (**2**), respectivamente, dos de los compuestos mayoritarios en el EO-In. Las estructuras de los compuestos **1** y **2** fueron establecidas por métodos espectroscópicos y espectrométricos, así como por comparación con los datos encontrados en la literatura.

#### **4.5. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo marca Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO tiempo de vuelo (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, EE.UU.). La columna utilizada fue de tipo capilar empacada con fenil-metil silicón (5%, DB-5) de 10 m de longitud, 0.18 mm de diámetro y 0.18  $\mu\text{m}$  de espesor de película. El programa de temperatura del horno fue 40 °C (1 min), 20 °C/min hasta 300 °C (15 min). Tipo de inyección Split (con división de flujo), 1:20. Se empleó helio como gas acarreador (Praxair, grado 5.0 Ultra alta pureza) con un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C. El tipo de ionización fue de impacto electrónico (IE) y el detector (analizador de masas) de tiempo de vuelo (TOF). La adquisición de los espectros fue de 20 espectros/seg. El retraso de encendido del filamento de 0 min. La temperatura de la cámara de ionización fue de 200 °C. Las masas se registraron en un rango de 33 a 800 uma. Los constituyentes fueron identificados mediante el software del equipo (ChromaTOF ®) calculando los índices de retención aplicando la metodología descrita por Kovats, utilizando una serie de n-alcanos ( $\text{C}_8\text{-C}_{20}$ ) y por la comparación de sus espectro de masas con los reportados en diferentes fuentes de información como la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST).

#### **4.6. Establecimiento del perfil cromatográfico**

Los análisis por cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (CLUE-EM) del extracto orgánico de la infusión (EO-In) se realizaron empleando un cromatógrafo Waters ACQUITY UPLC®, equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA), una bomba cuaternaria, y un inyector automático, acoplado a un detector de masas SQ2 (Waters).

Se utilizó una columna BEH Shield RP18 de 2.1 mm de diámetro interno, 100 mm de longitud y 1.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc®) de 0.2  $\mu\text{m}$ \*13 mm antes de ser inyectadas al cromatógrafo para su análisis. Como sistema de elución se empleó un gradiente lineal

de acetonitrilo-agua/0.1% Ac. fórmico (HCOOH) (**Tabla 2**). La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos en el perfil cromatográfico se encontraban en el rango entre 280 y 330 nm; para la obtención de los espectros de UV se realizó un barrido de 200 a 400 nm. Una vez filtradas las muestras, se inyectaron 5  $\mu$ L de las soluciones.

En el caso de las condiciones del detector de masas se utilizaron las siguientes condiciones: el modo de ionización fue  $IE^-$ , voltaje del capilar 3.0 kV; voltaje del cono 38 V; temperatura de desolvatación fue de 350 °C y un flujo de gas de 200 L/hr. Todos los datos obtenidos fueron procesados con el programa MassLynx v 4.1.

**Tabla 2.** Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE-MS para el establecimiento del perfil cromatográfico de *A. cristata*

Tiempo (min)	% Acetonitrilo	% H <sub>2</sub> O + (0.1% HCOOH)
0	10	90
1	10	90
9	50	50
10	80	20
11	90	10
13	10	90
14	10	90

#### 4.7. Validación del método analítico

La validación del método analítico desarrollado se realizó con base en los lineamientos establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la validación de métodos analíticos [ICH Q2 (R1), 2005].

##### 4.7.1 Selectividad

Para evaluar selectividad del método se realizó el registro de los espectros de UV de cada una de las siguientes soluciones: compuestos **1** y **2**, la matriz de trabajo (EO-In) y la matriz enriquecida con los estándares de **1** y **2**. Las muestras correspondientes a los



estándares se analizaron a la concentración de 7.5 y 5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente; la matriz de trabajo se evaluó a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ; finalmente se preparó una solución de la matriz enriquecida con los compuestos, mezclando una solución de 20  $\mu\text{g/mL}$  de la matriz con el mismo volumen de una solución del estándar a 15 y 10  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.7.2. Linealidad del sistema

Este parámetro se determinó mediante la construcción de una curva de calibración que obedeció a la siguiente metodología: 2.5 mg de estándar (**1** y **2**) se disolvieron en 10 mL de MeOH (250  $\mu\text{g/mL}$ ). A partir de estas soluciones se realizaron las diluciones necesarias para la obtención de concentraciones entre 0.5 y 15  $\mu\text{g/mL}$  de cada compuesto. El área bajo la curva (ABC) del pico de cada estándar (seis réplicas) se graficó con respecto a la concentración de referencia en cada solución. Para el cálculo de los parámetros estadísticos se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios de aceptación son los siguientes:  $b_1 \neq 0$ ;  $R \geq 0.99$ ;  $R^2 \geq 0.98$  e IC ( $\beta_1$ ) no incluye al cero.

#### 4.7.3. Linealidad del método y exactitud

La determinación de la linealidad del método y exactitud se realizó mediante la adición a la matriz de trabajo (5  $\mu\text{g/mL}$ ) de diferentes cantidades de los estándares, en un rango de concentraciones entre 2.5 y 12.5 para el compuesto **1**, y entre 2.5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  para **2**. Se realizaron cinco réplicas por concentración, se obtuvieron los valores de ABC y estos fueron interpolados en la curva de calibración desarrollada para evaluar la linealidad del sistema de cada compuesto; los resultados (concentración adicionada vs concentración recuperada) se analizaron para determinar los parámetros estadísticos:  $b_0 = 0$ ;  $b_1 \neq 0$ ;  $R \geq 0.99$ ;  $R^2 \geq 0.98$  y  $C_{vy/x} \leq 2\%$  mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos tomados en cuenta para la evaluación de la exactitud del método fueron: promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza para la media poblacional [IC ( $\beta_1$ )] del porcentaje de recobro.

#### 4.7.4. Precisión del método

La repetibilidad se estableció mediante el análisis de siete réplicas a una concentración de 7.5 µg/mL para el compuesto **1**, y de 5 µg/mL para el **2**. El análisis se realizó en dos días y por dos analistas diferentes. Los resultados se expresan en términos de coeficiente de variación (CV).

#### 4.7.5. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Para la evaluación de los límites de detección y cuantificación se prepararon muestras que contenían 10 µg/mL del EO-In diluida con MeOH en una proporción 1:1. Se evaluaron diez réplicas y el ABC que corresponde a los compuestos **1** y **2** en cada réplica se utilizó para el cálculo de dichos límites. Los LD y LC se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times S_b}{b_1}$$

#### 4.7.6. Estabilidad

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis del contenido de **1** y **2** en muestras preparadas a una concentración de 10 y 5 µg/mL sometidas a condiciones de refrigeración (-4°C), temperatura ambiente (25°C), hidrólisis ácida e hidrólisis básica. Las muestras fueron evaluadas por quintuplicado para todas las condiciones.

#### 4.7.7. Cuantificación de los compuestos **1** y **2** presentes en el EO-In de diferentes colectas de droga cruda de *A. cristata*

Para la cuantificación de las flavonas en el EO-In de las diferentes colectas (Muestras I-V), se prepararon tres extractos de manera independiente y de cada muestra se obtuvo una solución a una concentración de 1 mg/mL. Los compuestos se cuantificaron registrando el perfil cromatográfico utilizando las condiciones indicadas en la **Tabla 2**. Se determinó el ABC y estos datos se interpolaron en la ecuación de la recta de la curva de calibración obtenida para la linealidad del sistema.

#### **4.8. Establecimiento de la seguridad y eficacia preclínica**

Los estudios de toxicidad aguda, actividad hipoglucemiante, antihiper glucémica, y antihiperalgésica fueron realizados en ratón macho de la cepa ICR, con un peso de entre 25 y 30 g. Los estudios de síndrome metabólico se realizaron en ratas macho de la cepa Sprague Dawley (SD), en un rango de peso de entre 220 y 260 g. Ambos tipos de animales fueron adquiridos en el centro UNAM-Harlan (Harlan Laboratories S.A. de C.V., México). Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones de laboratorio: temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , alimento y agua *ad libitum*, 70-80% humedad relativa y un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Todos los experimentos fueron conducidos en conformidad con la NOM-062-ZOO-1999, así como respetando los protocolos aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química UNAM. (FQ/CICUAL/084/14; FQ/CICUAL/085/14 y FQ/CICUAL/086/14).

##### **4.8.1. Determinación de la toxicidad aguda**

Para evaluar la toxicidad aguda de los extractos obtenidos, se utilizó la metodología experimental descrita por Lorke (1983).

Este protocolo constó de dos etapas. En la primera se ensayaron tres dosis de cada uno de los extractos (10, 100 y 1000 mg/kg) las cuales fueron administradas vía oral (*p.o.*) a ratones con 12 horas de ayuno y libre acceso al agua. Las muestras fueron preparadas utilizando solución salina y 0.1% de Tween 80. Los animales fueron observados durante dos horas posteriores a la administración de los extractos y se monitorearon durante los siguientes 15 días, registrando su peso corporal. Una vez transcurrido este tiempo se les realizó una necropsia, con la intención de observar la existencia de daño macroscópico en órganos.

En la segunda etapa los ratones recibieron las dosis de 1600, 1900 y 5000 mg/kg, las muestras fueron preparadas y administradas en las mismas condiciones que para la primera fase. Los animales fueron observados durante dos horas posteriores a la administración de los extractos y se monitorearon durante los siguientes 15 días, registrando su peso corporal. Una vez transcurrido este tiempo se

les realizó una necropsia, con la intención de observar la existencia de daño macroscópico en órganos.

A partir de los resultados obtenidos de las dos fases, se puede establecer el valor de la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>). Este valor se calcula utilizando una media geométrica entre la dosis donde se presentó el deceso del primer animal y la última dosis en la que no hubo especímenes muertos.

#### **4.8.2. Evaluación de la actividad antidiabética**

La actividad antidiabética de los diferentes extractos fue evaluada mediante la aplicación de experimentos de tipo agudo y sub-agudo con base en los protocolos descritos en la literatura (Cristians *et al.*, 2009; Brindis *et al.*, 2011).

##### **4.8.2.1. Determinación de los niveles de glucosa sanguínea**

Las muestras de sangre fueron recolectadas de la vena caudal de los animales mediante una incisión en la parte final de la cola. Los niveles de glucosa en sangre fueron determinados con el método enzimático de la glucosa oxidasa, mediante un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson & Jonhson, Milpitas, CA, E.U.).

##### **4.8.2.2. Modelo de inducción de hiperglucemia en los animales de experimentación**

Los ratones macho de la cepa ICR de 30 gramos de peso promedio, se diabetizaron con una dosis intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 130 mg/kg) disuelta en una solución amortiguadora de citratos con un pH de 4.5, que se administró después de un tratamiento con una solución de nicotinamida (NA, 50 mg/kg) con la finalidad de proteger a las células  $\beta$  pancreáticas del daño oxidativo excesivo producido por la estreptozotocina (Masiello *et al.*, 1998).

##### **4.8.2.3. Ensayo hipoglucemiante agudo**

La actividad hipoglucemiante fue evaluada mediante un experimento de tipo agudo, en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos, utilizando 6 animales por grupo.

Los diferentes extractos fueron administrados por vía oral (*po*) a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg. Las muestras fueron disueltas en el vehículo (solución salina isotónica con Tween 80 al 0.05%). Se utilizó como control blanco un grupo administrado únicamente con el vehículo (VEH); al control positivo se le administró glibenclamida a la dosis de 15 mg/kg. Los niveles de glucosa sanguínea se determinaron a los tiempos 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas a partir de la administración de los tratamientos. Para evaluar el efecto hipoglucemiante se calcularon las áreas bajo la curva mediante el método de los trapecios (Escandón-Rivera *et al.*, 2012).

#### 4.8.2.4. Tolerancia a glucosa oral (PTGO)

Con la finalidad de determinar la actividad antihiper glucémica de los preparados de las especies estudiadas, se realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa (PTGO), esto en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos; los animales se mantuvieron en ayuno durante 4 horas previas al experimento.

Los diferentes tratamientos se administraron a cada grupo de ratones ( $n= 6$ ) vía oral a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg; cada preparación fue disuelta en el vehículo. El control positivo en este caso fue la metformina (200 mg/kg), y como blanco el vehículo. Treinta minutos después de los tratamientos, los animales recibieron una carga de glucosa (1 g/kg). Se determinaron los niveles de glucosa sanguínea a los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas posteriores a la administración del carbohidrato. Con los valores obtenidos se calcularon los porcentajes de variación de glucemia de acuerdo con la siguiente ecuación: % variación de glucemia =  $[(G_t - G_i)/G_i] * 100$ ; donde  $G_i$  corresponde al valor de glucemia inicial (0 horas) y  $G_t$  son los diferentes valores de glucemia registrados en los muestreos (Brindis *et al.*, 2011).

#### 4.8.2.5. Tolerancia a sacarosa oral (PTS0)

Este ensayo se realizó aplicando la metodología previamente descrita, para el ensayo de tolerancia a la glucosa PTGO; utilizando como carbohidrato de prueba una dosis de 3 g/kg de sacarosa. Como control positivo en este caso se utilizó acarbosa (5 mg/kg, *po*). Se calcularon los porcentajes de variación de glucosa para todos los tratamientos (Brindis *et al.*, 2011).

#### **4.8.2.6. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los compuestos acacetina y diosmetina**

La actividad hipoglucemiante de los compuestos acacetina y diosmetina, fue evaluada mediante un experimento de tipo agudo, en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos, utilizando la metodología descrita en el inciso 4.4.2.3 Los compuestos se administraron por vía oral (*po*) a las dosis de 3, 10 y 31.6 mg/kg. El efecto hipoglucemiante se calculó con las áreas bajo la curva mediante el método de los trapecios.

#### **4.8.3. Determinación del mecanismo de acción del EA-LM y los compuestos acacetina y diosmetina**

##### **4.8.3.1. Tolerancia a la insulina de EA-LM**

Para este experimento se utilizaron cinco grupos de ratones ( $n = 6$ ) con 4 h de ayuno, Los grupos I (blanco) y II (control insulina), recibieron un tratamiento de vehículo *po*, a razón de 0.2 mL/10 g de peso; el grupo III (control metformina) fue tratado con metformina (200 mg/kg, *po*); los grupos IV y V recibieron el EA-LM a las dosis de 100 y 316 mg/kg *po*, respectivamente. Transcurridos 30 min, los grupos II-V recibieron una carga de insulina (1U/kg; 0.1 mL/10 g de peso), el grupo I recibió una carga de vehículo (0.1 mL/10 g de peso). Se determinaron los niveles de glucosa sanguínea a los tiempos 0, 15, 30, 45, 120 min posteriores a la administración de insulina. Con los valores obtenidos se calcularon las áreas bajo la curva de glucosa y los porcentajes de variación de glucemia, de acuerdo a las metodologías descritas previamente.

##### **4.8.3.2. Bloqueo de canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ )**

Con el objetivo de determinar la participación de los canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) en el efecto hipoglucemiante de compuestos y preparados, se realizó un experimento hipoglucemiante agudo, aplicando un pre-tratamiento de inhibición de canales de calcio o una modulación positiva de canales de potasio.

Se utilizaron 12 grupos de ratones hiperglucémicos ( $n = 6$ ). Los grupos I-IV fueron pre-tratados con vehículo (0.1 mL/10 g de peso, *ip*); los grupos V-VIII fueron administrados con nifedipino (13.6 mg/kg, *ip*; NIF: bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L); los grupos IX-XII recibieron diazoxido (2 mg/kg, *ip*; DZX: agonista selectivo de canales de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}/\text{SUR1}/\text{Kir6.2}$ ). Treinta minutos después un grupo de cada pretratamiento se les suministró: glibenclamida (15 mg/kg, *po*; GLI: bloqueador de canales de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ ), acetina (3 mg/kg, *po*), diosmetina (3 mg/kg, *po*), y vehículo (Michiels *et al.*, 2014; Chowdhry & Mohanty, 2015; Constant-Urban *et al.*, 2013; Kishore *et al.*, 2011). Los niveles de glucosa sanguínea se determinaron a los tiempos 0, 0,5, 1.5 y 3 horas a partir de la administración de los tratamientos. Para evaluar el efecto hipoglucemiante se calcularon las áreas bajo la curva mediante el método de los trapecios.

#### **4.8.4. Efecto del EA-LM en ratas con Síndrome metabólico (SM)**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley (SD) (de 12 semanas de edad, con un peso de 220-260 g), las cuales tuvieron un periodo de adaptación de una semana; posteriormente se dividieron en cuatro grupos de seis, los cuales se colocaron en cajas de acrílico.

##### **4.8.4.1. Inducción de síndrome metabólico en ratas SD**

Para la inducción de síndrome metabólico los grupos experimentales fueron sometidos a una dieta alta en carbohidratos, utilizando una solución de fructosa al 10 % como agua de uso.

Todos los grupos recibieron una dieta sólida estándar para roedor (Pellets: 44.2% de carbohidratos; 18.6% de proteínas; 6.2% de grasas; 3.1 Kcal/g; 2018S Teklad Global Diets, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, EE.UU.). El grupo I (vehículo) recibió agua, a los grupos II-IV se le suministró una solución de fructosa al 10% como agua de uso. El periodo de inducción de diabetes fue de doce semanas (Ferreira de Moura *et al.*, 2009), no obstante la dieta se mantuvo durante todo el experimento.

Para el cálculo de la ingesta calórica, los bebederos y los pellets eran medidos y rellenados cada dos días, respectivamente. La diferencia entre el volumen o peso inicial y final fueron considerados como la cantidad de solución de fructosa o alimento ingerido durante ese periodo.

#### **4.8.4.2. Tolerancia a la glucosa oral**

Este experimento se realizó al inicio de la semana trece, utilizando la metodología descrita en el inciso 4.6.2.4. Las ratas fueron sometidas a un ayuno de cuatro horas. El grupo I (control vehículo) y grupo II (control fructosa: FRU), recibieron como tratamiento (el vehículo, *po*, a razón de 0.2 mL/100g de peso); los grupos III y IV fueron tratados con el EA-LM (100 mg/kg y 316 mg/kg, *po*, 0.2mL/100g de peso). Treinta minutos después de los tratamientos se administró una carga de glucosa a la dosis de 2 g/kg, *po*. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas a los 0, 30, 60, 90 y 120 min a partir de la administración del carbohidrato. Se calcularon los porcentajes de variación de glucosa utilizando la metodología descrita para los ratones (Brindis *et al.*, 2011).

#### **4.8.4.3. Evaluación del extracto acuoso libre de mucilago**

Una vez realizada la prueba de tolerancia a la glucosa, los animales se dejaron durante una semana, bajo las condiciones de dieta de las 12 semanas previas. Durante la semana 14 (días 98-104) las ratas de los grupos III y IV se trataron diariamente, con EA-LM a las dosis de 100 y 316 mg/kg, *po* respectivamente; el grupo I y II recibieron vehículo como tratamiento. Durante esta semana se mantuvieron las condiciones de dieta previamente descritas para cada grupo.

#### **4.8.4.4. Obtención de muestras biológicas (sangre, hígado y grasa abdominal)**

Durante el día 105, las ratas fueron sometidas a 4 h de ayuno y se anestesiaron con ketamina-xilacina (80 mg/kg-10 mg/kg, *im*); a continuación se obtuvieron muestras de sangre por punción ocular; el suero se separó por centrifugación (3000g, 5 min). Posteriormente, los animales se sacrificaron en cámaras de CO<sub>2</sub> con la finalidad de



extraer el hígado y la grasa abdominal. El suero y los tejidos obtenidos se almacenaron a -80 °C.

#### **4.8.4.5. Evaluación de parámetros físicos y bioquímicos**

Con la finalidad de determinar el efecto de la administración de EA-LM sobre las ratas con SM, se midieron distintos parámetros físicos y bioquímicos.

Peso e índice de Lee: todos los animales fueron pesados y medidos (largo: nariz-ano; y circunferencia abdominal) al inicio y al final del experimento. El índice de Lee fue calculado con la siguiente fórmula:  $I_L = \{[\sqrt[3]{\text{peso final (g)}}]/[\text{longitud final (cm)}]\} \times 1000$  (Basciano *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010).

La determinación sérica de glucosa, colesterol total y triglicéridos se realizó utilizando reacciones colorimétricas con un kit comercial (RANDOX Laboratories, Antrim, Reino Unido), con el apoyo del laboratorio de patología clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Los niveles de insulina fueron estimados usando un método inmunoenzimático (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, EE.UU.).

El contenido de glucógeno hepático fue determinado de acuerdo a la técnica reportada por Murat & Serfaty, 1974. Brevemente, 50 mg de tejido hepático fueron homogeneizados en 1 mL de buffer de citratos frío (0.1 M, pH 4.2). Los homogenados fueron diluidos con el mismo buffer hasta una concentración de 5 mg/mL; de esta solución se tomaron 10  $\mu$ L que se mezclaron con 10  $\mu$ L de amiloglucosidasa (exo-1,4- $\alpha$ -glucosidase, EC 3.2.1.3; 1 mg/mL, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.); la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante dos horas, transcurrido este tiempo se tomaron 10  $\mu$ L, para la determinación del contenido de glucosa libre usando un kit comercial (Trinder GOD-POD, Spinreact, Spain).

#### **4.8.5. Evaluación de la actividad antinociceptiva y antihiperalgésica del EA LM y los compuestos acacetina y diosmetina**

Para la evaluación antinociceptiva y antihiperalgésica de la especie se utilizó la prueba de la formalina en ratón macho de la cepa ICR, sanos e hiperglucémicos (cuatro semanas después de la administración de NA-STZ).

#### **4.8.5.1. Inducción de hiperglucemia**

Los ratones fueron tratados con NA-STZ utilizando la metodología descrita en el inciso

**4.8.2.2.** Las muestras de sangre fueron recolectadas de la vena caudal de los animales mediante una incisión en la parte final de la cola. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron con un glucómetro comercial como se indicó en el **4.8.2.1.**

#### **4.8.5.2. Modelo de la formalina**

Después de cuatro semanas de la inducción de diabetes (NA-STZ), se determinaron los niveles de glucosa de los animales. Los ratones se sometieron a un proceso de acondicionamiento, para lo cual se colocaron de manera individual dentro de cilindros de acrílico de 20×40 cm durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se administraron los tratamientos, en la superficie dorsal de la pata derecha, vía subcutánea *sc*; 15 minutos después se suministró en la misma extremidad, vía *sc*, la solución de formalina (40  $\mu$ L; 2% normoglucémicos y 1% hiperglucémicos) utilizando una aguja 31 G (Hunskar *et al.*, 1985; Alreja *et al.*, 1984). Los animales se colocaron nuevamente en el cilindro de observación. Se cuantificó el tiempo de lamida en intervalos de 5 minutos durante un periodo de media hora. Los resultados fueron expresados como ABC, calculados con el método de los trapecios (Escandón-Rivera *et al.*, 2012).

#### **4.8.5.3. Preparación de muestras**

Los extractos y compuestos fueron disueltos en SSI estéril y se administraron vía *sc* de la siguiente forma: EA-LM a concentraciones entre 10 y 100  $\mu$ g/pata; acetina entre 1 y 7.5  $\mu$ g/pata, diosmetina entre 0.1 y 6  $\mu$ g/pata; y gabapentina (GBP, control positivo) a 30  $\mu$ g/pata. Como blanco se utilizó el vehículo (40  $\mu$ L/pata, *sc*).

#### **4.8.5.4. Evaluación del mecanismo de acción antihiperalgésico**

Con el objetivo de determinar el posible mecanismo de acción que produce el efecto antihiperalgésico; los compuestos se evaluaron en la prueba de la formalina, aplicando

un pre-tratamiento de inhibición o activación de distintas vías implicadas en la actividad hiperálgica.

En este experimento se utilizaron 21 grupos de ratones hiperglucémicos ( $n = 6$ ). Estos se dividieron en 7 subgrupos. Los subgrupos recibieron los siguientes tratamientos: vehículo (VEH, 40  $\mu\text{L}$ /pata, *sc*); GLI (50  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*, bloqueador de canales de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ); naloxona (NLX, 3  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*; agonista de receptores opioides); flumazenil (FLU, 6  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*; antagonista GABAérgico); ketanserina (KET, 3  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*; antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>); ODQ (75  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*; inhibidor de guanilato ciclasa) y L-NAME (150  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*; inhibidor de óxido nítrico sintasa). Quince minutos después un grupo de cada pretratamiento fue administrado con vehículo (40  $\mu\text{L}$ /pata, *sc*); el segundo grupo de pretratamiento recibió acetina (6  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*), y al tercer grupo se le administró diosmetina (0.5  $\mu\text{g}$ /pata, *sc*). Transcurridos 15 minutos de la administración de los tratamientos se inyectó la solución de formalina al 1%. Se cuantificó el tiempo de lamida en intervalos de 5 minutos durante un periodo de media hora. Para evaluar el efecto antihiperálgico se calcularon las áreas bajo la curva mediante el método de los trapecios (Escandón-Rivera *et al.*, 2012).

#### **4.9. Evaluación de la actividad antioxidante del EA-LM *in vitro***

Para la determinación de la actividad antioxidante se trabajó en colaboración con el Dr. José Pedraza Chaverri. Las técnicas experimentales aplicadas fueron las siguientes:

##### **4.9.1. Ensayo de atrapamiento del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )**

El sistema Xantina-Xantina oxidasa se utilizó para determinar la capacidad del EA-LM para atrapar al radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . La generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y la actividad de la Xantina oxidasa se determinaron en base a la reducción del compuesto nitroazul de tetrazoleo (NBT a 560 nm) y por la producción de ácido úrico (295 nm), respectivamente; para lo que se utilizó un espectrómetro (DU-640 series Beckman) como se describe previamente por Gaona-Gaona *et al.*, 2011. Como estándar se utilizó ácido nordihidroguayaretico (Fontana *et al.*, 2001). Las muestras fueron evaluadas por triplicado y los resultados

se expresan como porcentaje de capacidad de atrapamiento del radical  $O_2^{\cdot-}$  por el EA-LM (40-400  $\mu\text{g}$ ).

#### 4.9.2. Ensayo de atrapamiento del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )

La capacidad del EA-LM para atrapar el radical  $\cdot\text{OH}$  fue evaluada usando el método de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA- $\text{H}_2\text{O}_2$ -desoxirribosa descrito por Floriano-Sanchez *et al.*, 2006; el radical  $\cdot\text{OH}$  fue generado por la reacción entre  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA- $\text{H}_2\text{O}_2$  con ácido tereftálico. La degradación de desoxirribosa causada por la aparición de  $\cdot\text{OH}$  se midió directamente en la fase acuosa mediante la prueba de ácido tiobarbitúrico, la densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro Genesys 8. Como control positivo se utilizó dimetiltiourea (Gaona-Gaona *et al.*, 2011).

#### 4.9.3. Ensayo de atrapamiento del anión peroxinitrilo ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ )

La actividad de atrapamiento de peroxinitrilo fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Floriano-Sanchez *et al.*, 2006. Se realizó el monitoreo de la formación de fluoresceína a partir del diacetato de 2',7'-dicloro dihidro fluoresceína. Como referencia se utilizó penicilamina.

#### 4.9.4. Ensayo de atrapamiento de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

La actividad del EA-LM como atrapador de peróxido de hidrógeno fue evaluada aplicando la metodología descrita por Long *et al.*, 1999, en esta prueba se utiliza el reactivo de FOX (naranja de xilenol (NX), sulfato ferroso de amonio y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la formación del un complejo colorido de  $\text{Fe}^{3+}$ -NX se determina a 560 nm.

#### 4.9.5. Ensayo de atrapamiento de singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ )

La producción de singulete de oxígeno  $^1\text{O}_2$  por hipoclorito de sodio y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue determinado usando un método espectrofotométrico (Medina-Campos *et al.*, 2007). Este ensayo se basa en la disminución de N,N-dimetil-*p*-nitrosoanilina (DMNA) en presencia de  $^1\text{O}_2$ . EL efecto del extracto sobre  $^1\text{O}_2$  fue determinado midiendo la

disminución en la absorbancia de DMNA a 440 nm. Como control positivo se utilizó glutatión.

#### **4.9.6. Ensayo de atrapamiento de ácido hipocloroso (HOCl)**

Para este ensayo se utilizó el método de catalasa. La detección de la señal de catalasa a 404 nm desaparece en presencia de HOCl, indicando la oxidación de la proteína. Los experimentos se realizaron siguiendo la metodología descrita por Aruoma y Halliwell, 1987. Como control positivo se utilizó ácido lipóico.

#### **4.9.7. Ensayo de atrapamiento del radical peroxilo (ROO·)**

Para la determinación del efecto del EA-LM sobre el radical ROO· se utilizó el ensayo fluorométrico ORAC (Huang *et al.*, 2002). En este ensayo se utiliza TROLOX como control positivo y fluoresceína. Para determinar fluorescencia se utiliza una longitud de onda de excitación (485) nm y otra de emisión (520 nm), estos experimentos se realizaron en un lector Synergy HT Multi-Mode (Biotek, Winooski, VA, E. U.).

#### **4.10. Análisis estadístico.**

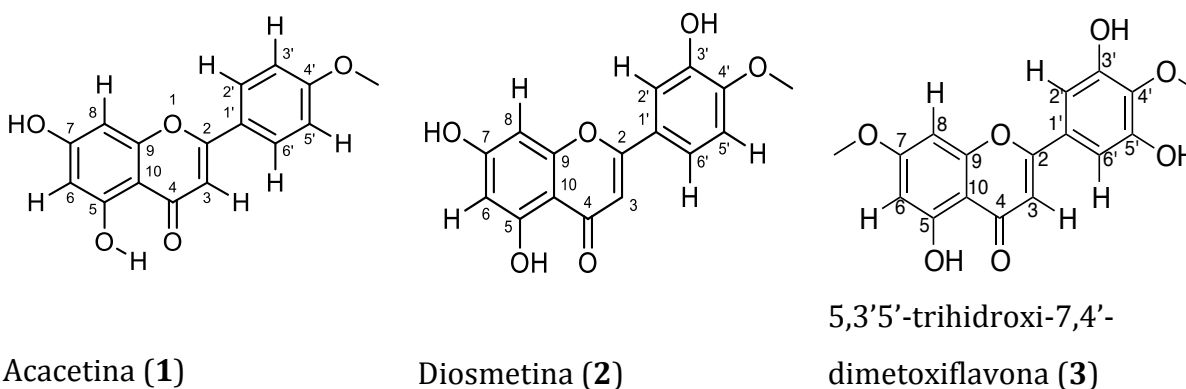
Los resultados de los experimentos de las evaluaciones están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar (EEM). Para determinar diferencias estadísticas significativas entre el control, blanco y los tratamientos ( $p < 0.05$ ), se realizó un ANADEVIA de dos vías seguido de las pruebas estadísticas t-Dunnett o Bonferroni. Para el análisis estadístico fue utilizado el programa estadístico Prisma Graph- Pad versión 4.0.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de garantizar el uso racional de la especie *Anoda cristata* (Malvaceae), la cuál es consumida en México como alimento y para el tratamiento de diversas afecciones, en el presente trabajo se realizaron pruebas de inocuidad y eficacia preclínicas para comprobar los usos medicinales de la planta, asimismo se establecieron algunos parámetros de identidad y las pruebas de composición que permitirán realizar el control de calidad de la droga cruda y sus preparados. Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo se presentan a continuación.

### 5.1. Aislamiento y caracterización de la acetina (1), la diosmetina (2) y la 5,3'5'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (3).

La aplicación de diversos procedimientos fitoquímicos permitió el aislamiento de varias flavonas del extracto acuoso de las partes aéreas de la planta. Estos productos se caracterizaron como la acetina (1) (Wawer & Zielinska, 2001), la diosmetina (2) (Park *et al.*, 2007) y la 5,3'5'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (3) (Güvenalp & Demirezer, 2005) (**Figura 5**); este proceso de caracterización se realizó mediante métodos espectrométricos y espectroscópicos (**Tablas 3-5**) tomando como base la información previamente descrita en la literatura.



**Figura 5.** Estructura de los compuestos aislados de la infusión de *A. cristata*

**Tabla 3.** Datos de RMN del compuesto acacetina

Posición	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), mult ( <i>J</i> en Hz)	HMBC	COSY	NOESY
2	163.7		H-3		
3	103.9	6.84 <i>s</i>			
4	182.2		H-3		
5	161.9		OH-5, H-6		
6	99.4	6.18 <i>d</i> (2.10)	OH-5, H-8	H-8	
7	164.8		H-8, H-6		
8	94.5	6.48 <i>d</i> (2.11)	H-6	H-6	H-6
9	157.8		H-8		
10	104.1		OH-5, H-8, H-6, H-3		
1'	123.3		H-2', H-3		
2'	115.0	7.09 <i>d</i> (9.05)	H-6'	H-3'	H-3, CH <sub>3</sub> O-4'
3'	128.8	8.01 <i>d</i> (9.02)	H-5'	H-2'	H-2'
4'	162.7	--	H-2', H-3', CH <sub>3</sub> O-4'		
5'	128.8	8.01 <i>d</i> (9.02)	H-3'	H-6'	H-6', H-3
6'	115.0	7.09 <i>d</i> (9.05)	H-2'	H-5', H-6	H-3, CH <sub>3</sub> O-4'
CH <sub>3</sub> O-4'	56.0	3.84			
OH-5		12.84			

Como se desprende de la información que se resume en las **Tablas 3 y 4** los compuestos aislados presentaron las características de flavonas 5,7 disustituidas en el anillo A con grupos oxigenados y con diferentes grados de sustitución en el anillo B. En todos los casos los datos concordaron perfectamente con los reportados anteriormente para los tres compuestos.

**Tabla 4.** Datos de los espectros de RMN de la diosmetina

Posición	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), mult ( $J$ en Hz)	HMBC	COSY	NOESY
2	163.9		H-6', H-2', H-3		
3	103.9	6.73 s			H-6', H-2'
4	182.1		H-3		
5	161.9		OH-5, H-6		
6	99.3	6.18 <i>d</i> (2.09)	OH-5, H-8	H-8	
7	164.6		H-8, H-6		
8	94.3	6.45 <i>d</i> (2.11)	H-6	H-6	
9	157.7		H-8		
10	104.1		OH-5, H-3, H-8, H-6		
1'	123.4		H-5', H-3		
2'	113.4	7.41 <i>d</i> (2.30)	H-6'		H-3
3'	147.2		H-2', H-5'		
4'	151.6		CH <sub>3</sub> O-4', H-6', H-2', H-5'		
5'	112.6	7.07 <i>d</i> (8.64)		H-6'	CH <sub>3</sub> O- 4', H-6'
6'	119.1	7.5 <i>dd</i> (2.31, 8.55)	H-2'	H-5'	H-5'
CH <sub>3</sub> O- 4'	56.2	3.85 s			H-5'
OH-5		12.91			

**Tabla 5.** Datos de los compuestos 1-3

Compuesto	Punto de fusión (°C)	UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>
Acacetina (1)	262-265	332, 267	285	283
Diosmetina (2)	256-269	345, 251	301	299
5,3'5'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (3)	281.5-282.5	351, 268, 212	331.0808	329.0665



## **5.2. Establecimiento de pruebas de control de calidad para la droga cruda de *Anoda cristata***

Uno de los principales problemas en el uso de plantas medicinales es la falta de calidad, debida a distintos factores como mala identificación de las especies, etiquetados erróneos, adulteraciones con otras plantas, procesos de cultivo, colecta, manufactura y almacenamiento deficientes, contaminación con fármacos, pesticidas, químicos o microorganismos, etc. Esta carencia de calidad puede ser causante de falta de seguridad y eficacia de los preparados a base de plantas (Street *et al.*, 2008); razón por la cual el control de calidad de plantas medicinales es un requisito indispensable para evitar eventos de toxicidad, falta de eficacia y en el peor de los casos la muerte de quien los consume. En este sentido resulta fundamental asegurar la identificación correcta de las especies a tratar (Niu *et al.*, 2012; Jordan *et al.*, 2010; Street *et al.*, 2008). Entre las principales pruebas para realizar la identificación se encuentran las botánicas o la caracterización morfológica, las técnicas basadas en identificación por códigos genéticos y métodos químicos, éstos últimos contribuyen a la caracterización de materias primas y sus preparados mediante perfiles cromatográficos específicos para cada especie (Pferschy-wenzig & Bauer, 2015; Sudberg *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008).

### **5.2.1. Parámetros de identidad selectos**

Entre las pruebas de identidad que permiten el control de calidad de las drogas crudas, se encuentran las químicas, las cuales contribuyen a la identificación de materias primas y sus preparados mediante perfiles cromatográficos específicos para cada especie. Cabe mencionar que estos métodos son los más utilizados por las Farmacopeas a nivel mundial para el control de calidad de las plantas medicinales de mayor uso (Sudberg *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008).

En este estudio en primer lugar se realizó el análisis del aceite esencial obtenido por hidrodestilación para determinar sus componentes mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). También se

estableció el perfil cromatográfico de una de las fracciones derivadas de la infusión utilizando la CLUE.

### 5.2.1.1. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es uno de los métodos analíticos más utilizados para el control de calidad de aceites esenciales debido a la volatilidad de sus constituyentes (Guenther *et al.*, 1971; Marriott *et al.*, 2001). Esta técnica permite obtener perfiles cromatográficos representativos y característicos de una esencia. Por otra parte, la técnica tiene la ventaja de que puede ser acoplada a la espectrometría de masas, permitiendo así la identificación de los componentes de los aceites por comparación de los espectros obtenidos para cada uno con los de bibliotecas especializadas como la del NIST (National Institute of Standard and Technology) y la información que se describe en la literatura científica, así como por el uso de los índices de retención de los mismos. Con base en estas consideraciones, se utilizó esta técnica para determinar los metabolitos secundarios presentes en la esencia (Pferschy-wenzig & Bauer, 2015).

Del proceso de hidrodestilación de la droga cruda de *A. cristata* se obtuvo un aceite de amarillo claro; el análisis por CG-EM permitió la identificación de 70 metabolitos secundarios (**Figura 6**), que representan aproximadamente el 99.9% del total de la esencia, los resultados se resumen en la **Tabla 6** y se obtuvieron por comparación de los espectros y los índices de retención de Kovats obtenidos para cada uno de los productos con los de bibliotecas especializadas como la del NIST (National Institute of Standard and Technology) y con la información que se describe en la literatura (Adams, 2007).

En el análisis realizado se determinó la presencia en el aceite de un alto porcentaje de 2-metil-1,3-pentadieno (1.27%), 3-metil-3-penten-2-ona (1.75%), terpinen-4-ilo (4.8%), (6Z)-nonen-1-ilo (1.33%), salicilato de metilo (2.69%), 2-metil-5-(1-metilenetil)-2-ciclohexenol (1.06%), limonen-10-ilo (1.26%), 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ilo (2.14%),  $\beta$ ,4-dimetil-3-ciclohexen-1-etanol (5.93%), timol (3.17%), (E,Z)-2,4-decadienal (3.15%), 1-metoxi-4-metil-[2.2.2]bicyclooctano (3.15%), 2,3-dimetilbenzoato de metilo (2.25%), (E,E)-2,4-decadienal (4.41%), *cis*-2,3-dihidro-1H-

indene-1,2-diol (5.5%), 4-(2,6,6-trimetilciclohexa-1,3-dienil)-3-buten-2-ona (3.13%), *cis*-mirtanilisobutirato (1.93%), 3-ciclopentilpropanoato de 3-metil-2-butenilo (2.55%), (*E*)-liratilpropanoato (2.96%),  $\beta$ -acorenol (1.44), 2-heptenoato de 3-buten-2-ilo (1.81%), hexahidrofarnesil acetona (1.32%), metil *n*-hexadecenil cetona (8.29%), dietilmalonoato de 2-etilfenil pentilo (7.45%), (*Z-Z*)-6,9-eicosadien-11-ol (1.97%) y 8-decil-hexadecano (2.6%), el resto de los compuestos identificados presentan un porcentaje menor a 1%; las estructuras de los componentes mayoritarios se presentan en el **Cuadro 2**.

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *A. cristata* obtenido por hidrodestilación.

Pico	#	Compuesto	% área	I.R. e	I.R.t	Método de identificación
1	4	ciclohexanona	0.34	916	895	a, b
2	5	<i>o</i> -xileno	0.39	924	898	a, b
3	6	2-metil-1,3-pentadieno	1.27	942	---	b
4	7	3,5-octadieno	0.58	956	*972	a, b
5	8	3-heptenol	0.13	961	*959	a, b
6	9	3-metil-3-penten-2-ona	1.75	970	*902	a, b
7	10	<i>trans</i> -ocimeno	0.07	1051	---	b
8	11	dietilmaleato	0.06	1065	*1081	a, b
9	12	butilpentanoato	0.34	1093	1093	a, b
10	13	( <i>E</i> )-3-nonenal	0.26	1110	---	b
11	14	3-metil-3-buten-1-ol-3-metilbutanoato	0.62	1125	1116	a, b
12	15	4-metil-2-heptin-4-ol	0.29	1135	---	a, b
13	16	2-etil-ciclohexanona	0.49	1156	1158	a, b
14	17	<i>trans</i> -7-[4.3.0]oxabicyclononano	0.26	1161	---	b
15	18	( <i>Z</i> )-etil-4-octenoato	0.09	1166	1187	a, b
16	19	terpinen-4-ol	4.80	1183	1180	a, b

(#: Número con el que es representado cada compuesto en el texto.

(---) Compuesto no identificado en librerías electrónicas de acuerdo a su índice de Kovats

I.R. e: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5

I.R.t: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5; \* en columna 5% PDMS

a: índice de retención; b: espectros de masas)

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *A. cristata* obtenido por hidrodestilación (Continuación).

Pico	#	Compuesto	% área	I.R. e	I.R.t	Método de identificación
17	<b>20</b>	(6Z)-nonen-1-ilo	1.33	1185	1171	a, b
18	<b>21</b>	salicilato de metilo	2.69	1191	1198	a, b
19	<b>22</b>	desconocido	0.02	1212	---	b
20	<b>23</b>	(E,E)-2,4-nonadienal	0.04	1222	1210	a, b
21	<b>24</b>	2-metil-5-(1-metilenetil)-2-ciclohexenol	1.06	1227	1229	a, b
22	<b>25</b>	limonen-10-ilo	1.26	1238	1239	a, b
23	<b>26</b>	3,4-dimetoxitolueno	0.69	1244	1230	a, b
24	<b>27</b>	2-isopropiliden-3-metil-2-ciclopenten-4-ilo	0.82	1251	1220	a, b
25	<b>28</b>	metil citronelato	0.08	1264	1261	a, b
26	<b>29</b>	3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ilo	2.14	1271	1260	a, b
27	<b>30</b>	1-(2-aminofenil)-etanona	0.81	1277	1302	a, b
28	<b>31</b>	3-benzoilamino-N-(2-feniletíl)-propanamida	0.28	1280	---	b
29	<b>32</b>	(Z)-4-decen-1-ilo	0.20	1281	1257	a, b
30	<b>33</b>	$\beta$ ,4-dimetil-3-ciclohexen-1-etanol	5.93	1292	*1295	a, b
31	<b>34</b>	timol	3.17	1301	1292	a, b
32	<b>35</b>	(E,Z)-2,4-decadienal	3.15	1302	1299	a, b
33	<b>36</b>	1-metoxi-4-metil-[2.2.2]bicyclooctano	3.15	1305	1341	a, b
34	<b>37</b>	2,3-dimetilbenzoato de metilo	2.25	1310	1314	a, b
35	<b>38</b>	(E,E)-2,4-decadienal	4.41	1311	1313	a, b
36	<b>39</b>	2,5-undecadienal	0.69	1345	1352	a, b
37	<b>40</b>	1-etoxi-4-metoxibenceno	0.69	1346	---	b
38	<b>41</b>	(E)-undecen-2-en-1-ilo	0.12	1367	1367	a, b
39	<b>42</b>	2-dodecanona	0.61	1387	1391	a, b

(#: Número con el que es representado cada compuesto en el texto.

(---) Compuesto no identificado en librerías electrónicas de acuerdo a su índice de Kovats

I.R. e: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5

I.R.t: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5; \* en columna 5% PDMS

a: índice de retención; b: espectros de masas)

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *A. cristata* obtenido por hidrodestilación (Continuación).

Pico	#	Compuesto	% área	I.R. e	I.R.t	Método de identificación
40	<b>43</b>	isobornilpropionato	0.04	1398	1388	a, b
41	<b>44</b>	3,5-dimetil-1-hexin-3-ilo	0.16	1417	*1414	a, b
42	<b>45</b>	4-butilfenol	0.65	1420	1386	a, b
43	<b>46</b>	<i>cis</i> -2,3-dihidro-1 <i>H</i> -indene-1,2-diol	5.50	1439	---	b
44	<b>47</b>	4-(2,6,6-trimetilciclohexa-1,3-dienil)-3-buten-2-ona	3.13	1477	*1485	a, b
45	<b>48</b>	4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona	0.24	1492	1496	a, b
46	<b>49</b>	2-tridecanona	0.73	1495	1494	a, b
47	<b>50</b>	heptanofenona	0.73	1512	*1538	a, b
48	<b>51</b>	<i>o</i> -hidroxibifenilo	0.73	1514	*1507	a, b
49	<b>52</b>	6( <i>E</i> )-megastigma-8( <i>Z</i> )-dien-4-ona	0.73	1516	1516	a, b
50	<b>53</b>	(1 <i>S-cis</i> -)-1,2,3,5,8 <i>a</i> -hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	0.68	1522	1524	a, b
51	<b>54</b>	6( <i>E</i> )-megastigma-8( <i>E</i> )-dien-4-ona	0.68	1523	1521	a, b
52	<b>55</b>	hidrato de <i>cis</i> -sesquisabineno	0.68	1526	1530	a, b
53	<b>56</b>	<i>cis</i> -mirtanilisobutirato	1.93	1545	1524	a, b
54	<b>57</b>	4-etenil- $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-(1-metiletenil)-[1 <i>R</i> -(1 $\alpha,3\alpha,4\beta$ )]-ciclohexanmetanol	0.84	1564	1562	a, b
55	<b>58</b>	3-ciclopentilpropionato de 3-metil-2-butenilo	2.55	1582	*1549	a, b
56	<b>59</b>	( <i>E</i> )-liratilpropanoato	2.96	1586	1583	a, b
57	<b>60</b>	$\beta$ -acorenol	1.44	1639	1637	a, b
58	<b>61</b>	cariofilenol II	0.95	1667	1661	a, b
59	<b>62</b>	2-heptenoato de 3-butin-2-ilo	1.81	1670	*1688	a, b
60	<b>63</b>	5-neo-cedranol	0.74	1678	1677	a, b

(#: Número con el que es representado cada compuesto en el texto.

(---) Compuesto no identificado en librerías electrónicas de acuerdo a su índice de Kovats

I.R. e: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5

I.R.t: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5; \* en columna 5% PDMS

*a*: índice de retención; *b*: espectros de masas)

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *A. cristata* obtenido por hidrodestilación (Continuación).

Pico	#	Compuesto	% área	I.R. e	I.R.t	Método de identificación
61	<b>64</b>	Z- $\alpha$ -trans-bergamotol	0.53	1699	1697	a, b
62	<b>65</b>	ciclohexancarboxiloato de octilo	0.84	1726	1709	a, b
63	<b>66</b>	hexahidrofarnesil acetona	1.32	1834	1843	a, b
64	<b>67</b>	metil <i>n</i> -hexadecenil cetona	8.29	1966	2004	a, b
65	<b>68</b>	succiniato de isobutil 4-metilbencilo	0.27	2000	*2006	a, b
66	<b>69</b>	( <i>E</i> )-14-hexadecenil acetato	0.98	2019	2018	a, b
67	<b>70</b>	2-heptenoato de undecenilo	0.51	2050	*2052	a, b
68	<b>71</b>	dietilmalonoato de 2-etilfenil pentilo	7.45	2113	*2113	a, b
69	<b>72</b>	( <i>Z-Z</i> )-6,9-eicosadien-11-ilo	1.97	2252	2240	a, b
70	<b>73</b>	8-decil-hexadecano	2.60	2433	---	a, b

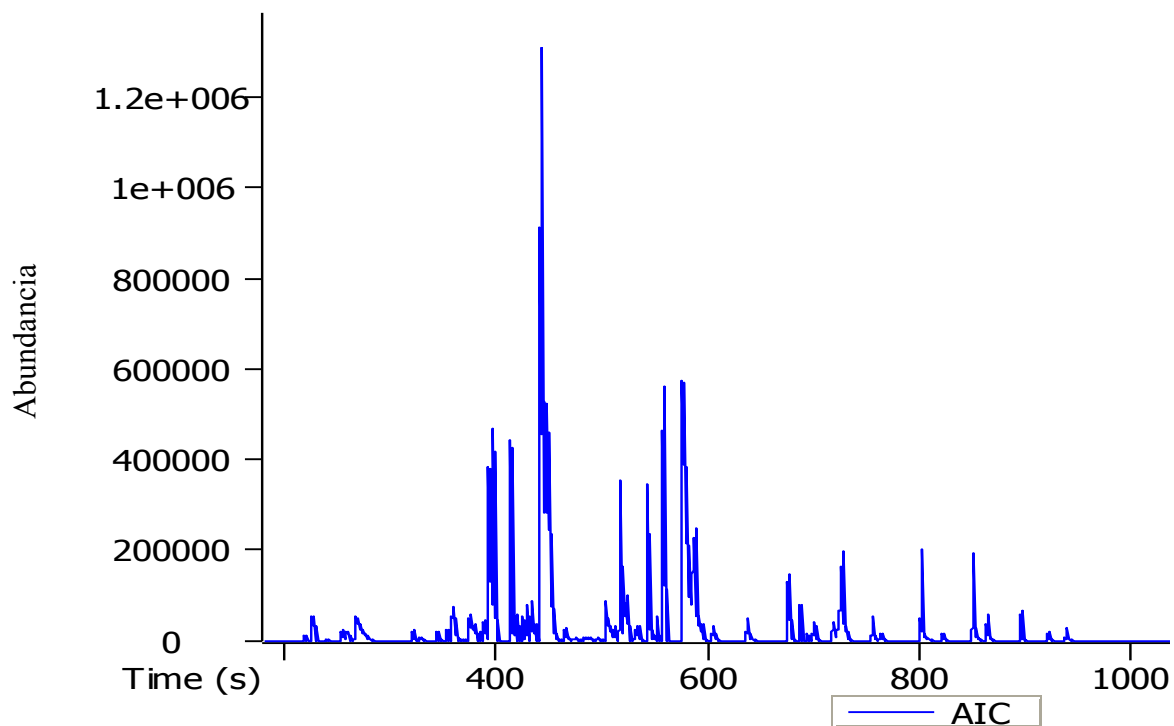
(#: Número con el que es representado cada compuesto en el texto.

(---) Compuesto no identificado en librerías electrónicas de acuerdo a su índice de Kovats

I.R. e: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5

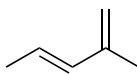
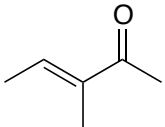
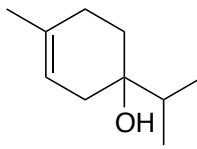
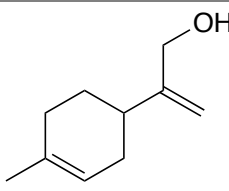
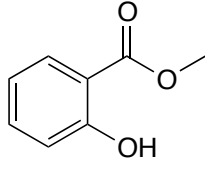
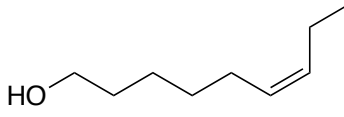
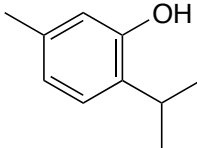
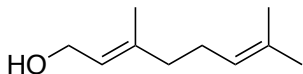
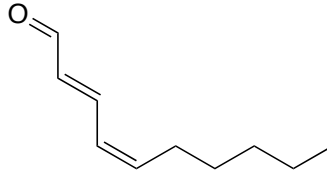
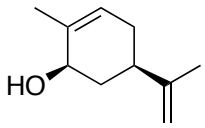
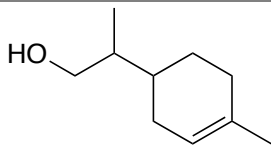
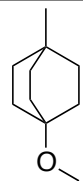
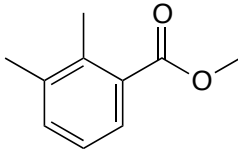
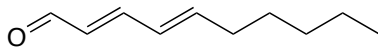
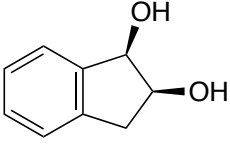
I.R.t: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5; \* en columna 5% PDMS

a: índice de retención; b: espectros de masas)

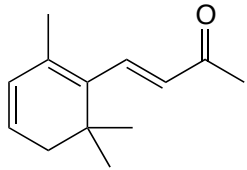
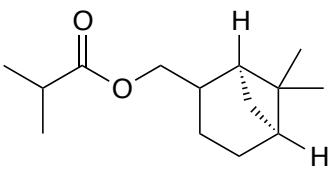
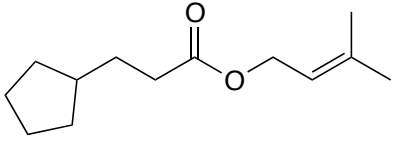
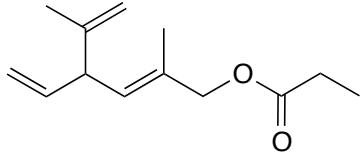
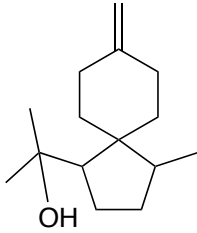
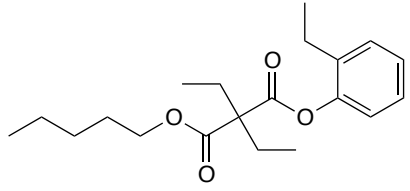
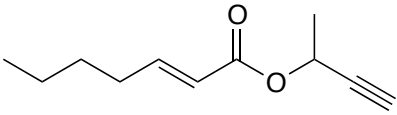
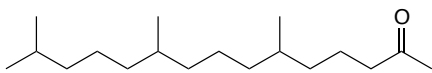
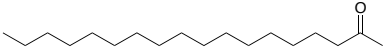
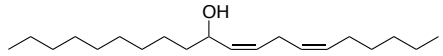
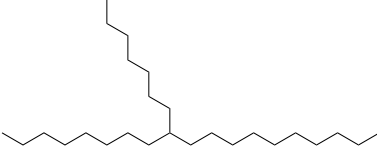


**Figura 6.** Cromatograma del aceite esencial de *Anoda cristata*

**Cuadro 2.** Compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *A. cristata* obtenido por hidrodestilación

 <p>2-metil-1,3-pentadieno (6)</p>	 <p>3-metil-3-penten-2-ona (9)</p>	 <p>terpinen-4-ilo (19)</p>
 <p>limonen-10-ilo (10)</p>	 <p>salicilato de metilo (21)</p>	 <p>(6Z)-nonen-1-ilo (20)</p>
 <p>timol (34)</p>	 <p>3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ilo (29)</p>	 <p>(E,Z)-2,4-decadienal (35)</p>
 <p>2-metil-5-(1-metilenetil)-2-ciclohexenol (24)</p>	 <p><math>\beta</math>,4-dimetil-3-ciclohexen-1-etanol (33)</p>	
 <p>1-metoxi-4-metil-[2.2.2]biciclooctano (36)</p>	 <p>2,3-dimetilbenzoato de metilo (37)</p>	
 <p>(E,E)-2,4-decadienal (38)</p>	 <p>cis-2,3-dihidro-1H-indene-1,2-diol (46)</p>	

**Cuadro 2.** Compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *A. cristata* obtenido por hidrodestilación (Continuación).

 <p>4-(2,6,6-trimetilciclohexa-1,3-dienil)-3-buten-2-ona (<b>47</b>)</p>	 <p><i>cis</i>-mirtanilisobutirato (<b>56</b>)</p>
 <p>3-ciclopentilpropionato de 3-metil-2-butenilo (<b>58</b>)</p>	 <p>(<i>E</i>)-liratilpropanoato (<b>59</b>)</p>
 <p><math>\beta</math>-acorenol (<b>60</b>)</p>	 <p>dietilmalonoato de 2-etilfenil pentilo (<b>71</b>)</p>
 <p>3-butin-2-iléster de ácido 2-heptenóico (<b>62</b>)</p>	 <p>hexahidrofarnesil acetona (<b>66</b>)</p>
 <p>metil <i>n</i>-hexadecenil cetona (<b>67</b>)</p>	 <p>(<i>Z-Z</i>)-6,9-eicosadien-11-ilo (<b>72</b>)</p>
 <p>8-decil-hexadecano (<b>73</b>)</p>	



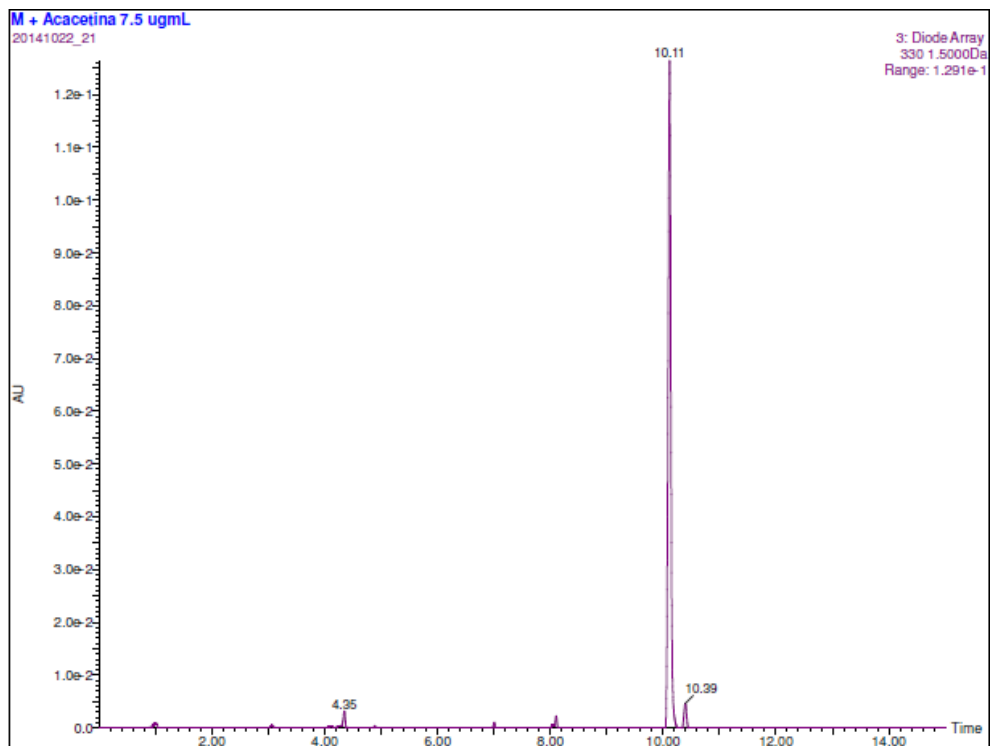
Los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *A. cristata* tienen efectos biológicos que podrían contribuir a las propiedades benéficas de la especie. El terpinen-4-ilo (**19**) es antiespasmódico, inmunomodulador y antibacteriano (Sadraei *et al.*, 2015; Nogueira *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). De acuerdo con Chauhan y Kang (2015) el timol (**34**) posee propiedades que le permiten proteger a la mucosa gástrica de los daños causados por etanol en ratas (Chauhan & Kang, 2015); también está reportado como antiinflamatorio, anticancerígeno, antioxidante y antimicrobiano.

#### 5.2.1.2. Establecimiento del perfil cromatográfico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (CLUE-EM)

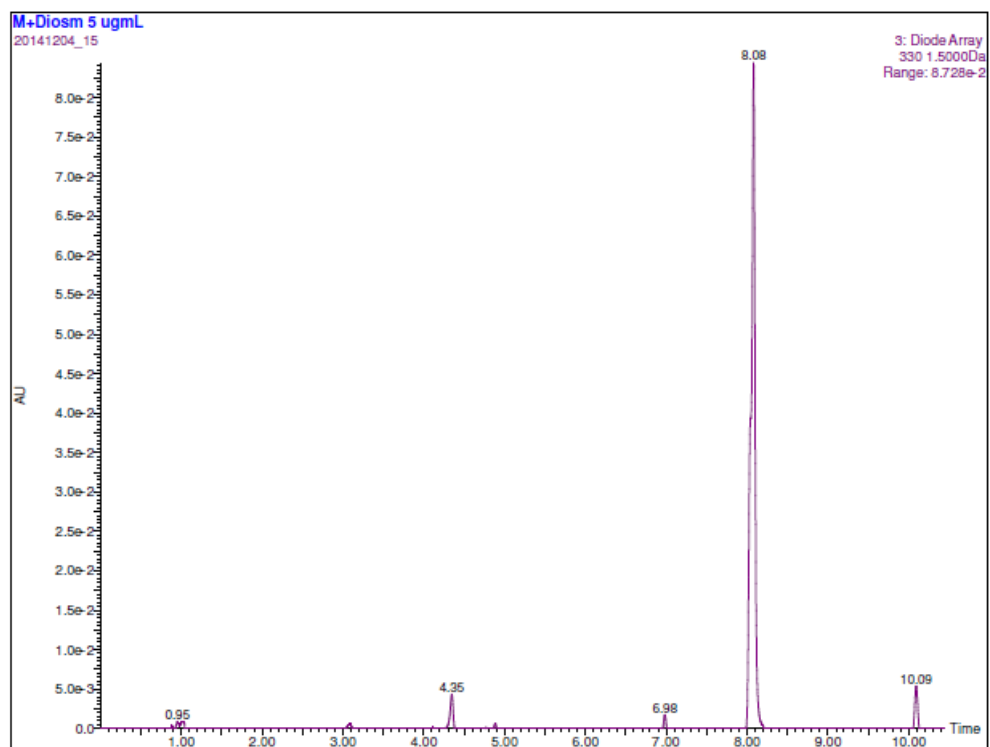
Una de las características de los extractos de plantas medicinales es la complejidad química que presentan, representando esto un importante reto para su análisis; con la finalidad de solucionar este problema se aplican diversas técnicas con las que es posible obtener una buena separación, entre las más utilizadas se encuentra la CLUE que tiene la ventaja de minimizar los tiempos de análisis. Mediante este proceso se pueden determinar huellas digitales de extractos de complejidad variada. Las huellas digitales obtenidas por CLUE constituyen uno de los métodos más efectivos para prevenir sustituciones y adulteraciones (Xie *et al.*, 2007).

Para el desarrollo de huellas digitales es necesaria la elección de los compuestos marcadores, en este caso se seleccionaron las flavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) ya que se obtuvieron en buenas cantidades y se encuentran disponibles comercialmente. También es necesario desarrollar las mejores condiciones. Así, tras ensayar diferentes tipos de fases estacionarias y móviles las mejores condiciones se obtuvieron mediante una columna de fase reversa BEH Shield RP18, un gradiente de elución de tipo lineal utilizando una mezcla de elución de ACN-H<sub>2</sub>O+0.1% de ácido fórmico y una velocidad de flujo de 0.3 mL/min.

Una vez que se generó el perfil más adecuado se determinó la presencia de las flavonas **1** y **2** por la técnica de coelución. En ambos casos la coelución produjo un incremento en las áreas bajo la curva de los picos correspondientes a cada compuesto. Los cromatogramas obtenidos se presentan en las **Figuras 7 y 8**.



**Figura 7.** Cromatograma de la coelución del EO-In y el compuesto acacetina (1)



**Figura 8.** Cromatograma de la coelución del EO-In y el compuesto diosmetina (2)

### 5.2.2. Validación de un método analítico (CLUE-EM) para cuantificar las flavonas diosmetina y acacetina en la droga cruda de *A. cristata*

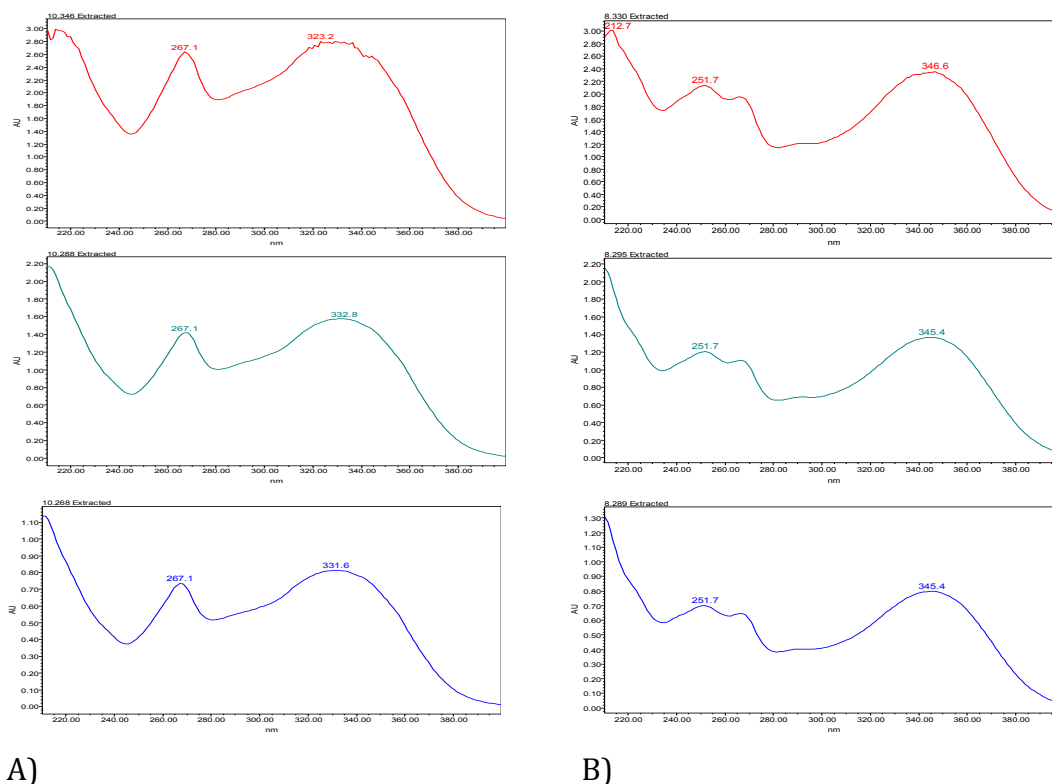
De acuerdo a la AOAC Internacional (association of analytical communities), la validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual queda establecido, en forma experimental, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende. En este caso la validación de un método analítico por CLUE-EM se orientó a la cuantificación simultánea de la diosmetina (**2**) y acacetina (**1**) en la fracción orgánica de la infusión (EO-In) preparada a partir de la droga cruda de *A. cristata*.

La validación de un método de análisis cuantitativo se realiza evaluando una serie de características que incluyen la selectividad, linealidad del sistema, estabilidad, exactitud, precisión, y el límites de cuantificación y reproducibilidad (Spínola *et al.*, 2014) de acuerdo a los parámetros establecidos en la Guías de Validación publicadas por la FDA [ICH Q2 (R1), 2005].

#### 5.2.2.1. Selectividad

Un método selectivo es el que tiene la capacidad de proporcionar una respuesta atribuible únicamente al analito de interés aún en la presencia de otros componentes de la muestra (Spínola *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2014; ICH Q2 (R1), 2005). La selectividad se evaluó mediante el registro de los espectros de UV de las muestras de cada uno de los estándares (**1** y **2**), la matriz de trabajo (EO-In) y la matriz enriquecida con los estándares.

Los resultados obtenidos (**Figura 9**) permiten establecer que los máximos de absorción de los espectros obtenidos al 100% de altura de cada pico son los mismos, garantizando la pureza del pico en todas las muestras; la adición del estándar a la matriz de trabajo, produjo un incremento en la respuesta analítica de igual manera sin modificar los máximos de absorción. Estos resultados nos indican que la respuesta analítica observada se debe únicamente a la presencia de acacetina (**1**) y diosmetina (**2**).



A)

B)

**Figura 9.** Espectros de UV de la respuesta analítica observada para los compuestos A) acetina y B) diosmetina

### 5.2.2.2. Linealidad del sistema

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra; esto dentro de un rango dado, es decir en un intervalo de concentraciones de analito en la muestra para las que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad (Spínola *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2014).

Para comprobar la linealidad de la curva de calibración del método se obtienen los coeficientes de correlación (R) y de determinación ( $R^2$ ). La adecuación de la curva de calibración debe ser confirmada por pruebas estadísticas como ANOVA y prueba de F (Spínola *et al.*, 2014; ICH Q2 (R1), 2005).

La linealidad del sistema se evaluó, construyendo una curva de calibración para cada estándar con diferentes niveles de concentración de acetina (1) y diosmetina (2). Los compuestos utilizados como referencia tienen una pureza mayor a 95%. Los resultados para las curvas de calibración se muestran en la **Tabla 7** y en las **Figuras**

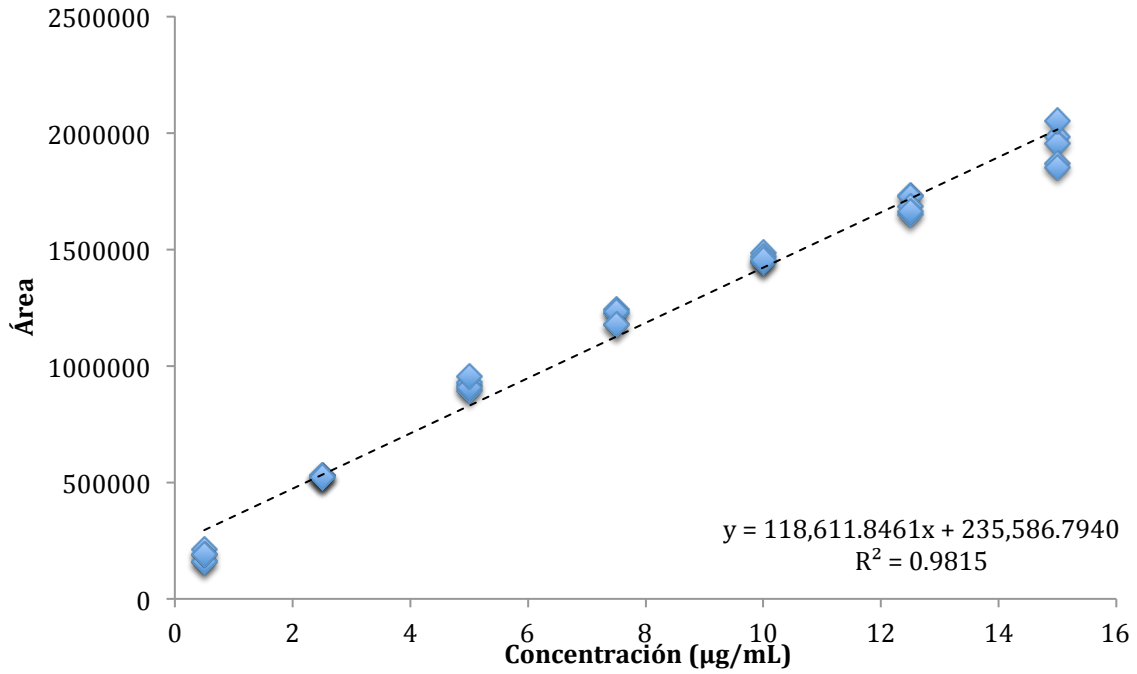
**10 y 11** se presentan las gráficas para cada curva. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión simple, permitiendo establecer la linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones analizadas; los parámetros estadísticos calculados se presentan en la **Tabla 8**.

**Tabla 7.** Resultados experimentales de la curva de calibración de los compuestos **1** y **2**

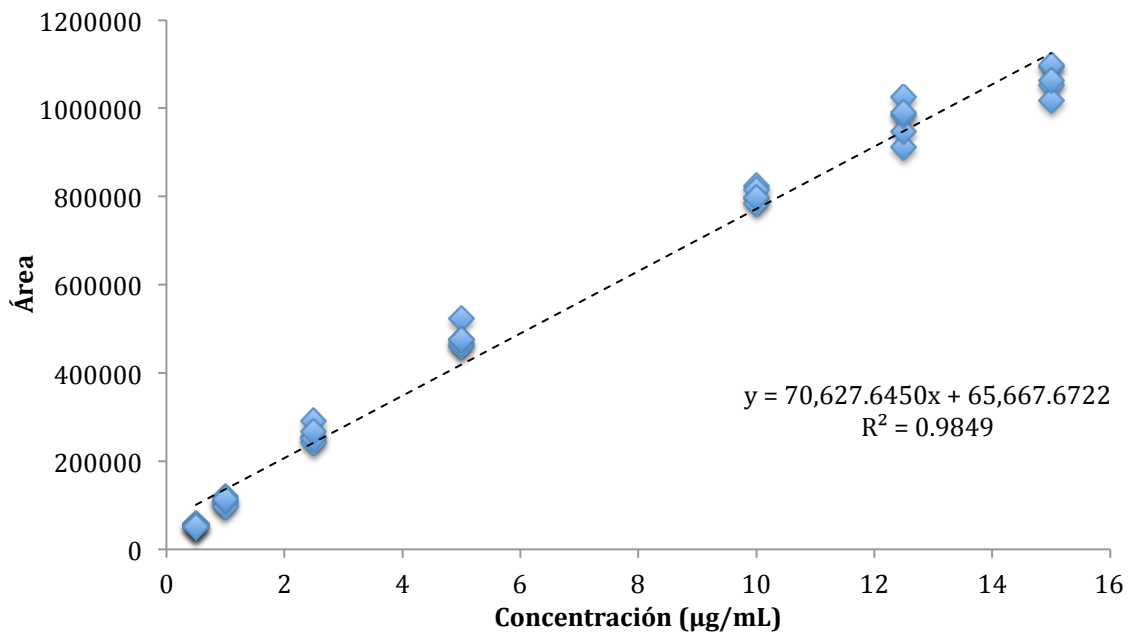
Réplica	1		2	
	µg/mL	ABC	µg/mL	ABC
1	0.5	159588	0.5	55280
2	0.5	161061	0.5	58749
3	0.5	211874	0.5	48037
4	0.5	190946	0.5	55162
5	0.5	190296	0.5	51809
1	2.5	526822	1	119275
2	2.5	529457	1	106103
3	2.5	528993	1	96507
4	2.5	522486	1	109057
5	2.5	523692	1	113734
1	5	916299	2.5	291644
2	5	931360	2.5	256146
3	5	894740	2.5	241475
4	5	909617	2.5	251225
5	5	953905	2.5	266979

**Tabla 7.** Resultados experimentales de la curva de calibración de los compuestos **1** y **2** (Continuación)

Réplica	1		2	
	µg/mL	ABC	µg/mL	ABC
1	7.5	1244151	5	522531
2	7.5	1225255	5	459511
3	7.5	1176869	5	466947
4	7.5	1235781	5	475374
5	7.5	1177264	5	474858
1	10	1445137	10	824133
2	10	1485362	10	795490
3	10	1446162	10	784506
4	10	1468558	10	816979
5	10	1454109	10	797669
1	12.5	1731108	12.5	1025076
2	12.5	1728038	12.5	911736
3	12.5	1651058	12.5	946874
4	12.5	1681622	12.5	982952
5	12.5	1664368	12.5	989756
1	15	1981886	15	1092788
2	15	1954999	15	1053017
3	15	1869296	15	1018457
4	15	1854184	15	1097193
5	15	2051334	15	1062267



**Figura 10.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema de la acetina (1)



**Figura 11.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema de la diosmetina (2)

**Tabla 8.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

Estadístico	1	2
Pendiente ( $b_1$ )	118682.6	70627.6
Ordenada al origen ( $b_0$ )	235051.0	65667.7
Coefficiente de correlación ( $R$ )	0.9910	0.9924
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.9821	0.9849
Intervalo de confianza para la pendiente [ $IC(\beta_1)$ ]	113046.9-124318.3	67553.9-73701.4
$t_{0.95, 35}$	2.021	2.021

Para evaluar si las ecuaciones de regresión obtenidas describen satisfactoriamente la relación entre la concentración de los compuestos (**1** y **2**) y la respuesta analítica, se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal. El resultado de tal análisis indicó que los estadísticos de Fisher (F) calculados **1** (1811.36) y **2** (2156.42) son distintos al crítico [ $F_{0.05,1,35}=4.085$ ]. Entonces se puede concluir que la variación en la respuesta analítica, para cada compuesto, se encuentra explicada por el modelo propuesto, el cual es lineal en el intervalo de concentraciones ensayadas (Araujo, 2009).

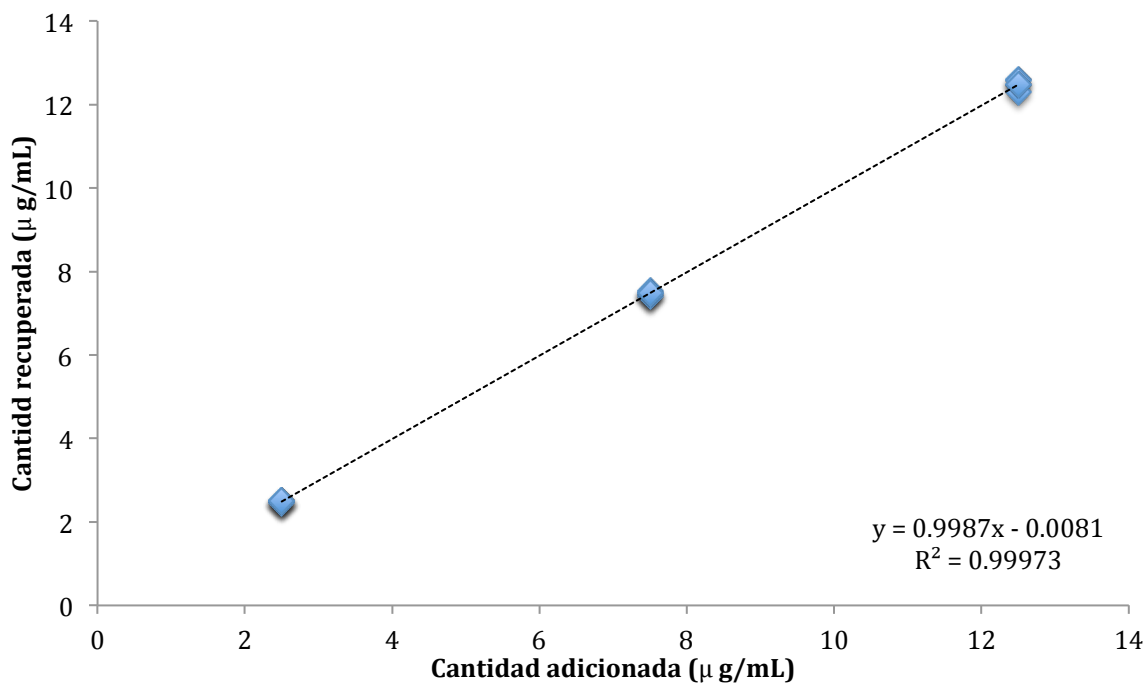
### 5.2.2.3. Linealidad del método y exactitud

Con la finalidad de evaluar si el método analítico propuesto es lineal para el rango de concentraciones establecido, se cuantificó el porcentaje de recobro de los analitos **1** y **2**. Para ello se construyeron curvas de calibración a partir de disoluciones de la matriz enriquecidas con una muestra de referencia utilizando tres niveles de concentración. Las cantidades adicionadas a la matriz en el caso del compuesto **1** fueron 2.5, 7.5 y 12.5  $\mu\text{g/mL}$  y para el compuesto **2**, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . En las **Tablas 9** y **10** se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto; el ajuste de datos se realizó mediante regresión lineal simple. Las **Figuras 12** y **13** corresponden a las gráficas de linealidad del método y los parámetros estadísticos calculados se presentan en la **Tabla 11**.



**Tabla 9.** Resultados de la linealidad del método de acetina: cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área	Cantidad recuperada (µg/mL)	% recobro
1	12.5	1729514	12.59	100.7
2	12.5	1727172	12.57	100.6
3	12.5	1694674	12.30	98.4
4	12.5	1714501	12.47	99.7
5	12.5	1716295	12.48	99.8
6	7.5	1112964	7.40	98.6
7	7.5	1123708	7.49	99.8
8	7.5	1119518	7.45	99.4
9	7.5	1129251	7.53	100.5
10	7.5	1122671	7.48	99.7
11	2.5	531277	2.49	99.8
12	2.5	533116	2.51	100.5
13	2.5	532447	2.51	100.2
14	2.5	526611	2.46	98.3
15	2.5	532230	2.51	100.2



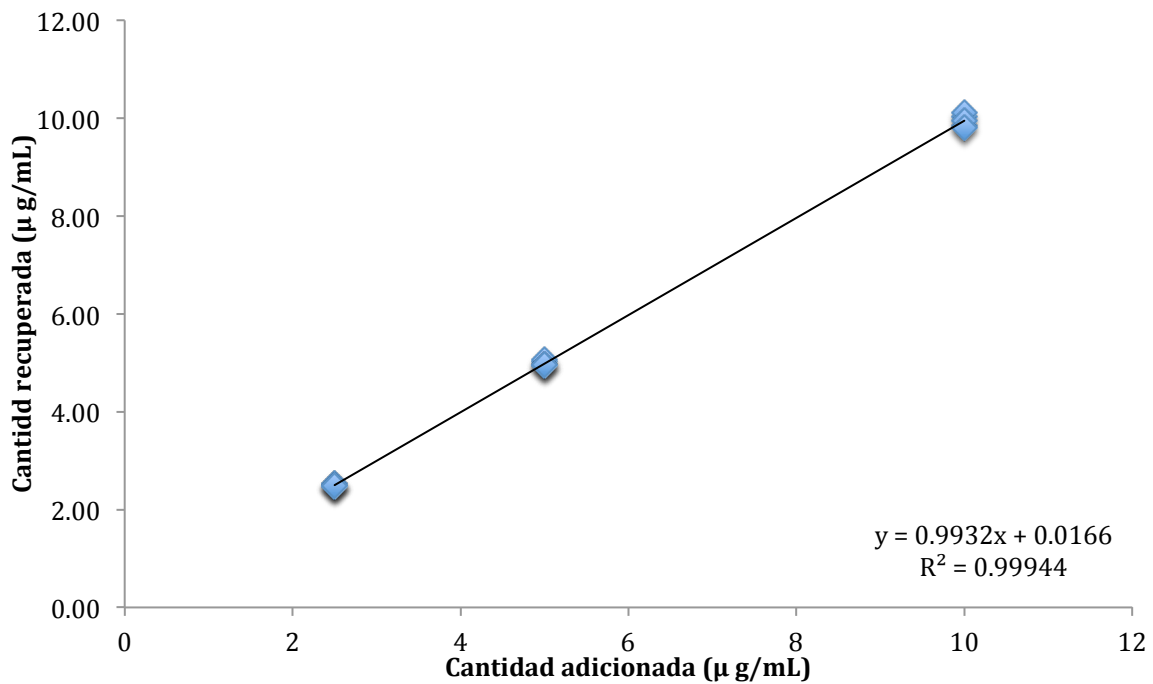
**Figura 12.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método para el compuesto acetina

**Tabla 10.** Resultados de la linealidad del método de diosmetina: cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área	Cantidad recuperada (µg/mL)	% recobro
1	10	773697	10.02	101.2
2	10	761038	9.84	98.9
3	10	779824	10.11	99.6
4	10	768663	9.95	100.4
5	10	758498	9.81	99.8
6	5	420084	5.02	99.0
7	5	424101	4.93	99.8
8	5	424025	5.07	100.9
9	5	415593	4.96	99.0

**Tabla 10.** Resultados de la linealidad del método de diosmetina: cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel (Continuación)

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área	Cantidad recuperada (µg/mL)	% recobro
10	5	415049	4.95	98.2
11	2.5	239852	2.47	99.7
12	2.5	241229	2.49	101.0
13	2.5	244096	2.53	100.1
14	2.5	244471	2.53	98.1
15	2.5	240611	2.48	101.7



**Figura 13.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método para el compuesto diosmetina

**Tabla 11.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método

Estadístico	1	2
Pendiente ( $b_1$ )	0.9987	0.9932
Ordenada al origen ( $b_0$ )	-0.0080	0.0166
Coefficiente de correlación ( $R$ )	0.9999	0.9997
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.9997	0.9994
Intervalo de confianza para la pendiente [ $IC(\beta_1)$ ]	0.9889 - 1.0085	0.9792-1.0073
Intervalo de confianza para la ordenada [ $IC(\beta_0)$ ]	-0.0305 - 0.0143	-0.0091-0.0422
$t_{0.95, 13}$	2.16	2.16
Coefficiente de variación de regresión del recobro $CV_{y/x}$	0.96 %	1.35

El método analítico propuesto cumple con los criterios de aceptación establecidos en las guías normativas seleccionadas para este estudio, por lo que se puede concluir que el método analítico es lineal (ICH Q2 (R1), 2005).

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia (Spínola *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2014). Este parámetro de calidad se estableció mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en las **Tablas 9 y 10**. Los resultados obtenidos para ambos compuestos se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%), el intervalo calculado para el compuesto **1** fue de 98.3-100.7% y para el **2** de 98.1-101.7%, por lo que el método es exacto para el intervalo de concentraciones ensayadas.

#### 5.2.2.4. Precisión del método

La precisión de un procedimiento analítico se refiere a la concordancia entre una serie de medidas individuales obtenidas de una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión se debe calcular considerando la dispersión de

los datos individuales con respecto a la media y se expresa como desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

La precisión se determinó en términos de repetitividad y precisión intermedia. La repetitividad es la medida de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis (Spínola *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2014; ICH Q2 (R1), 2005).

La repetitividad y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de siete réplicas a una concentración definida. El análisis se efectuó en dos días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos **Tablas 12 y 13** se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

**Tabla 12.** Resultados experimentales de repetibilidad

Solución	1		2	
	Concentración (µg/mL)	Área	Concentración (µg/mL)	Área
1	7.5	1139272	5	423858
2	7.5	1121301	5	418416
3	7.5	1133581	5	419142
4	7.5	1114361	5	420082
5	7.5	1116457	5	416206
6	7.5	1129833	5	423897
7	7.5	1137877	7	412259
Promedio		1127526		419123.1905
Desviación estándar (S)		10179.12572		4128.247749
Coeficiente de variación (%CV)		0.90278439		0.9849724

**Tabla 13.** Resultados experimentales de precisión intermedia

Solución	1 (7.5 µg/mL)		2 (5 µg/mL)		
	Analista 1 Área	Analista 2 Área	Analista 1 Área	Analista 2 Área	
Día 1	1	1120519.00	1131444.29	423621.17	414476.50
	2	1132319.00	1124002.29	420061.17	410780.50
	3	1130166.00	1124508.29	412945.17	411757.50
	4	1112111.00	1124476.29	413546.17	417872.50
	5	1120460.00	1129972.29	421038.17	412054.50
	6	1128103.00	1129514.29	424080.17	423462.50
	7	1123528.00	1134824.29	415752.17	420946.50
	8	1108949.00	1133016.29	411833.17	416303.50
Día 2	9	1112486.00	1126406.29	416871.17	422673.50
	10	1116560.00	1137014.29	413079.17	420388.50
	11	1122748.00	1126786.29	418479.17	412725.50
	12	1122785.00	1136174.29	418272.17	414084.50
	13	1133961.00	1118233.29	418615.17	417741.50
	14	1128995.00	1123278.29	412580.17	423935.50
	15	1112243.00	1113681.29	414362.17	424196.50
	16	1115125.00	1125918.29	411785.17	414095.50
Promedio		1124384.64		417013.02	
Desviación estándar (S)		7703.62		4350.20	
Coeficiente de variación (%CV)		0.69		1.04	

El coeficiente de variación obtenido es menor a 2% en todos los casos, por lo que se estableció la precisión del método.

### 5.2.2.5. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

El límite de detección (LD) de un método está definido como la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente

cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se refiere a la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (Spínola *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2014). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de las rectas de calibración del inciso 5.2.2.2. En la **Tabla 14** se muestran los resultados del análisis y los límites calculados empleando las expresiones dadas en el desarrollo experimental.

**Tabla 14.** Determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Compuesto	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>1</b>	0.53	1.16
<b>2</b>	0.37	1.12

#### 5.2.2.6. Estabilidad

El objetivo de los estudios de estabilidad, es reportar como la concentración de una muestra varía con el tiempo, bajo influencia de la temperatura de almacenaje y condiciones químicas. Esta concentración debe ser constante.

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis del contenido de cada uno en las muestras preparadas a una concentración de 10 y 5  $\mu\text{g/mL}$ , para los compuestos **1** y **2** respectivamente, y sometidas a condiciones de refrigeración, temperatura ambiente, hidrólisis ácida y básica. Los resultados se expresan como la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial  $|d_i|$ . Los valores obtenidos se muestran en la

**Tabla 15.**

**Tabla 15.** Estabilidad de los estándares bajo diferentes condiciones

Condición	1 $ d_i $	2 $ d_i $
<b>Temperatura ambiente</b>	1.23	1.08
<b>Refrigeración</b>	1.41	1.85
<b>Hidrólisis ácida</b>	0.70	3.88
<b>Hidrólisis básica</b>	0.74	ND

Los estudios de estabilidad del estándar acacetina realizados indican que el compuesto es estable en todas las condiciones evaluadas cumpliendo con la condición de que la diferencia de la media aritmética entre la concentración inicial y final del analito es menor a 2% (**Tabla 15**). Para la diosmetina se observó una variación en la concentración bajo la influencia de condiciones de hidrólisis ácida e hidrólisis básica. Evidencia de ello fue la disminución o pérdida del área bajo la curva correspondiente al producto en ambas condiciones de hidrólisis.

#### 5.2.2.7. Cuantificación de los compuestos 1 y 2 presentes en el EO-In de diferentes colectas de droga cruda de *A. cristata*

Una vez validado el método analítico se cuantificaron ambos compuestos en distintas muestras preparadas de forma independiente con una concentración de 1 mg/mL de EO-In de *A. cristata*. Se emplearon las ecuaciones de la recta descritas para la linealidad del sistema, **1** ( $y = 118682.6x + 235051.0$ ) y **2** ( $y = 70627.6x + 65667.7$ ). En la **Tabla 16** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 16.** Cuantificación de los metabolitos presentes en muestras de *A. cristata*

Muestra	Colecta	1 (mg/100g)	2 (mg/100g)
<b>I</b>	<b>Noviembre</b>	13.15 ± 1.93	24.07 ± 1.93
<b>II</b>	<b>Julio</b>	12.19 ± 0.81	12.63 ± 0.86
<b>III</b>	<b>Octubre</b>	7.33 ± 2.10	11.34 ± 1.45
<b>IV</b>	<b>CU, D.F.</b>	2.61 ± 0.37	5.14 ± 0.92
<b>V</b>	<b>Nepantla, Edo. Mex</b>	23.86 ± 0.33	36.73 ± 1.11

Las diferencias en el contenido de los compuestos **1** y **2** en las diferentes muestras puede deberse a variaciones ontogénicas, estacionales y de origen geográfico, ya que las muestras fueron recolectadas en diferentes épocas del año y en diferentes zonas.



### 5.3. Establecimiento de la seguridad y eficacia preclínica

#### 5.3.1. Determinación de la toxicidad aguda

El incremento en el uso de plantas medicinales obedece en parte a la falsa premisa de que son seguros por ser naturales. No obstante, se han reportado múltiples efectos adversos relacionados a la administración de plantas medicinales que pudieron asociarse directamente a los componentes químicos de las plantas y/o a las interacciones de éstos con alimentos y medicamentos alopáticos (Jordan *et al.*, 2010). Resulta entonces necesario establecer la seguridad de las plantas medicinales y sus derivados como primer paso en un protocolo preclínico; la evaluación de los parámetros de inocuidad debe hacerse de acuerdo a metodologías y lineamientos éticos ya establecidos (WHO, 2000).

La toxicidad aguda de los extractos preparados a partir de la especie *A. cristata* se evaluaron mediante la metodología establecida por Lorke (1983). En este ensayo se utilizan pocos ratones y se realiza en un periodo de tiempo corto.

La prueba de Lorke se realizó en dos fases. La primera fase consistió en determinar el efecto de los diferentes extractos a las dosis de 10, 100, y 1000 mg/kg, administrados por vía oral; los animales se observaron durante las dos primeras horas posteriores a la administración de los tratamientos y durante los siguientes 14 días con la finalidad de detectar cambios de su comportamiento o de peso. En esta primera fase no se registró fallecimiento de animal alguno o efectos tóxicos visibles, por lo que se prosiguió con la segunda fase; en ésta, los ratones fueron tratados con dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg de cada extracto sin que se observaran cambios de comportamiento ni de peso. Cabe destacar que al cabo de cada fase experimental se realizó la necropsia de los animales para determinar la presencia de daños macroscópicos de órganos internos debidos a la administración de los diversos tratamientos; estas inspecciones no revelaron ninguna anomalía en lo referente a tamaño, color o aspecto de los órganos.

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba se puede establecer que el extracto acuoso total (EAT), el mucilago (M) y el extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) presentan una  $DL_{50}$  mayor a 5000 mg/kg y en ningún caso se observó daño

macroscópico en órganos, por lo que de acuerdo con los criterios establecidos por Lorke (1983) son inocuos para roedores. Estas observaciones y el uso documentado de la especie por más de un siglo sugieren que la especie es segura para el consumo humano.

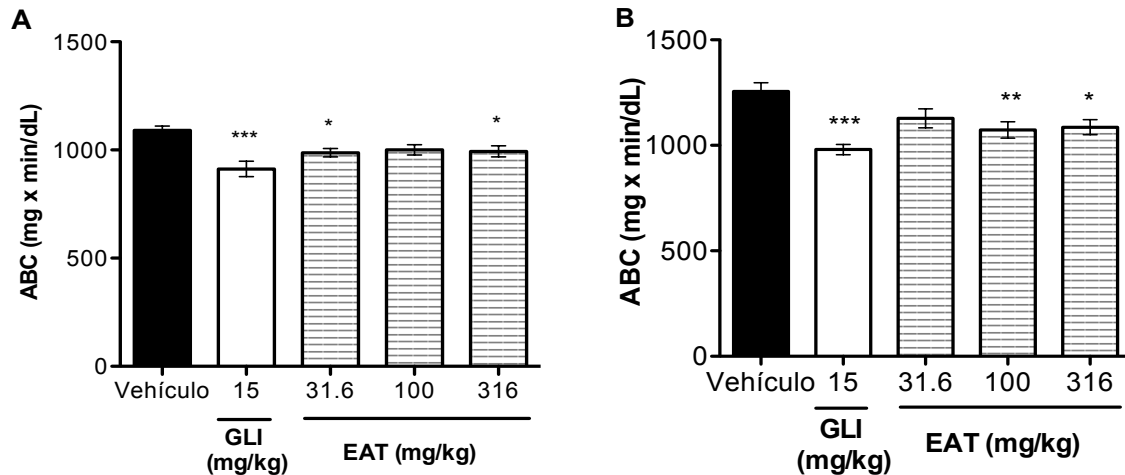
### 5.3.2. Evaluación de la actividad antidiabética

Como se indicó anteriormente la diabetes constituye un grave problema de salud pública, tanto a nivel nacional como mundial. En consecuencia los pacientes utilizan numerosos tratamientos de tipo alternativo, incluyendo las plantas medicinales. Esto ha conllevado a que muchas especies medicinales, con usos reconocidos para tratar esta enfermedad u otras se hayan incorporado en los cuadros terapéuticos de los usuarios de medicinas herbolarias. De allí la necesidad de establecer su eficacia. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la evaluación de los preparados tradicionales de la planta (EAT) y sus derivados (EA-LM y M) utilizando diferentes ensayos farmacológicos en roedores.

#### 5.3.2.1. Ensayo hipoglucemiante agudo

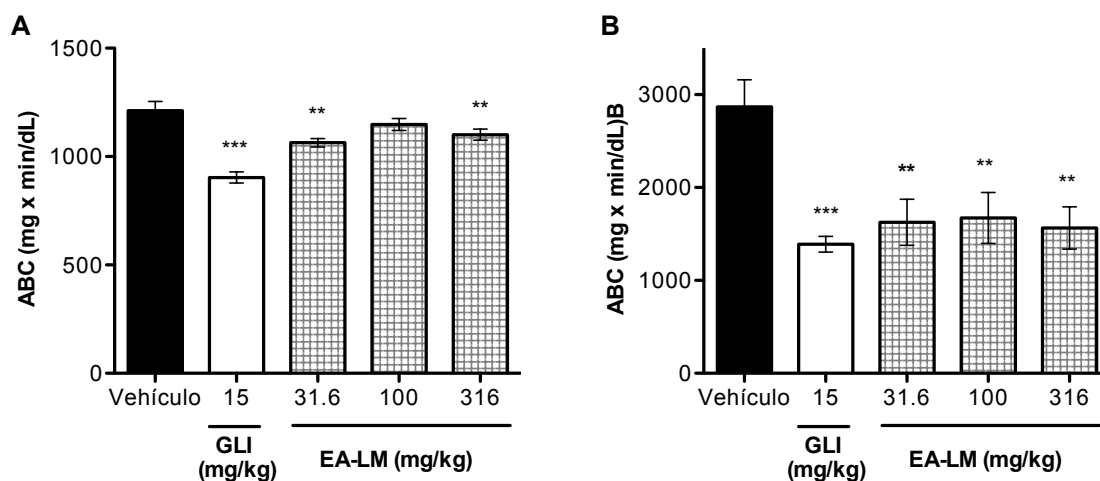
En esta prueba los ratones se hicieron hiperglucémicos tras la administración de estreptozotocina (STZ, 130 mg/kg) previo tratamiento con NA (50 mg/kg) con el objetivo de obtener una condición similar a la diabetes tipo II no insulino dependiente; como control positivo se utilizó el fármaco glibenclamida.

Los resultados del tratamiento de animales normoglucémicos con EAT (**Figura 14-A**) indicaron que a las dosis de 31.6 y 316 mg/kg el preparado provocó un efecto hipoglucemiante significativo; en animales hiperglucémicos, el mismo tratamiento disminuyó los niveles de glucosa a las dosis de 100 y 316 mg/kg (**Figura 14-B**).



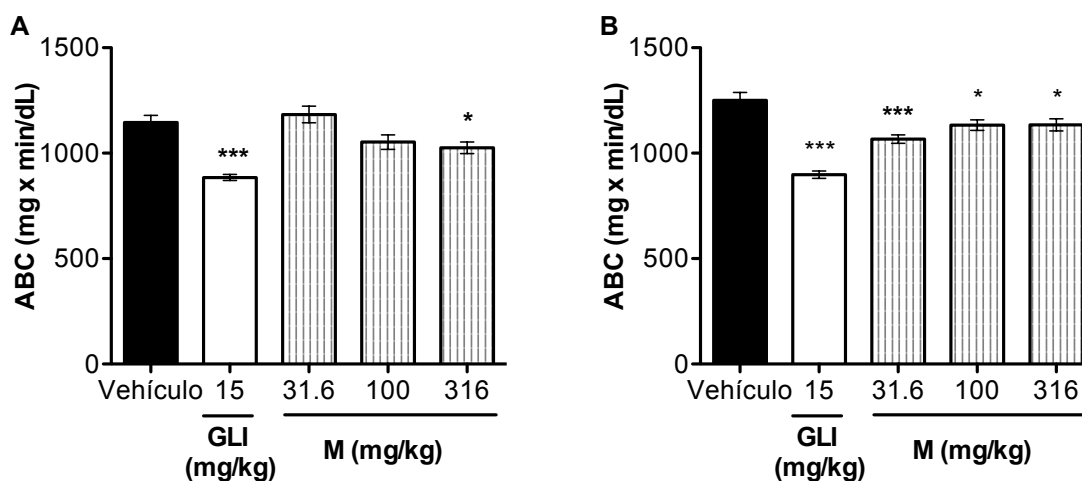
**Figura 14.** Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso total EAT de *A. cristata* en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

El EA-LM en animales normoglucémicos provocó un efecto hipoglucemiante a las dosis de 31.6 y 316 mg/kg; los resultados se presentan en la **Figura 15A**. El mismo extracto promovió un efecto hipoglucemiante a las tres dosis evaluadas en animales hiperglucémicos **Figura 15B**.



**Figura 15.** Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso libre de mucilago EA-LM de *A. cristata* en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

Finalmente, el M ocasionó un efecto hipoglucemiante a la dosis de 316 mg/kg en animales normoglucémicos, mientras que en animales hiperglucémicos el efecto se observó en todas las dosis evaluadas **Figura 16A y B**. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios que refieren que los mucílagos, debido a su alta viscosidad, pueden disminuir los niveles de glucosa en sangre de roedores hiperglucémicos por un mecanismo de atrapamiento de glucosa (Rodríguez-Morán *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009; Nuñez-López *et al.*, 2013).



**Figura 16.** Efecto hipoglucemiante agudo del mucilago M de *A. cristata* en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

Los efectos hipoglucemiantes provocados por los distintos extractos se atribuyeron *a priori* a la presencia de flavonoides, ya que algunos de estos productos son hipoglucemiantes ya que afectan los mecanismos de transporte de glucosa y/o la promoción de la liberación de insulina, entre otros (Dey & Lakshmanan, 2013; Seo *et al.*, 2014; Konaté *et al.*, 2014).

### 5.3.2.2. Tolerancia a glucosa (PTGO)

Uno de los principales problemas de los pacientes diabéticos es la deficiente regulación de la glucosa postprandial, por lo tanto los preparados se ensayaron también mediante una PTGO (Garg & Shah, 2014). En esta prueba se administra una

carga de glucosa a animales de experimentación con el fin reproducir la condición hiperglucémica que se presenta tras la ingesta de alimentos. Este aumento en los valores de glucosa (pico postprandial) se controla con fármacos como la metformina. Los extractos EAT, EA-LM y M de *A. cristata* fueron útiles para disminuir el pico postprandial en los roedores tratados durante la realización de la prueba (**Figuras 17-19**).

El EAT provoca una disminución significativa del % de variación de glucosa, en el pico postprandial, a la dosis de 100 mg/kg en animales sanos (**Figura 17A**). Por otra parte, en animales hiperglucémicos las dosis más bajas provocaron una disminución importante de los % de variación de glucosa sanguínea (**Figura 17B**), de tal forma que los niveles de glucosa postprandial disminuyeron en un 47.9% y 36.3% a las dosis de 31.6 y 100 mg/kg, respectivamente con relación al grupo tratado con vehículo.

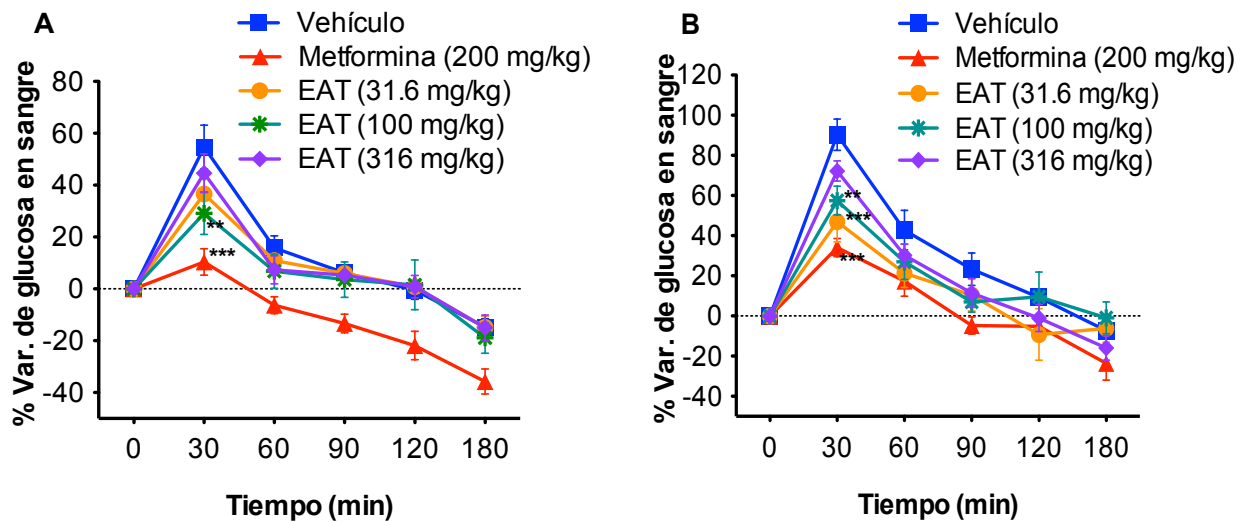
Los resultados obtenidos para el extracto acuoso libre de mucilago se presentan en la **Figura 18**. En animales normoglucémicos, las dosis de 100 y 316 mg/kg disminuyen de manera significativa el porcentaje de variación de glucosa, 30 minutos después de la administración de una carga de glucosa (**Figura 18A**). Estos porcentajes se compararon respecto al porcentaje alcanzado por los animales tratados con vehículo y se puede concluir que el extracto disminuyó los niveles de glucosa en un 63.4 y 62.8 % a las dosis de 100 y 316 mg/kg, respectivamente. En animales hiperglucémicos (**Figura 18B**) la dosis de 316 mg/kg pierde su efecto, no obstante las dosis de 31.6 y 100 mg/kg disminuyeron el pico postprandial de manera significativa; la dosis de 31.6 mg/kg disminuye los niveles de glucosa en un 81% respecto al vehículo, mientras que la dosis de 100 mg/kg lo hace en un 90.1%.

En el caso del mucilago se puede observar que las tres dosis (31.6, 100 y 316 mg/kg) disminuyeron el pico postprandial en animales normoglucémicos; la variación en el pico fue de 73.2, 54,8 y 64.1 %, respectivamente, en comparación con el grupo del vehículo (**Figura 19A**). Para animales hiperglucémicos únicamente las dosis de 100 y 316 mg/kg tuvieron efecto (**Figura 19B**); la variación de los niveles de glucosa postprandial respecto al vehículo fue de 40.2 y 33.1 % respectivamente.

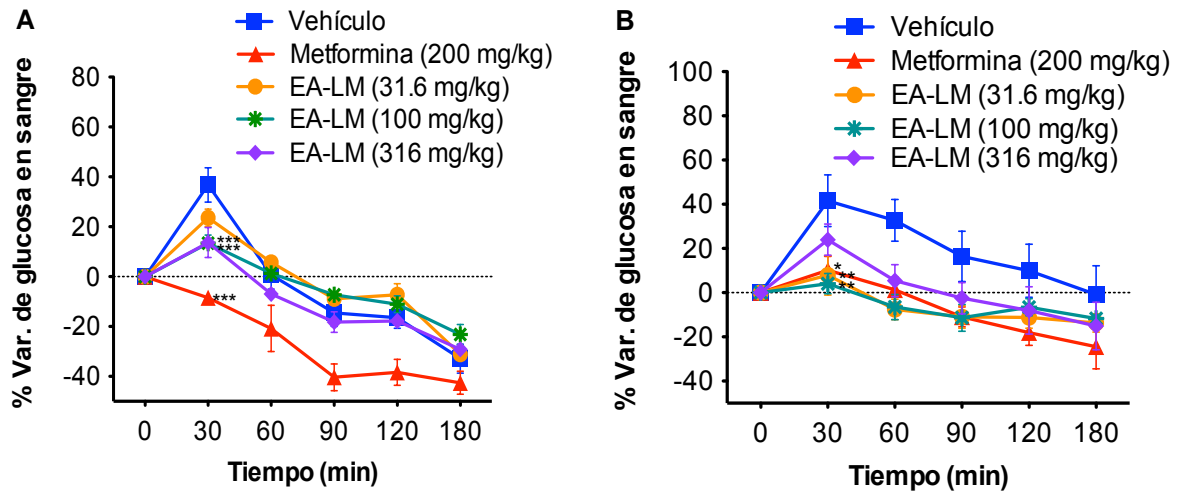
El efecto antihiperglucémico observado para estos extractos podría deberse al

bloqueo de alguno de los transportadores intestinales principales: el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT, por sus siglas en inglés) o el transportador GLUT2; también puede deberse a un mecanismo mecánico de atrapamiento por parte del mucilago que impide la absorción de glucosa por el intestino (Nuñez-López *et al.*, 2013).

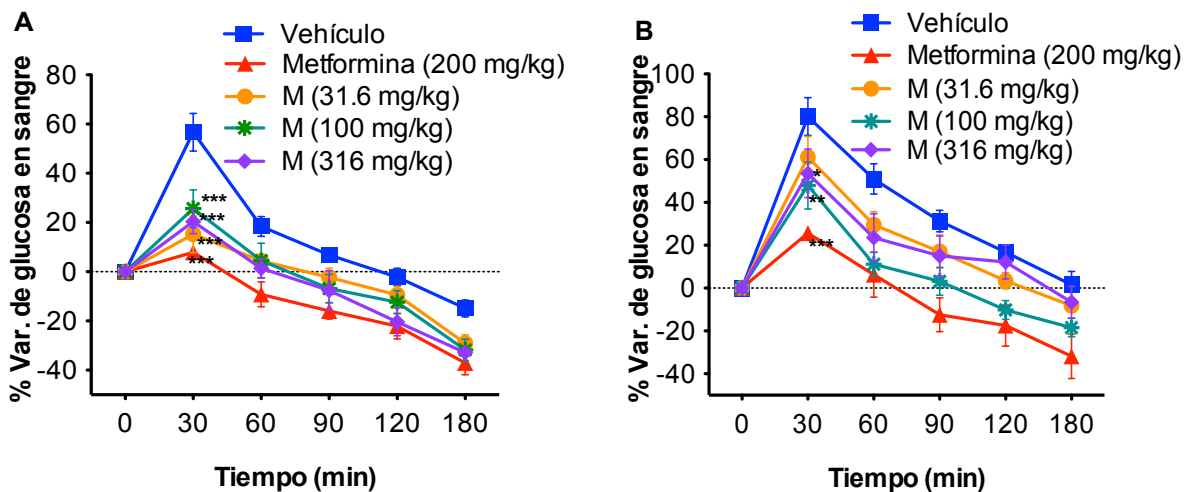
De nueva cuenta los resultados de la PTGO pueden estar asociados a la presencia de flavonas en los extractos (Dey & Lakshmanan, 2013; Seo *et al.*, 2014; Konaté *et al.*, 2014).



**Figura 17.** Curva de tolerancia a la glucosa (PTGO) luego de la administración del extracto acuoso total (EAT) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 18.** Curva de tolerancia a la glucosa (PTGO) luego de la administración del extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B. animales hiperoglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 19.** Curva de tolerancia a la glucosa (PTGO) luego de la administración del mucilago (M) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B. animales hiperoglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

### 5.3.2.3. Tolerancia a sacarosa (PTS0)

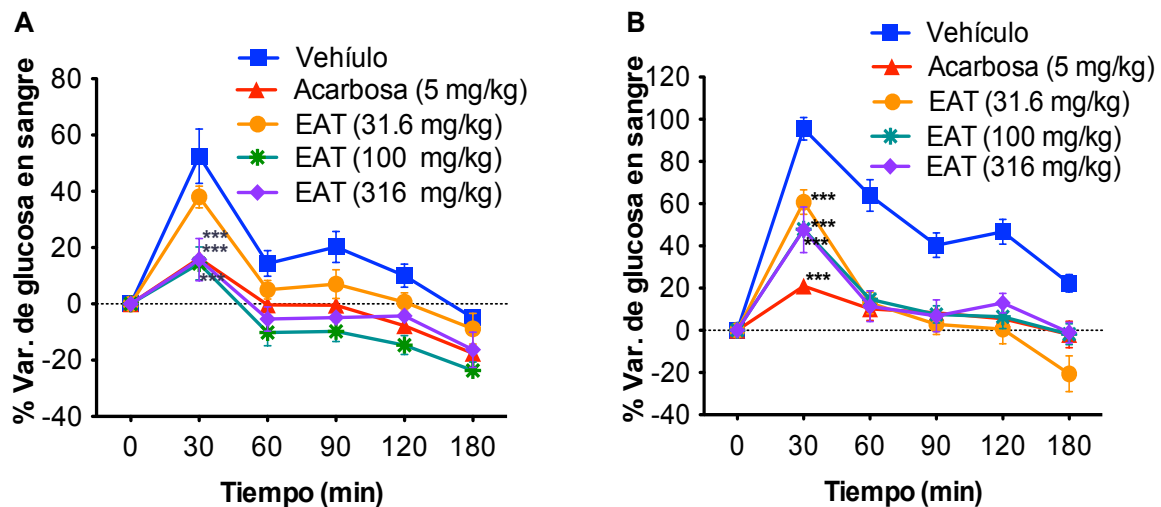
La PTS0 permite analizar si los tratamientos administrados presentan una eficacia antidiabética relacionada con la inhibición de la absorción intestinal de carbohidratos, en particular, es útil para detectar inhibidores de la actividad de las  $\alpha$ -glucosidasas;

así, la disminución del pico postprandial se puede traducir como una inhibición de la actividad de dichas enzimas.

Los resultados para el EAT se presentan en la **Figura 20A y 20B** y se puede observar que las dosis de 100 y 316 mg/kg disminuyen el pico postprandial; en animales diabéticos el efecto se observó con las tres dosis evaluadas, sin embargo el efecto fue menor que en animales normoglucémicos.

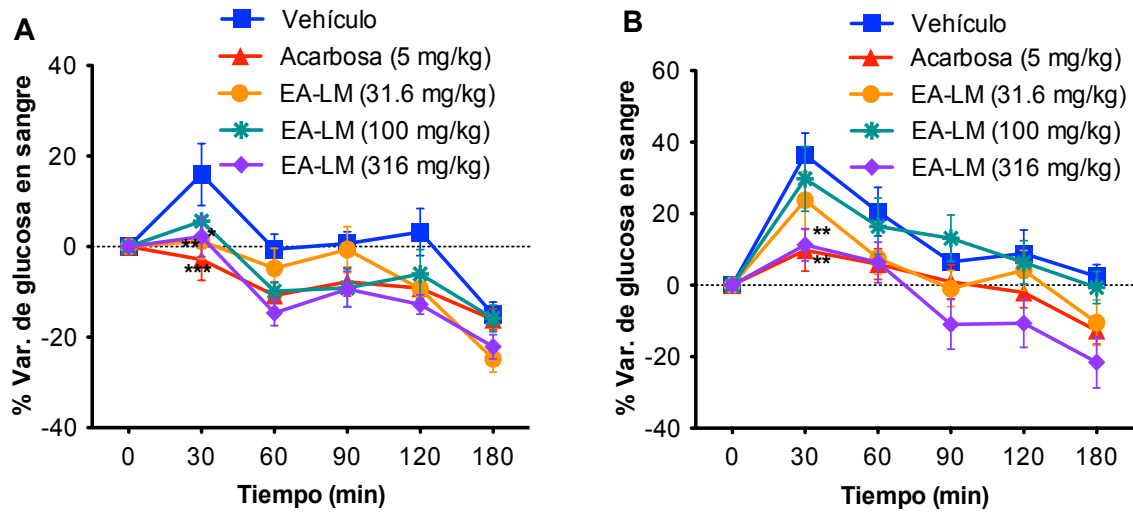
EA-LM tiene un efecto significativo en la disminución del pico postprandial a las dosis de 31.6 y 316 mg/kg en roedores normoglucémicos (**Figura 21A**). Los animales con hiperglucemia que recibieron la dosis de 316 mg/kg también presentaron una disminución importante del pico postprandial **Figura 21B**.

El mucilago disminuye el pico postprandial a las dosis de 100 y 316 mg/kg en animales con niveles de glucosa normales (**Figura 22A**), en animales con hiperglucemia (**Figura 22B**) únicamente la dosis de 31.6 mg/kg tiene un efecto significativo.

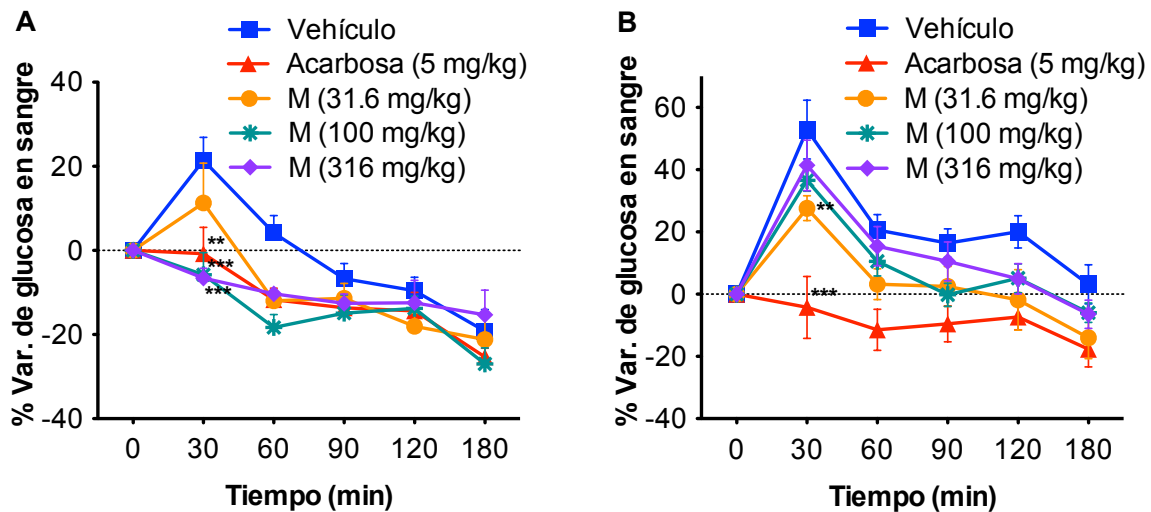


**Figura 20.** Curva de tolerancia a la sacarosa (PTSO) luego de la administración del extracto acuoso total (EAT) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .





**Figura 21.** Curva de tolerancia a la sacarosa (PTSO) luego de la administración del extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperoglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 22.** Curva de tolerancia a la sacarosa (PTSO) luego de la administración del mucilago (M) de *A. cristata* en: A. ratones normoglucémicos; B animales hiperoglucémicos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Los resultados indican que los extractos evaluados podrían tener efecto sobre la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, complementando el efecto hipoglucemiante demostrado previamente, también cabe señalar que los diferentes

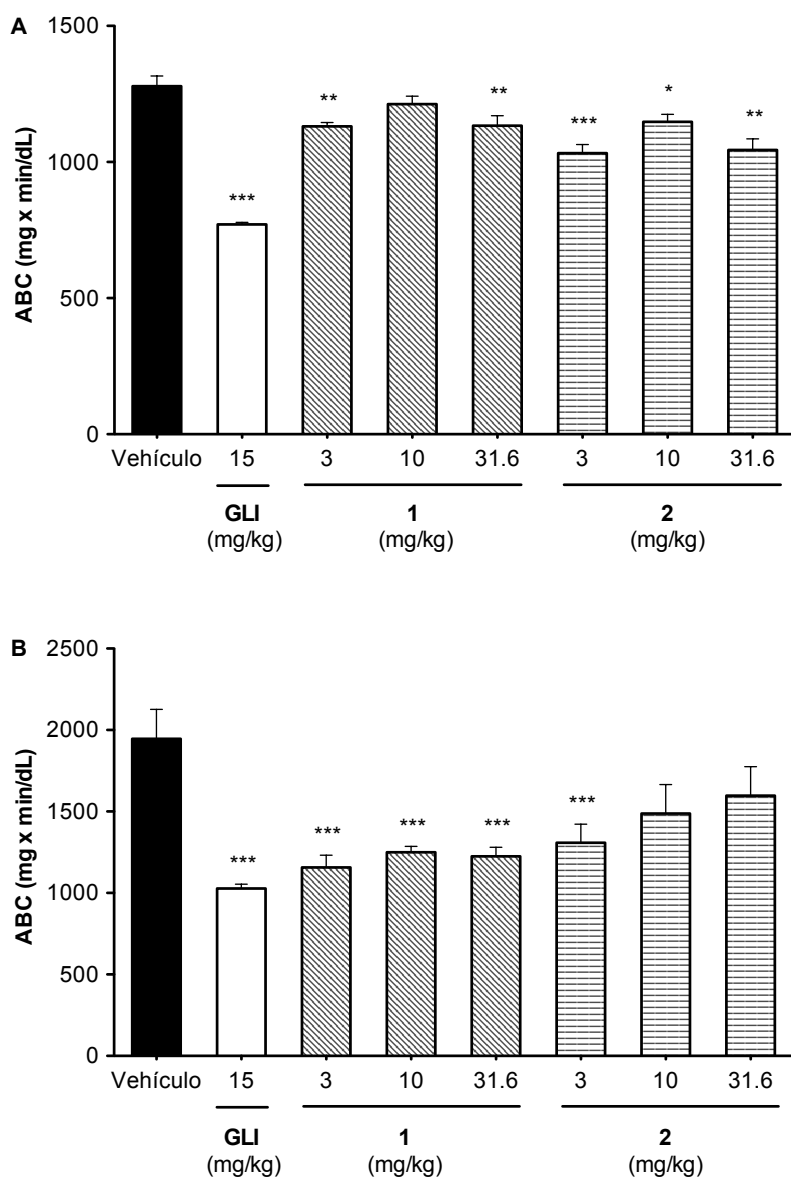
extractos evaluados contienen los compuestos acacetina (**1**) y diosmetina (**2**), los cuales han sido reportados como inhibidores de estas enzimas (Escandón-Rivera *et al.*, 2012; Ezzat y Salama, 2014). No se descarta el efecto del mucilago sobre la inhibición de la absorción de los carbohidratos en el intestino.

#### 5.3.2.4. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los compuestos acacetina (**1**) y diosmetina (**2**)

Hasta este punto se ha demostrado que los extractos obtenidos de la especie poseen la capacidad de disminuir los niveles de glucosa sanguínea, estos resultados hacen necesario determinar si las flavonas aisladas son las responsables de dicho efecto. Para esto se determinó el efecto hipoglucemiante de los compuestos mediante el ensayo de tipo agudo. Como se puede observar en la **Figura 23A** el compuesto **1** presenta un efecto hipoglucemiante en animales normoglucémicos a las dosis de 3 y 31.6 mg/kg; en animales con hiperglucemia se observó que el efecto se conserva y es significativo respecto al vehículo, a dosis entre 3 y 31.6 mg/kg (**Figura 23B**).

En el caso del compuesto **2**, las dosis de 3 y 31.6 mg/kg (**Figura 22A**) disminuyen la hiperglucemia en los ratones sanos; sin embargo, cuando se realiza el experimento en los hiperglucémicos únicamente la dosis de 3 mg/kg disminuye la glucosa en sangre de forma significativa (**Figura 23B**).

En estudios previos se ha comprobado que estos compuestos ejercen efectos que correlacionan con los hallazgos del presente estudio. Así, varios glicósidos de la diosmetina (**2**) disminuyen los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre en ratas diabéticas; estos glicosidos fueron responsables también del incremento de la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en hígado (Michael *et al.*, 2013). La acacetina (**1**) y sus glicosidos inhiben las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de manera moderada (Escandón-Rivera *et al.*, 2012; Ezzat & Salama, 2014). Finalmente, se demostró que ambos compuestos actúan como agonistas PPAR *in vitro* (Matin *et al.*, 2009, 2013) lo cual a su vez correlaciona con sus efectos hipoglucemiantes y antihiperglucémicos encontrados en esta investigación. Entonces resta mucho por realizar respecto al mecanismo de acción antidiabético de las flavonas **1** y **2**.



**Figura 23.** Efecto hipoglucemiante agudo de los compuestos acetina (1) y diosmetina (2) en: A: animales normoglucémicos, B: animales hiperglucémicos. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.3.3. Determinación del mecanismo de acción antidiabético del extracto acuoso libre de mucílago (EA-LM) y de acetina (1) y diosmetina (2)

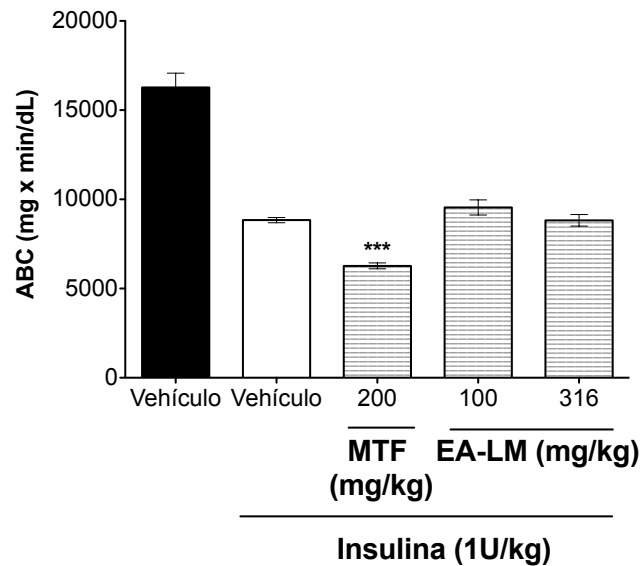
Como ya se mencionó con anterioridad es común que las plantas medicinales presenten los mismos mecanismos acción de los fármacos alopáticos (Prabhakar &

Doble, 2011; Majumdar, 2013; Govindappa, 2015), por esta razón en el presente estudio se realizaron experimentos conducentes a determinar si los preparados y compuestos de *A. cristata* actúan de forma similar a las sulfonilureas y/o la MET.

#### 5.3.3.1. Prueba de tolerancia a la insulina

El principal efecto de la MET en la diabetes tipo 2 es la disminución de la gluconeogénesis hepática. Además, la MET mejora la utilización de la glucosa en músculo esquelético y en tejido adiposo aumentando el transporte de la glucosa en la membrana celular. Esto puede ser debido a una mejor fijación de la insulina a sus receptores ya que la MET no es eficaz en los diabéticos en los que no existe una cierta secreción residual de insulina (Foretz, 2014; Madiraju, 2014; Cao, 2014).

La prueba de tolerancia a la insulina mide primariamente la utilización de la glucosa estimulada por la insulina en los tejidos. De tal manera que en condiciones de ayuno la administración de una carga de insulina a ratones normales provoca una disminución importante de los niveles de glucosa sanguínea (**Figura 24**). La administración posterior de MET, como era de esperarse, provoca una disminución mayor de los niveles de glucosa a través de los mecanismos antes señalados. El tratamiento con EA-LM tras la carga de insulina, no provocó un efecto similar al de la MET ya que no se observó una disminución de los niveles de glucosa sanguínea respecto al control (vehículo+INS). Estos resultados indican que el efecto antihiper glucémico observado durante la prueba de tolerancia a la glucosa no obedece a una disminución de la resistencia a la acción de la insulina.



**Figura 24.** Efecto del EA-LM sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos después de la administración de una carga de insulina. ABC: área bajo la curva, MTF: metformina 200 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.3.3.2. Bloqueo de canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ) y potasio ( $K^+$ )

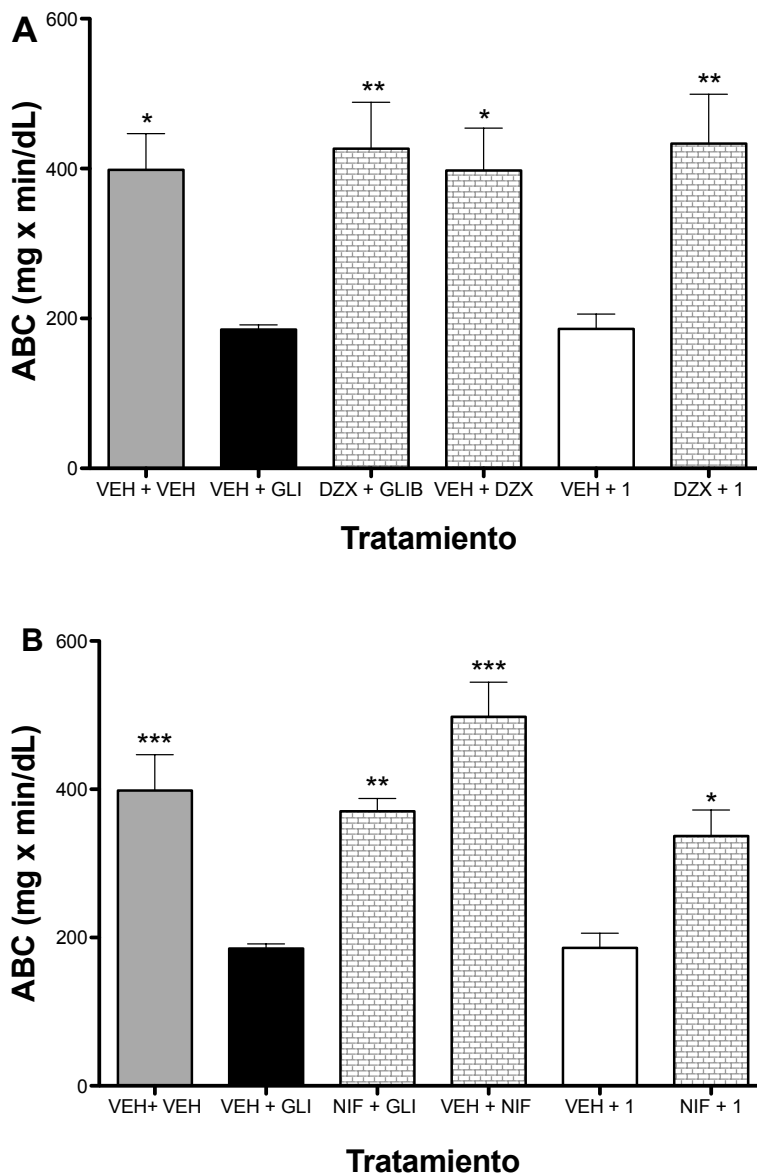
Como se indicó anteriormente, las sulfonilureas promueven la liberación de insulina a través del bloqueo de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP presentes en las células  $\beta$ -pancreáticas provocando la despolarización de las membranas, apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  y la consiguiente liberación de insulina (Sola *et al.*, 2015).

Con la finalidad de estudiar si el mecanismo de acción de las flavonas **1** y **2** es similar al de las sulfonilureas se realizó un estudio del efecto hipoglucemiante agudo, tras un tratamiento previo con cada uno de los siguientes fármacos: nifedipino (NIF: bloqueador de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L); y diazoxido (DZX: agonista selectivo de canales de  $K^+_{ATP}/SUR1/Kir6.2$ ).

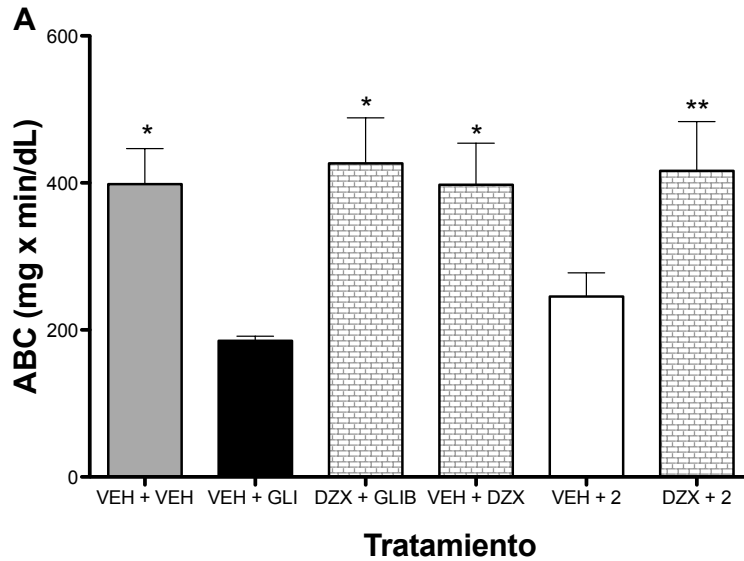
Los resultados de los estudios con DZX se presentan en la **Figura 25A**, en la que se observa claramente que el efecto hipoglucemiante de la GLIB y **1** se pierde tras el pretratamiento con DZX. Del mismo modo, el pretratamiento con nifedipino (**Figura 25B**) abatió el efecto hipoglucemiante de ambos productos. Este conjunto de resultados indica que el compuesto **1** ejerce su efecto hipoglucemiante debido al

bloqueo de los canales  $K^{+}_{ATP}/SUR1/Kir6.2$  y a la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  en la célula  $\beta$ -pancreática.

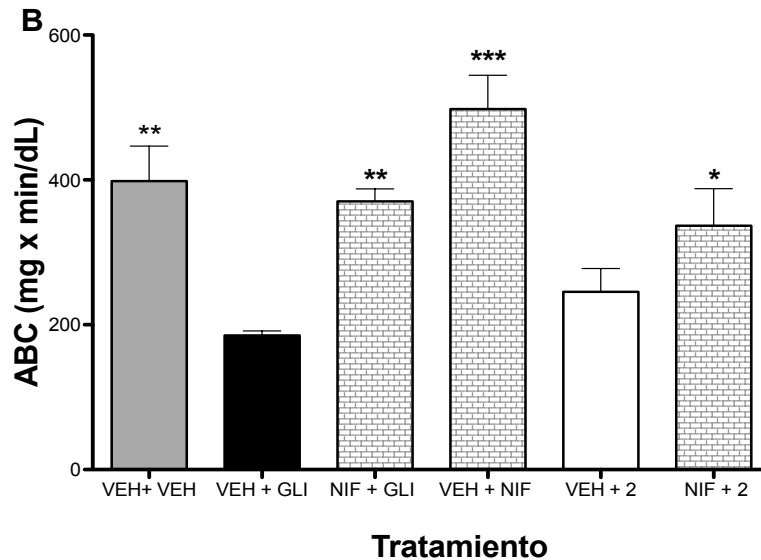
Los resultados obtenidos para el compuesto diosmetina (**2**) se presentan en la **Figura 26** y fueron similares a los del compuesto **1**. Este conjunto de resultados indican que las flavonas de *A. cristata* ejercen su efecto hipoglucemiante debido al bloqueo de los canales  $K^{+}_{ATP}/SUR1/Kir6.2$  y a la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  en las células  $\beta$ -pancreáticas.



**Figura 25.** Efecto de la acetina (**1**) sobre los niveles de glucosa en sangre, previo tratamiento con A: DZX y B: NIF. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg, VEH: vehículo, NIF: nifedipino 13.6 mg/kg y DZX: diazóxido 2 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al grupo VEH+GLI.



**Figura 26.** Efecto de la diosmetina (2) sobre los niveles de glucosa en sangre, previo tratamiento con A: DZX y B: NIF. ABC: área bajo la curva, GLI: glibenclamida 15 mg/kg, VEH: vehículo, NIF: nifedipino 13.6 mg/kg, y DZX: diazóxido 2 mg/kg. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al grupo VEH+GLI.



#### 5.3.4. Efecto del EA-LM en ratas con síndrome metabólico (SD)

Considerando el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico ejercido por las preparaciones y compuestos de la especie *A. cristata* se consideró pertinente estudiar el efecto del EA-LM en una serie de parámetros bioquímicos usualmente alterados en individuos que padecen síndrome metabólico (SM). Como se había mencionado en los antecedentes el diagnóstico de SM incluye al menos tres de los siguientes signos:

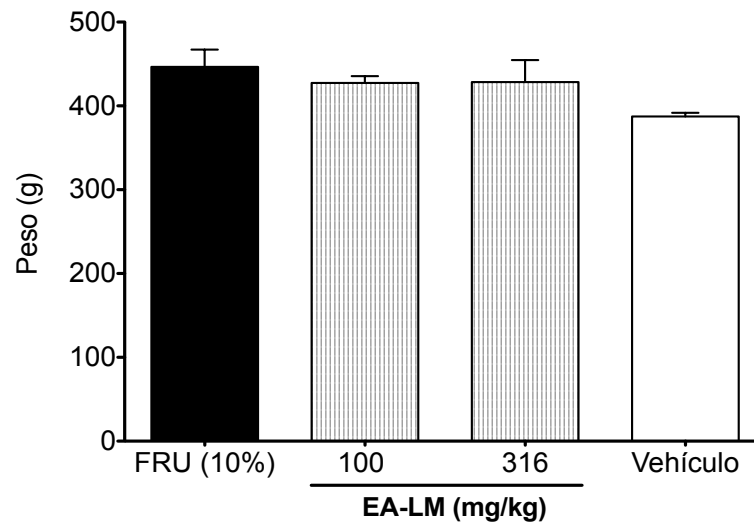
resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hipertensión, obesidad y variaciones en el perfil lipídico (colesterol y triglicéridos).

En los estudios realizados en el presente trabajo se utilizaron ratas SD con una dieta de fructosa al 10 % en el agua de uso y pellets para roedor; estos animales desarrollaron diversas alteraciones en su metabolismo congruentes con el desarrollo de SM, además fueron intolerantes a la glucosa (Ferreira de Moura *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2014). Las ratas alimentadas con fructosa desarrollan diversos problemas metabólicos debido a que este carbohidrato no estimula la secreción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas; a su vez provoca una disminución en la producción de leptina y un incremento de apetito que conlleva al aumento de peso debido a la mayor ingestión de alimento (Elliott *et al.*, 2002; Basciano *et al.*, 2005). Aún más, la cantidad de grasa abdominal incrementa de manera importante; este incremento se mide a través del índice de Lee (I Lee). Por otra parte, grandes cantidades de fructosa pueden causar que el hígado desarrolle perturbaciones en el metabolismo de glucosa, en las vías de recaptura de glucosa, la lipogénesis y la acumulación de triglicéridos. En consecuencia se reduce la sensibilidad a la insulina, en los tejidos y aumenta la intolerancia a la glucosa (Basciano *et al.*, 2005; Ferreira de Moura *et al.*, 2009).

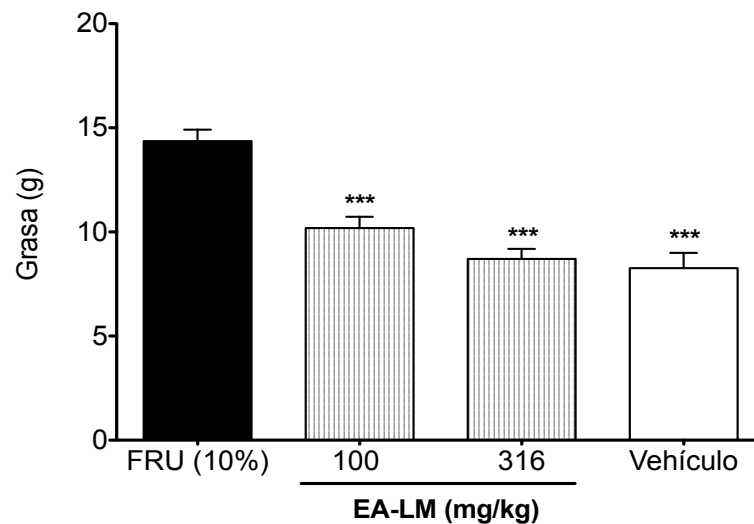
El tratamiento de estas ratas con EA-LM a las dosis de 100 y 316 mg/kg de peso provocó una serie de cambios en varios parámetros físicos los cuales se resumen en las **Figuras 27-29**. En relación al peso (**Figura 27**), EA-LM no provocó cambio de peso significativo, sin embargo se observa una tendencia a la baja, y lo más importante es que los animales no experimentaron un incremento de peso adicional.

En lo referente a la grasa abdominal (**Figura 28**), los animales del grupo control (Vehículo) presentan una cantidad significativamente menor a la del control de fructosa (grupo FRU), y los grupos tratados con el EA-LM presentan también una cantidad de grasa abdominal menor a la de los animales del grupo que recibieron solamente la dieta de fructosa (grupo FRU). El efecto fue dosis dependiente ya que a la dosis de 316 mg/kg fue mejor. Además, el cálculo del índice de Lee (**Figura 29**) claramente indica que el EA-LM redujo la grasa abdominal y la obesidad que presentaban las ratas con SM inducido por fructosa.

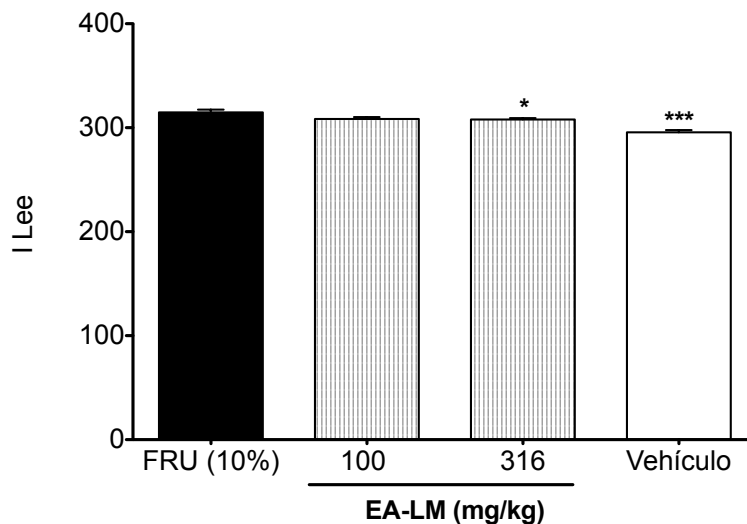




**Figura 27.** Efecto del EA-LM sobre el peso de ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , respecto al control de fructosa (FRU).

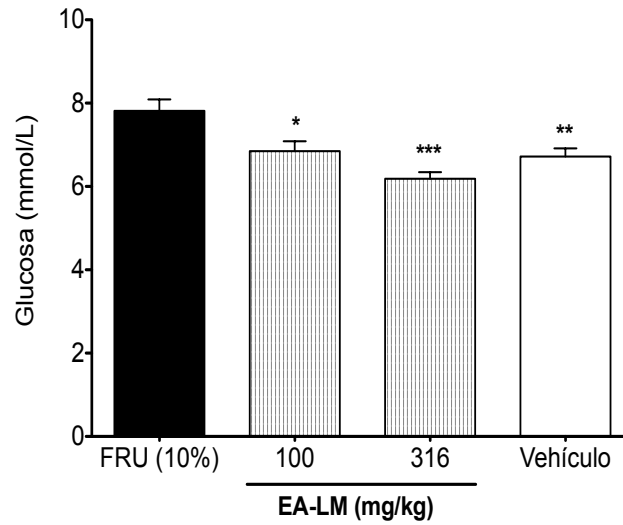


**Figura 28.** Efecto del EA-LM sobre la cantidad de grasa abdominal de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

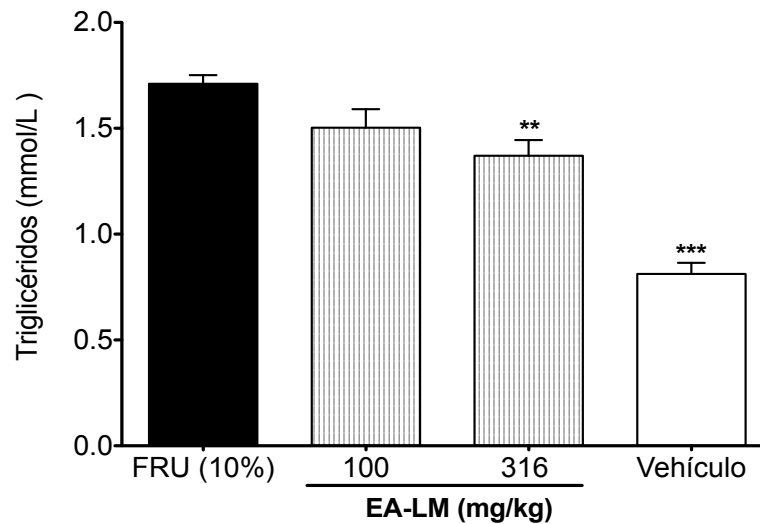


**Figura 29.** Efecto del EA-LM sobre índice de Lee (I Lee) de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

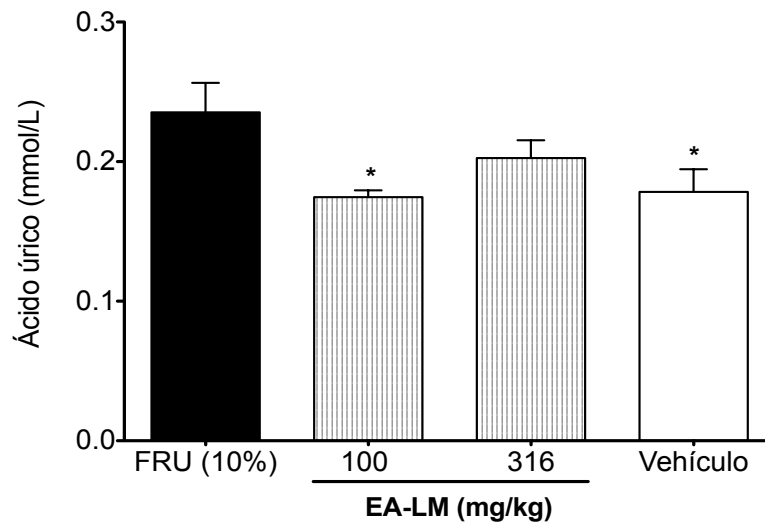
Los tratamientos con EA-LM provocaron también la modificación de varios parámetros bioquímicos; los resultados se presentan en las **Figuras 30-32**. Así, los altos niveles de glucosa, triglicéridos y ácido úrico de las ratas con SM inducido por fructosa disminuyeron significativamente. La reducción de los niveles de glucosa fue dependiente de la dosis (**Figura 30**). En el caso de los valores de triglicéridos únicamente la dosis de 316 mg/kg produce una disminución significativa respecto al grupo FRU (**Figura 31**). En la **Figura 32** se observa que la dosis de 100 mg/kg los niveles de ácido úrico alcanzan valores similares a los que presentan las ratas sanas (vehículo).



**Figura 30.** Efecto del EA-LM sobre la concentración de glucosa en suero de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

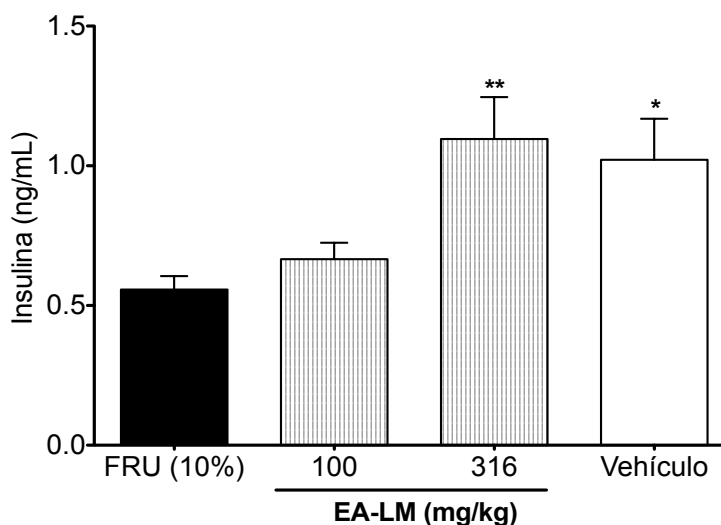


**Figura 31.** Efecto del EA-LM sobre la cantidad de triglicéridos en suero de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



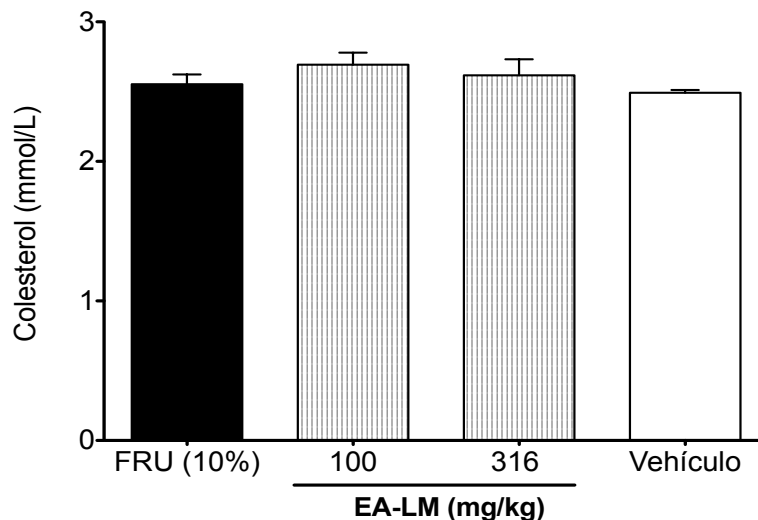
**Figura 32.** Efecto del EA-LM sobre los niveles de ácido úrico de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

EA-LM también provocó un aumento de los niveles de insulina a la dosis de 316 mg/kg, incluso los valores de la hormona son ligeramente mayores que los observados en los animales sanos (**Figura 33**).

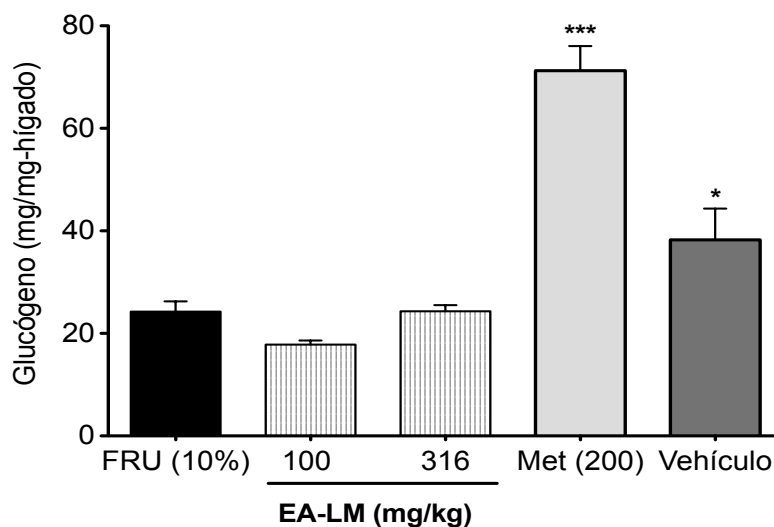


**Figura 33.** Efecto del EA-LM sobre los niveles de insulina de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Finalmente, los niveles de colesterol (**Figura 34**) y glucógeno (**Figura 35**) no se vieron afectados en los grupos tratados con el EA-LM.

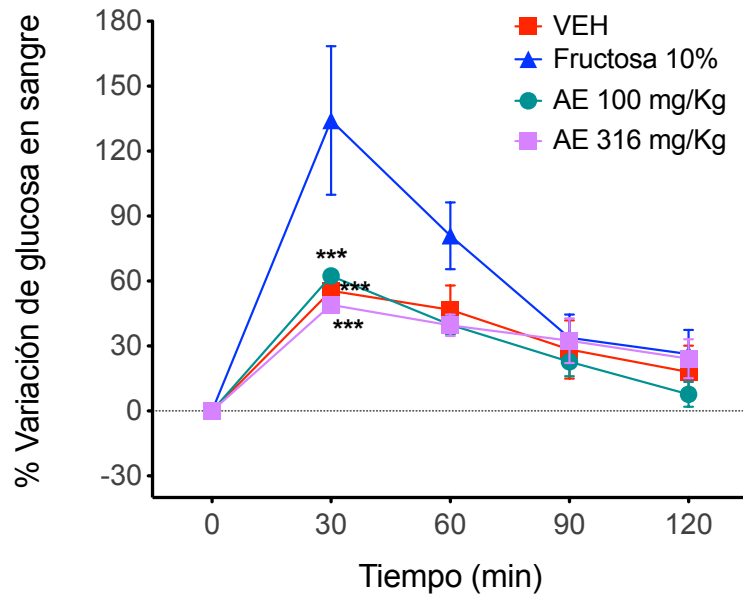


**Figura 34.** Efecto del EA-LM sobre los valores de colesterol de ratas con SM. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 35.** Efecto del EA-LM sobre los valores de glucógeno de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

De este conjunto de resultados se puede inferir que el tratamiento con el EA-LM disminuye los depósitos de grasa corporal y el índice de Lee en ratas con SM inducido por fructosa, posiblemente debido al incremento en la secreción de insulina y la reducción de la lipogénesis. Por otra parte esta preparación disminuye la producción de ácido úrico después de una carga de fructosa, este efecto podría ser debido a la inhibición de la enzima xantina oxidasa, la cual generalmente incrementa cuando hay un alto consumo de fructosa.



**Figura 36.** Efecto del EA-LM en una PTGO de ratas con síndrome metabólico. ABC: área bajo la curva, FRU: Control de fructosa. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

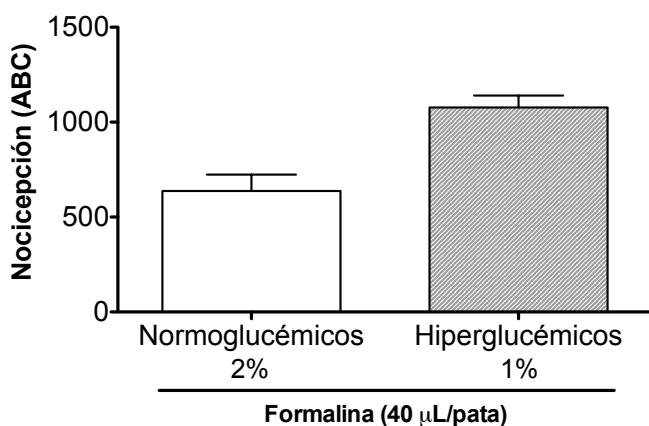
La intolerancia a la glucosa es uno de los síntomas importantes del síndrome metabólico, una prueba sencilla que permite determinar si existe este problema es la PTGO. De acuerdo a los resultados que se presentan en la **Figura 36**, la administración del EA-LM a las dosis de 100 y 316 mg/kg, produce una disminución significativa del pico postprandial respecto al grupo FRU, después de 30 min de la administración de la carga del carbohidrato. Entonces el EA-LM podría disminuir la intolerancia a la glucosa en individuos afectados con síndrome metabólico.

### 5.3.5. Evaluación de la actividad antinociceptiva y antihiperalgésica del EA-LM y los compuestos acacetina (1) y diosmetina (2)

Las neuropatías diabéticas son una de las complicaciones más frecuentes en pacientes con DMT2 y se caracterizan por dolor espontáneo, parestesia, pérdida de sensibilidad, alodinia e hiperalgnesia (Jaggi & Singh, 2011; Forbes & Cooper, 2013, IDF, 2015; Cohen & Mao, 2014). El manejo del dolor neuropático es complejo y frecuentemente insatisfactorio (Chong, 2007; Tesfaye & Selvarajah, 2012).

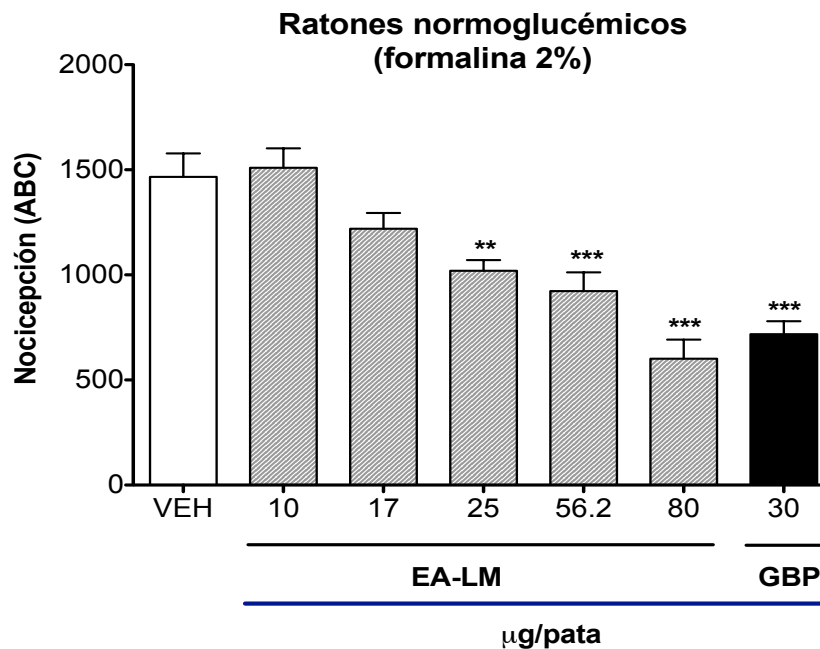
Con la finalidad de establecer si EA-LM y sus flavonas proporcionarían un beneficio adicional a los pacientes diabéticos con neuropatía se evaluó su efecto antinociceptivo y antihiperalgésico. Para determinar estos efectos se utilizó la prueba de la formalina; este modelo permite observar efectos tanto a nivel central como periférico. Los resultados obtenidos se integran en las **Figuras 37-40**.

La respuesta al estímulo químico (formalina al 2% para la prueba antinociceptiva y al 1% para medir el efecto antihiperalgésico) se cuantifica midiendo el tiempo de lamida de los animales como respuesta. En la **Figura 37** se presenta la comparación del tiempo de lamida de animales normoglucémicos (formalina al 2%) y el de animales hiperglucémicos (formalina al 1%), y se puede observar que a la menor concentración del alógeno en animales hiperglucémicos ( $283.17 \pm 60.62$  mg/dL) se produce una respuesta (ABC) mayor a la que se obtiene en animales con niveles normales de glucosa ( $124.67 \pm 8.74$  mg/dL). Con esto se comprueba que los animales con hiperglucemia inducida por la administración de NA-STZ presentan un estado de hiperalgnesia.



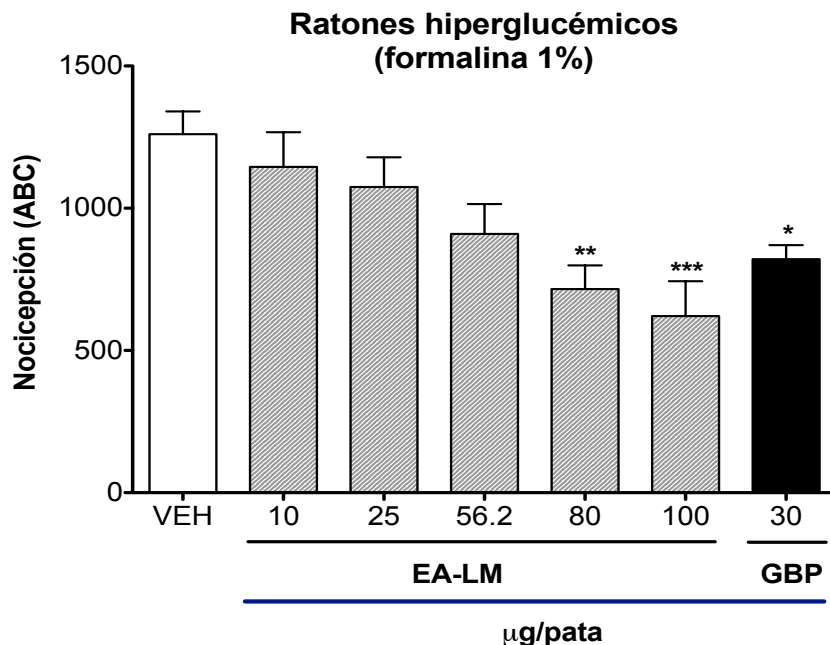
**Figura 37.** Efecto nociceptivo e hiperalgésico debido a la administración de formalina al 2% en animales normoglucémicos y al 1% en hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

En la **Figura 38** se presenta el efecto antinociceptivo del EA-LM, y se puede observar que el efecto es dependiente de la concentración; la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) fue de 66.21 µg/pata. Por otra parte, la CE<sub>50</sub> calculada para efecto antihiperálgico del extracto (EA-LM), fue de 97.21 µg/pata; la actividad farmacológica fue también dependiente de la concentración (**Figura 39**), Estos resultados indican que el EA-LM tiene actividad antinociceptiva y antihiperálgica.



**Figura 38.** Efecto antinociceptivo del EA-LM en animales normoglucémicos después de la administración de formalina al 2%. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

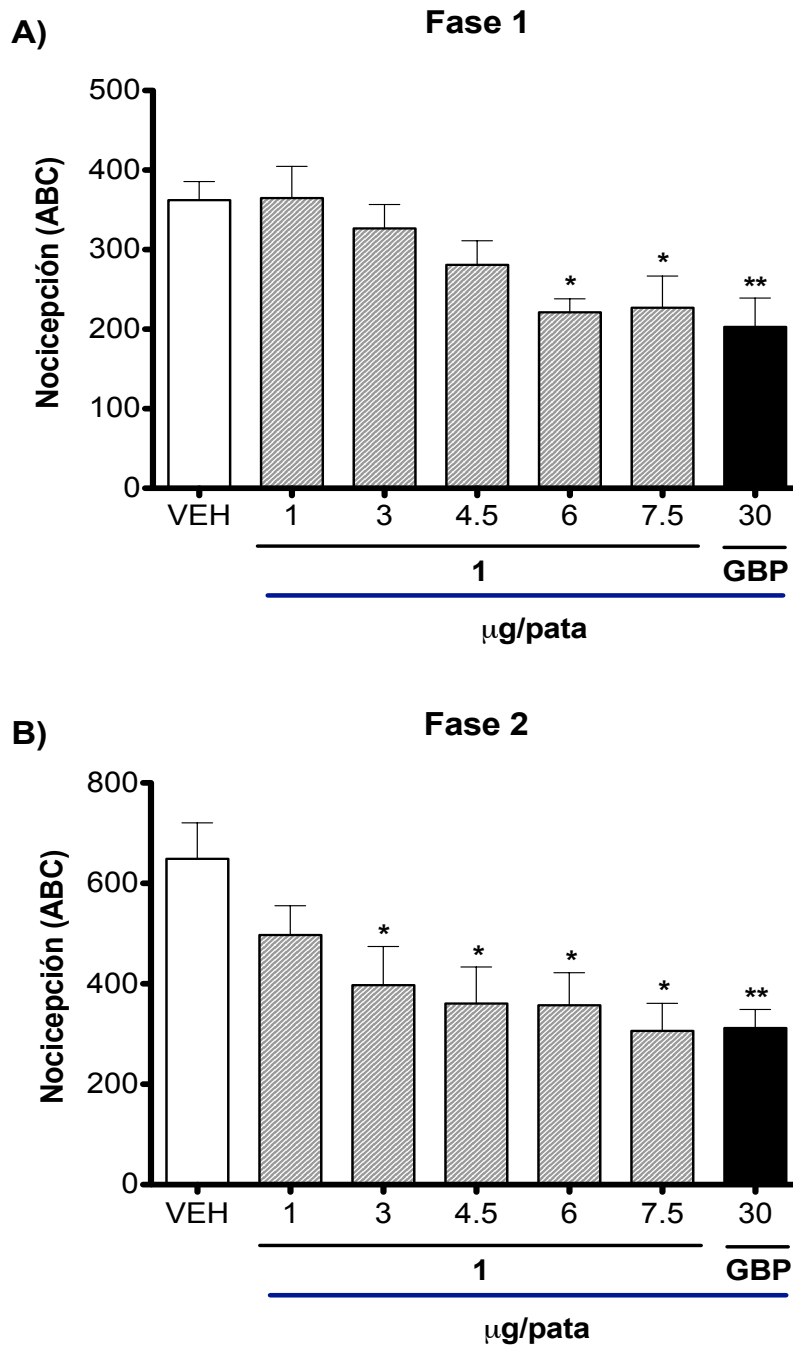




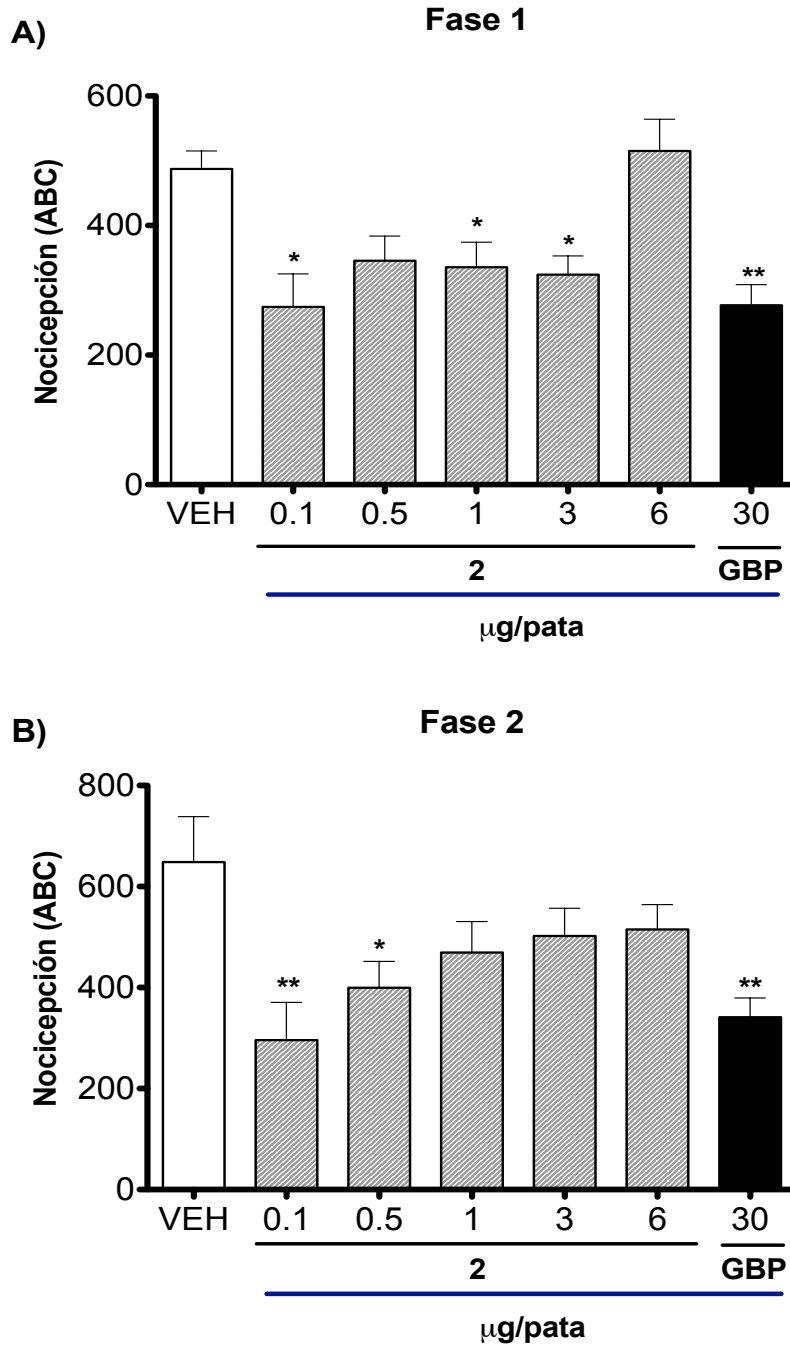
**Figura 39.** Efecto antihiperalgésico del EA-LM en animales hiperglucémicos después de la administración de formalina al 1%. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

En un estudio previo se demostró que la respuesta antiinflamatoria producida por **1** esta relacionada con la liberación de TNF- $\alpha$ , NO y PGE<sub>2</sub>. También se comprobó, que los receptores 5HT<sub>1A</sub>, GABA/BZD y opioides participan en el efecto antinociceptivo de este compuesto (Carballo-Villalobos *et al.*, 2014; Geun Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto antihiperalgésico del producto no se había comprobado. En este estudio se encontró que la acetina (**1**) produce un efecto antihiperalgésico (**Figura 40A y 40B**) dependiente de la concentración; la mejor actividad se presenta en la fase 2.

Por otra parte la administración de diosmetina (**2**) produce un efecto antihiperalgésico a bajas concentraciones (0.1 y 0.5  $\mu\text{g}$ /por pata); el efecto se pierde con el incremento de las concentración (**Figura 41A y 41B**). Esta acción podría estar correlacionada, en parte, con las propiedades inhibitorias de la liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$  *in vitro* previamente demostradas para este compuesto (Patel *et al.*, 2013).



**Figura 40.** Efecto antihiperalгésico del compuesto acetina en animales hiperglucémicos después de la administración de formalina al 1% A. Fase 1, B. Fase 2. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



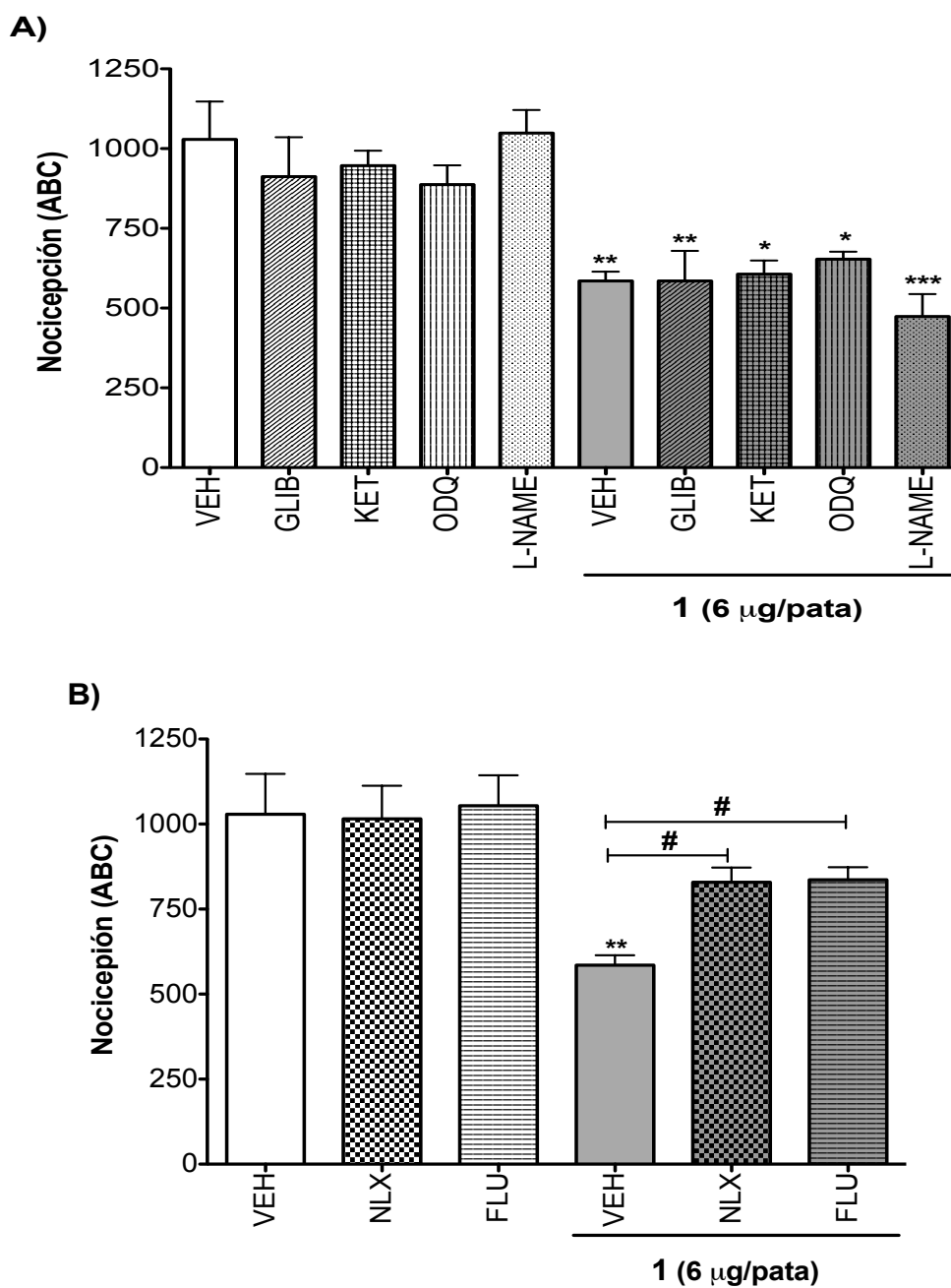
**Figura 41.** Efecto antihiperalgésico del compuesto diosmetina en animales hiperglucémicos después de la administración de formalina al 1% A. Fase 1, B. Fase 2.. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

Con el objetivo de evaluar el posible mecanismo de acción antihiperalgésico de los compuestos **1** y **2**, se realizaron experimentos adicionales utilizando diversos fármacos agonistas y antagonistas.

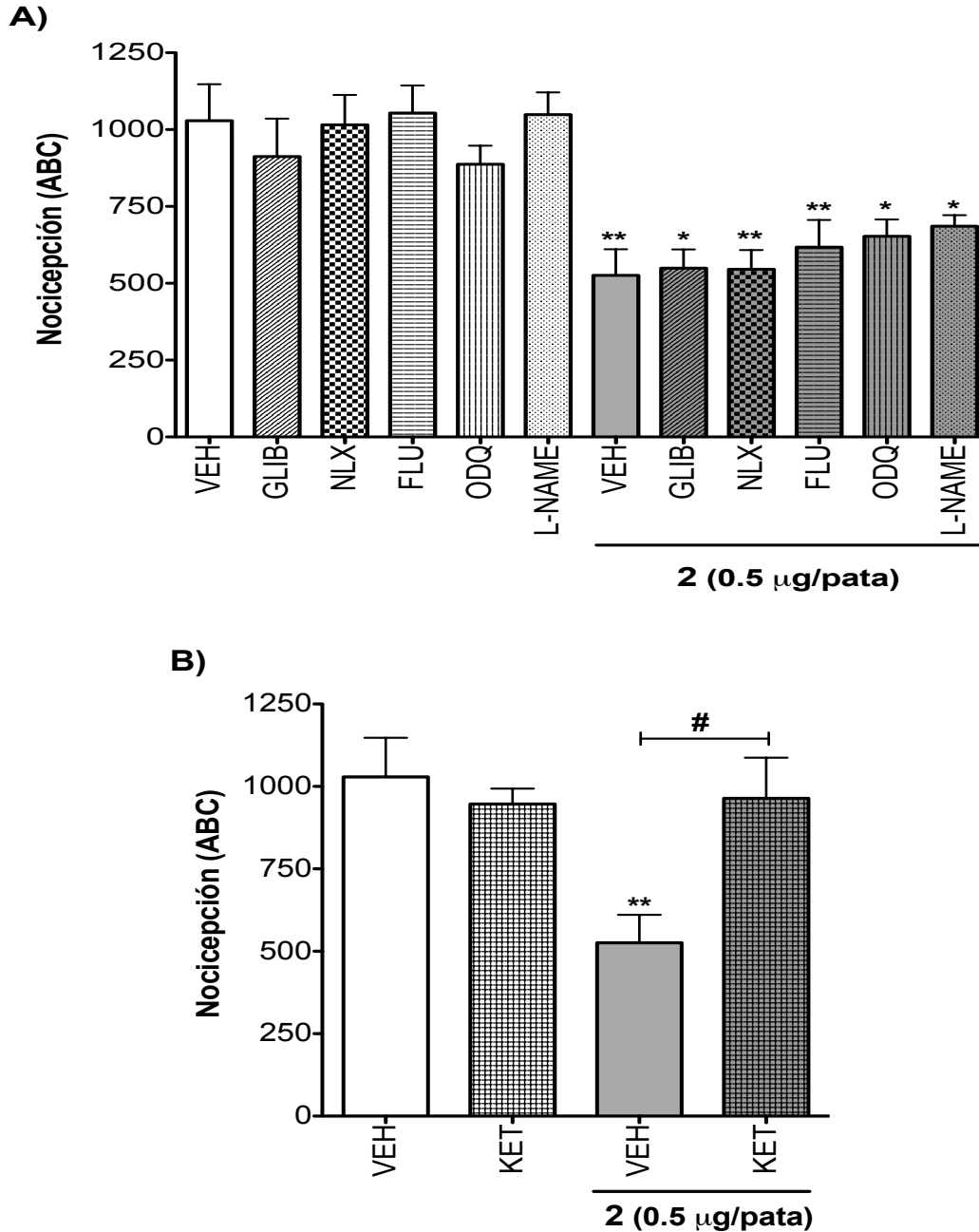
En la **Figura 42A** se observa que el L-NAME (150 µg/pata; inhibidor de óxido nítrico sintasa), la glibenclamida (50 µg/pata; bloqueador de canales de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), la KET (3 µg/pata; antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>) y el ODQ (75 µg/pata; inhibidor de guanilato ciclasa), no modifican la respuesta hiperalgésica de los ratones tras la administración de la formalina. Sin embargo, la coadministración de éstos con la flavona no altera el efecto antihiperalgésico. Este experimento permite descartar, la vía nitrérgica, los canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP, y al receptor 5HT<sub>2A</sub> como blancos de acción de **1**.

A continuación se evaluaron, los compuestos FLU (6 µg/pata; antagonista GABAérgico) y NLX (3 µg/pata; agonista de receptores opioides) para determinar la participación del sistema gabaérgico y de receptores opioides, respectivamente; los resultados se presentan en la **Figura 42B**. La coadministración de ambos productos con **1** provoca la pérdida de su efecto antihiperalgésico. Entonces los receptores opioides parecen participar en la actividad observada para el compuesto **1**. En el caso de la coadministración con FLU, la respuesta antihiperalgésica se vio también mermada. Estos resultados concuerdan en parte con un reporte previo en el que se demostró que los receptores GABA/BZD y opioides están involucrados en el mecanismo de acción de la flavona (Carballo-Villalobos *et al.*, 2014; Geun *et al.*, 2012). En relación a estos resultados, Morgado y colaboradores (2008) demostraron que en ratas diabéticas (NA-STZ) la expresión del cotransportador de cloruro se encuentra disminuido, lo que induce un incremento intracelular de cloruro que provoca que el receptor GABA genere respuestas excitatorias en lugar de inhibitoria (Morgado *et al.*, 2008; Hayashi & Nakanishi, 2015). Sin embargo, este efecto no se comprueba en ratones. Por lo tanto, considerando la respuesta provocada por la administración de FLU, el compuesto **1** podría estar activando receptores GABA con la consiguiente inhibición de las neuronas nociceptivas. Por otra parte, los receptores opioides son el blanco de fármacos para tratar neuropatías diabéticas (Rutten *et al.*, 2014); en este

trabajo se observó que acetina (**1**) posee un efecto agonista sobre receptores opioides.



**Figura 42.** Determinación mecanismo de acción antihiperálgico del compuesto acetina (**1**). A. Compuestos que no producen pérdida del efecto de **1**. B. Compuestos que inhiben la actividad del compuesto **1**. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



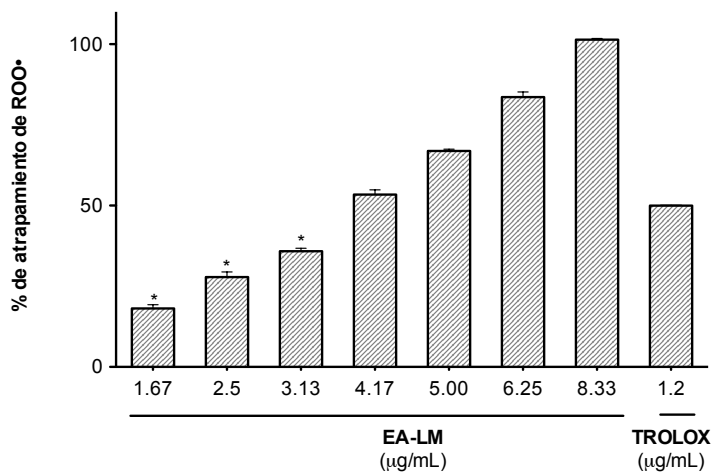
**Figura 43.** Determinación mecanismo de acción antihiperálgico del compuesto diosmetina (2). A. Compuestos que no producen pérdida del efecto de 2. B. Compuestos que inhiben la actividad del compuesto 2. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM para los animales de cada grupo ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

En el caso del compuesto diosmetina (**2**), solo su coadministración con KET (3  $\mu\text{g/pata}$ ) produjo un incremento significativo en el ABC (**Figura 43B**); en consecuencia, se puede concluir que el efecto antihiperalgésico de diosmetina está relacionado con los receptores 5-HT<sub>2A</sub>. En este caso no se podría descartar que el compuesto **2** también actúe sobre algún otro receptor serotoninérgico. La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) está ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y periférico y se asocia con procesos de modulación del dolor (Sommer, 2004; Viguier *et al.*, 2013). Hay siete clases de receptores 5-HT y 15 subtipos (Godínez-Chaparro *et al.*, 2013; Viguier *et al.*, 2013). El receptor 5-HT<sub>2A</sub> está involucrado en el efecto hiperalgésico en ratas; algunos agonistas de este receptor causan hiperalgesia, mientras que los antagonistas reducen el dolor inducido por formalina y tienen efectos benéficos en neuropatías diabéticas (Tokunaga *et al.*, 1998; Sommer, 2004). La pérdida del efecto de **2** a mayores concentraciones puede estar relacionada con el efecto pronociceptivo y antinociceptivo de los receptores 5-HT, asimismo, éste efecto puede asociarse al estado patofisiológico de los animales de experimentación, esto debido a que las lesiones en los nervios, producen cambios en los mecanismos de señalización para el dolor (Viguier *et al.*, 2013).

### 5.3.6. Evaluación del potencial antioxidante

El estrés oxidativo es considerado un factor importante en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (Sakai *et al.*, 2003; Houstis *et al.*, 2006; Bashan *et al.*, 2009; Afanas'ev, 2010; Bagul *et al.*, 2012). Los cambios en el estrés oxidativo, ya sea el aumento de la generación de radicales libres y/o a la reducción de antioxidantes endógenos, son considerados causas importantes en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Por esta razón, la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RSN) mediante antioxidantes representa un blanco atractivo para el tratamiento de diabetes tipo 2. En este contexto, el EA-LM fue evaluado para determinar su potencial antioxidante y atrapador de radicales libres, para esto se aplicaron técnicas conocidas (Medina-Campos *et al.*, 2007; Gaona-Gaona *et al.*, 2011).

EL EA-LM únicamente fue efectivo como atrapador del radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), éste extracto presentó una  $\text{CI}_{50}=3.72\pm 0.06 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 44**). Cabe destacar que este tipo de radical ataca todo tipo de moléculas y ha sido detectado en: diabetes, Alzheimer, en tejido aterosclerótico de pacientes con enfermedades cardiacas, esta relacionado con apoptosis y daño en ADN (Spiteller, 2008).



**Figura 44.** Actividad inhibitoria del radical peroxilo, debida el EA-LM. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM de tres réplicas de cada grupo ( $n=3$ ).



## 6. CONCLUSIONES

-Varios preparados: el extracto acuoso total (EAT), extracto acuoso libre de mucilago (EA-LM y el mucilago (M), preparados a base de *Anoda cristata* no mostraron toxicidad aguda en roedores; en todos los casos la dosis letal media es mayor a 5000 mg/kg. Esta información aunada al hecho de que la planta se ha consumido en México por más de cien años como medicina y alimento proporcionan un criterio de eficacia confiable.

-Se demostró mediante estudios *in vivo* que los mismos preparados de *A. cristata* poseen propiedades hipoglucemiantes y antihiperoglucémicas; estos resultados se encuentran en concordancia con el uso tradicional de la planta para el tratamiento de la diabetes tipo II. La información generada indica que la infusión de *A. cristata* es eficaz *in vivo* para controlar los niveles de glucosa en ayunas y posprandial en ratones diabéticos.

-Asimismo, la administración de EA-LM a ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa ayudo a mejorar algunos de los parámetros bioquímicos afectados en el síndrome metabólico. Así, el extracto a las dosis de 100 y 316 mg/kg, provocó una disminución de la grasa abdominal y la obesidad en las ratas. También se observó un descenso de los niveles de glucosa, triglicéridos y ácido úrico en suero, y un aumento importante en los niveles de insulina. De manera adicional, el extracto disminuyó significativamente del pico postprandial de las ratas durante una PTGO.

-Las flavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**), aisladas de la infusión de la planta tienen una importante actividad hipoglucemiante a las dosis de 3-10 mg/kg; la evaluación de su mecanismo de acción permitió establecer que las flavonas actúan como secretagogos de insulina mediante el bloqueo canales  $K^+_{ATP}/SUR1/Kir6.2$  y apertura canales de  $Ca^{2+}$ .

-En este trabajo se comprobó que el extracto de *A. cristata* disminuye la respuesta hiperalgésica durante un estado de hiperglucemia. El preparado EA-LM presenta un efecto antinociceptivo y antihiperalgésico dependiente de la concentración ( $CI_{50}=66.21 \mu\text{g/pata}$  y  $CE_{50}=97.21 \mu\text{g/pata}$ , respectivamente). El efecto antihiperalgésico de la especie está también relacionado con presencia de los compuestos **1** y **2**, los cuales presentaron un importante efecto antihiperalgésico. Se demostró que la acetina (**1**) actúa activando receptores GABA y como agonista de receptores opioides; en tanto que la diosmetina (**2**) es un agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>.

-Se comprobó el potencial antioxidante como atrapador del radical peróxido *in vitro* del extracto ( $CI_{50}=3.72\pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ). Esta acción podría disminuir *in vivo* el estrés oxidativo involucrado en las complicaciones de la diabetes.

-Se desarrolló y validó un método analítico que permitirá el control de calidad de la droga cruda y sus preparados.

-Se realizó el análisis del aceite esencial de la especie con la finalidad de establecer su perfil cromatográfico y se identificaron los compuestos mayoritarios en el mismo.

-Los resultados derivados del presente trabajo, incluyendo el establecimiento de los parámetros de calidad de la droga cruda de *A. cristata*, la abundancia y amplia distribución en México, hacen de *esta planta* un candidato ideal para el desarrollo de un preparado herbolario estandarizado de utilidad para el tratamiento de la diabetes y síndrome metabólico.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aboaba, S.A., Ogunwande, I.A., Walker, T.M., Setzer, W.N., Oladosu, I.A., Ekundayo, O. (2009). Essential oil composition, antibacterial activity and toxicity of the leaves of *Tetrapleura tetraptera* (Schum. & Thonn.) taubert from Nigeria. *Natural Product Communications*, 4(2): 287-290.
- Adams, P. (2007). Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. pp. viii + 804 pp. Allured Publishing Corporation 336 Gundersen Drive, Suite A Carol Stream, IL 60188-2403.
- Afanas'ev, I. (2010). Signaling of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(6), 361–373.
- Alreja, M., Mutalik, P., Nayar, U., Manchanda, S.K. (1984). The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain*, 20: 97-105.
- Andrade-Cetto, A. & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, (3): 325-348.
- Arab, L. (2000). Epidemiologic challenges in the study of the efficacy and safety of medicinal herbs. *Public Health Nutrition*, 3: 453–457.
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23): 2224–2234.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., (1987). Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Biochemical Journal*, 248: 973–976.
- Bagul, P.K., Middela, H., Matapally, S., Padiya, R., Bastia, T., Madhusudana, K., Reddy, B.R., Chakravarty, S., Sanjay, K., Banerjee, S. K. (2012). Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 66(3): 260–268.
- Basciano, H., Federico, L., & Khosrow, A. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*, 2 (5): 1-14.

- Bashan, N., Kovsan, J., & Kachko, I. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological reviews*, **89**: 27–71.
- Bautista, C.A., Arnaud, V.M.R., Martínez, G.G.A., Sánchez, M.P.S., Pérez, P.R. (2011). The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *Journal of Medicinal Plant Research*, **5**(15): 3404–3411.
- Bhatti, R. S. (1993). Further compositional analyses of flax: Mucilage, trypsin inhibitors and hydrocyanic acid. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **70**(9): 899–904.
- Brindis, F. (2011). Evaluación de la eficacia antihiper glucémica de *Ligusticum porteri* Coult., *Hydrangea seemannii* y *Anoda cristata* (L) Schlttdl. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from <http://www.citeulike.org/user/LNCScatalogo/article/10716051>
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., Mata, R. (2011). (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products*, **74**(3): 314–320.
- Calò, R., Visone, C.M., & Marabini, L. (2015). Thymol and *Thymus Vulgaris* L. activity against UVA- and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **791**: 30–37.
- Cao, J., Meng, S., Chang, E., Beckwith-Fickas, K., Xiong, L., Cole, R.N., Radovick, S., wondisford, F.E., He, L. (2014). Low Concentrations of Metformin Suppress Glucose Production in Hepatocytes through AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry*, **289**(30): 20435–20446.
- Carballo-Villalobos, A.I., González-Trujano, M.E., & López-Muñoz, F.J. (2014). Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. *European Journal of Pain*, **18**: 396–405.
- Carver, C., & Abrahamson, M. (2009). Educating Your Patient with Diabetes. In K. Weinger & C. A. Carver (Eds.), *Contemporary Diabetes: Educating Your Patient with Diabetes* (Humana Pre, pp. 15–27).

- Chang, C.L.T., Lin, Y., Bartolome, A.P., Chen, Y.-C., Chiu, S.-C., & Yang, W.-C. (2013). Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2013(T D), 378657.
- Chao, E.C., & Henry, R.R. (2010). SGLT2 inhibition a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(7): 551–559.
- Chauhan, A.K., & Kang, S.C. (2015). Therapeutic potential and mechanism of thymol action against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat model. *Alcohol*, 49(7): 739–745.
- Cheng, S.-M., Cheng, Y.-J., Wu, L.-Y., Kuo, C.-H., Lee, Y.-S., Wu, M.-C., Huang, C.-Y., Ting, H., Lee, S.-D. (2014). Activated apoptotic and anti-survival effects on rat hearts with fructose induced metabolic syndrome. *Cell Biochemistry and Function*, 32(2): 133–141.
- Chong, M.S., & Hester, J. (2007). Diabetic painful neuropathy: current and future treatment options. *Drugs*, 67(4): 569–585.
- Chowdhry, V., & Mohanty, B.B. (2015). Intractable hyperkalemia due to nicorandil induced potassium channel síndrome. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 18(1): 101–103.
- Cohen, S.P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348:f7656. <http://doi.org/10.1136/bmj.f7656>
- Constant-Urban, C., Charif, M., Goffin, E., Van Heugen, J.-C., Elmoualij, B., Chiap, P., Mouithys-Mickalad, A., Serteyn, D., Lebrun, p., Pirotte, B., De Tullio, P. (2013). Triphenylphosphonium salts of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides related to diazoxide targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(21): 5878–5881.
- Contreras-Díaz, D.D.D., & Cruz-Durán, R. (2014). Una especie nueva de Anoda de Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(3): 677–681.
- Cristians, S., Guerrero-Analco, J.A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R. (2009). Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of hintonia standleyana and H. latiflora: Potential

- alternatives to the use of the stem bark of these species. *Journal of Natural Products*, **72**(3): 408–413.
- Cutillo, F., D'Abrosca, B., Dellagrecia, M., Fiorentino, A., Zarrelli, A. (2006). Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. *Phytochemistry*, **67**(5): 481–485.
  - Darwish, F.M., & Reinecke, M.G. (2003). Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. *Phytochemistry*, **62**(8): 1179–1184.
  - Dey, A., & Lakshmanan, J. (2013). The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food & Function*, **4**(8): 1148–1184.
  - Divins, M. (2009). Información de mercado. *Farmacia Profesional*, **23**(6): 28–33.
  - Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L.A., Hernández-zepeda, C., Rivera-Madrid, R., Moreno-Valenzuela, O. A. (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, **31**(2): 129–135.
  - Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K., Havel, P.J. (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**(5): 911–922.
  - Ernst, E., & Pittler, M.H. (2002). Herbal medicine. *Complementary and Alternative Medicine*, **86**(1): 149–161.
  - Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R. (2012).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*, **75**(5): 968–974.
  - Ezzat, S.M., & Salama, M.M. (2014). A new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. growing in Egypt. *Natural Product Research*, **28**(11): 812–818.
  - Ferreira de Moura, R., Ribeiro, C., Aparecida de Oliveira, J., Stevanato, E., Rostom de Mello, M.A. (2009). Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *The British Journal of Nutrition*, **101**(8): 1178–1184.

- FHEUM (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- FHEUM (2013). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- Floriano-Sanchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O.N., Rocha, D., Sanchez-Gonzalez, D.J., Cardenas-Rodriguez, N., Pedraza-Chaverri, J., (2006). Nordihydro- guaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research*, **40**: 523–533.
- Forbes, J.M., & Cooper, M.E. (2013). Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*, **93**(1): 137–188.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B. (2014). Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism*, **20**(6): 953–966.
- Fontana, M., Mosca, L., Rosei, M.A., (2001). Interaction of enkephalins with oxyradicals. *Biochemical Pharmacology*, **61**: 1253–1257.
- Freeland, B., & Farber, M.S. (2015). Type 2 Diabetes Drugs A Review. *Home Healthcare Now*, **33**(6): 3014-310.
- Gallwitz, B. (2011). Glucagon-like Peptide-1 Analogues for Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*, **71**(13): 1675–1688.
- Gaona-Gaona, L., Molina-Jijón, E., Tapia, E., Zazueta, C., Hernández-Pando, R., Calderón-Oliver, M., Zarco-Márquez, G., Pinzón, E., Pedraza-Chaverri, J., (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology*, **286**: 20–27.
- Garg, S.K., & Shah, V.N. (2014). Newer Therapies for Diabetes Management. *Diabetes Technology & Therapeutics*, **16**(1): S119–S127.
- Geun Kim, H., Sun Ju, M., Keun Ha, S., Hyangsook, L., Lee, H., Sun, Y. K., Myung, S. O. (2012). Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **35**(8): 1287–1294.
- Godínez-Chaparro, B., López-Santillán, F. J., Argüelles, C.F., Villalón, C.M., Granados-Soto, V. (2013). Role of 5-HT1B/1D receptors in the reduction of

- formalin-induced nociception and secondary allodynia/hyperalgesia produced by antimigraine drugs in rats. *Life Sciences*, **92**(22): 1046–1054.
- Govindappa, M. (2015). A Review on Role of Plant(s) Extracts and its Phytochemicals for the Management of Diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolism*, **6**(7) 565. doi:10.4172/2155-6156.1000565
  - Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **103**(2): 137–149.
  - Guenther, E., Gilbertson, G. & Roman, T. (1971). Essential Oils and Related Products. *Analytical Chemistry*, **43**(5): 20.
  - Güvenlap, Z., & Demirezer, L.Ö. (2005). Flavonol Glycosides from *Asperula arvensis* L. *Turkish Journal Of Chemistry*, **29**: 163–169.
  - Harris, K.B., & McCarty, D.J. (2015). Efficacy and tolerability of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, **6**(1): 3–18.
  - Hayashi, Y., & Nakanishi, H. (2015). BK channel in microglia as a potent therapeutic molecular target for neuropathic pain. *Journal of Oral Biosciences*, **57**(3): 1–4.
  - Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., Sticher, O. (1998). Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Social Science & Medicine*, **47**(11): 1859-1871.
  - Houstis, N., Rosen, E.D., & Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, **440**(7086): 944–948.
  - Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L., (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multi-channel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 4437–4444.
  - Hunskar, S., Fasmer, O.B., & Hole, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*, **14**(1): 69–76.



- IDF (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
- IDF (2013). IDF diabetes atlas. Sixth edition.
- IDF (2015). IDF diabetes atlas. Seventh edition.
- ICH. International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Step 4 version. 13 p.
- INEGI (2013). “Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes”
- Israili, Z. H. (2011). Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Therapeutics*, **18**(2): 117–152.
- IUPAC (2008). Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, **80**(10): 2195-2230.
- Jaggi, A.S., Jain, V., & Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **25**(1): 1–28.
- Jordan, SA., Cunningham, D. G., & Marles, R.J. (2010). Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **243**(2): 198–216.
- Kalra, S. (2014). Alpha glucosidase inhibitors. *Recent Advances in Endocrinology*, **64**: 474–476.
- Kang, S.H., Kim, Y.S., Kim, E.K., Hwang, J.W., Jeong, J.H., Dong, X., Lee, J.-W., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Park, P.J. (2015). Anticancer effect of thymol on AGS gastric carcinoma cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**(4): 785–794.
- Kharroubi, A.T., & Darwish, H.M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, **6**(6): 850–867.
- Kim, H. Y., Okubo, T., Juneja, L.R., Yokozawa, T. (2010). The protective role of amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) against fructose-induced metabolic syndrome in a rat model. *The British Journal of Nutrition*, **103**(4): 502–512.

- Kishore, P., Boucai, L., Zhang, K., Li, W., Koppaka, S., Kehlenbrink, S., schiwek, A., Esterson, Y.B., Mehta, D., Bursheh, S., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R., Muzumdar, R., Schwartz, G.J., Hawkins, M. (2011). Brief report Activation of K ATP channels suppresses glucose production in humans. *Journal of Clinical Investigation*, **121**(12): 4916-4920. <http://doi.org/10.1172/JCI58035DS1>
- Konaté, K., Yomalan, K., Sytar, O., Zerbo, P., Brestic, M., Patrick, V.D., Gagniuc, P., Barro, N. (2014). Free Radicals Scavenging Capacity, Antidiabetic and Antihypertensive Activities of Flavonoid-Rich Fractions from Leaves of *Trichilia emetica* and *Opilia amentacea* in an Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2014, 867075. <http://doi.org/10.1155/2014/867075>
- Kumar, G.S., Shetty, A.K., & Salimath, P.V. (2005). Modulatory effect of fenugreek seed mucilage and spent turmeric on intestinal and renal disaccharidases in streptozotocin induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, **60**(2): 87-91.
- Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C.L., Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine. Journal of Ethnopharmacology*, **3**: 1-16.
- Li, G.Q., Kam, A., Wong, K.H., Zhou, X., Omar, E.A., Alqahtani, A., li, K.M., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K. (2012). Herbal medicines for the management of diabetes. In *Diabetes: An Old Disease, a New Insight* (Shamim I., pp. 396-413). Retrieved from
- Li, L., Shen, J., Bala, M.M., Busse, J.W., Ebrahim, S., Vandvik, P.O., Rios, L.P., Malaga, G., Wong, E., Sohani, Z., Guyatt, G.H., Sun, X. (2014). Incretin treatment and risk of pancreatitis in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of randomised and non-randomised studies. *BMJ*, **348**(apr15 2), g2366-g2366. <http://doi.org/10.1136/bmj.g2366>
- Li, L., Shi, C., Yin, Z., Jia, R., Peng, L., Kang, S., Li, Z. (2014). Antibacterial activity of a -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **45**(4): 1409-1413.

- Liao, H., Liu, H. & Yuan, K. (2012) A new flavonol glycoside from the *Abelmoschus esculentus* Linn. *Pharmacognosy Magazine*, **8** (29), 12-15.
- Linares-Mazari, E., & Bye, R. (2015). Las especies subutilizadas de la milpa. *Revista Digital Universitaria*, **16**: 1–22.
- Long, L.H., Evans, P.J., Halliwell, B., (1999). Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **262**: 605–609.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, **54**(4): 275–287.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X., Macdonald, J., Jurczak, M., Camporez, J.P., Lee, H.Y., Cline, G.W., Samuel, V.T., Kibbey, R.G., Shulman, G.I. (2014). NIH Public Access. *Nature*, **510**(7506): 542–546.
- Majumdar, S.K., & Inzucchi, S.E. (2013). Investigational anti-hyperglycemic agents: the future of type 2 diabetes therapy?. *Endocrine*, **44**(1): 47–58.
- Marks, J. B., & Raskin, P. (2000). Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *Journal of Diabetes and Its Complications*, **14**: 108–115.
- Marriot, P.J., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography. A*, **936**(1-2): 1–22.
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, **47**(2): 224-229.
- Masullo, M., Montoro, P., Mari, A., Pizza, C., Piacente, S. (2015). Medicinal plants in the treatment of women’s disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **113**: 189–211.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I. (2013). Mexican antidiabetic herbs: Valuable sources of inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases. *Journal of Natural Products*, **76**(3): 468–483.

- Matin, A., Doddareddy, M.R., Gavande, N., Nammi, S., Groundwater, P.W., Roubin, R.H., Hibbs, D.E. (2013). The discovery of novel isoflavone pan peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**(3): 766–778.
- Matin, A., Gavande, N., Kim, M.S., Yang, N.X., Salam, N.K., Hanrahan, J.R., Roubin, R.H., Hibbs, D.E. (2009). 7-Hydroxy-benzopyran-4-one derivatives: A novel pharmacophore of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $-\gamma$  (PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ ) dual agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**(21): 6835–6850.
- Medina-Campos, O.N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S., Rocha, D., Maldonado, P.D., Mendoza-Patino, N., Pedraza-Chaverri, J. (2007). Sallylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, **45**: 2030–2039.
- Michael, H.N., Salib, J.Y., & Eskander, E.F. (2013). Bioactivity of diosmetin glycosides isolated from the epicarp of date fruits, *Phoenix dactylifera*, on the biochemical profile of alloxan diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, **27**(5): 699–704.
- Michiels, C.F., Van Hove, C.E., Martinet, W., De Meyer, G.R.Y., Franssen, P. (2014). L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers inhibit the window contraction of mouse aorta segments with high affinity. *European Journal of Pharmacology*, **738**: 170–178.
- Milin, V. & Kustrak, D. (2003). Evaluation of the natural products with mucilages. *Farmaceutski Glasnik*, **59**(4): 141-149.
- Misra, M. (2013). SGLT2 inhibitors: a promising new therapeutic option for treatment of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **65**(3): 317–327.
- Morgado, C., Pinto-Ribeiro, F., & Tavares, I. (2008). Diabetes affects the expression of GABA and potassium chloride cotransporter in the spinal cord: A study in streptozotocin diabetic rats. *Neuroscience Letters*, **438**(1): 102–106.
- Murat, J.C., & Serfaty, A. (1974). Simple Enzymatic Determination of Polysaccharide ( Glycogen ) Content of Animal Tissues. *Clinical Chemistry*, **20**(12): 1576–1577.

- Naz, S., Vallejo, M., García, A., Barbas, C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*, **1353**: 99–105.
- Niu, Y., Yin, L., Luo, S., Dong, J., Wang, H., Hashi, Y., Chen, S. (2012). Identification of the anti-oxidants in Flos Chrysanthemi by HPLC-DAD-ESI/MS(n) and HPLC coupled with a post-column derivatisation system. *Phytochemical Analysis*, **24**(1): 59–68.
- Nogueira, M.N.M., Aquino, S.G., Rossa Junior, C., Spolidorio, D.M.P. (2014). Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflammation Research*, **63**(9): 769–778.
- Nuñez-López, M.A., Paredes-López, O., & Reynoso-Camacho, R. (2013). Functional and hypoglycemic properties of Nopal cladodes (*O. ficus-indica*) at different maturity stages using in vitro and in vivo tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(46): 10981–10986.
- Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V., & Patel, D.K. (2013). Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of aloin: A concise report. *Journal of Acute Disease*, **19**(10): 792–800.
- Pferschy-Wenzig, E.-M., & Bauer, R. (2015). The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. *Epilepsy & Behavior*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.037>
- Prabhakar, P.K., & Doble, M. (2011). Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **17**(8): 563–574.
- Rahimi, M. (2015). A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, **4**(2): 163–180.
- Rates, S.M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**(5): 603–613.
- Rendon, B., Bye, R. & Núñez-Farfán, J. (2001). Ethnobotany of *Anoda Cristata* (L.) Schl. (Malvaceae) in Central Mexico: Uses, Management and Population

- Differentiation in the Community of Santiago Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico. *Economic Botany*, **55**(4): 545–554.
- Rodríguez-Morán, M., Guerrero-Romero, F., & Lazcano-Burciaga, G. (1998). Lipid- and glucose-lowering efficacy of Plantago Psyllium in type II diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, **12**(5): 273–278.
  - Rodríguez-Saldaña, J., & Mejía-Pedraza, B. (2006). Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). *Boletín Práctica Médica Efectiva*. México.
  - Rutten, K., Tzschentke, T.M., Koch, T., Schiene, K., Christoph, T. (2014). Pharmacogenomic study of the role of the nociceptin/orphanin FQ receptor and opioid receptors in diabetic hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*, **741**: 264–271.
  - Sadraei, H., Asghari, G., & Kasiri, F. (2015). Comparison of antispasmodic effects of Dracocephalum kotschyi essential oil , limonene and  $\alpha$  -terpineol. *Research in Pharmaceutical Sciences*, **10**(2): 109–116.
  - Sakai, K., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Suefujii, M., Nakamaru, K., Hirashima, Y., Kawashima, J., Shirotani, T., Ichinose, K., Brownlee, M., Araki, E. (2003). Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **300**(1): 216–222.
  - Scheen, A.J. (2015). Pharmacodynamics, Efficacy and Safety of Sodium–Glucose Co-Transporter Type 2 (SGLT2) Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*, **75**(1): 33–59.
  - Seo, E., Lee, E.-K., Lee, C. S., Chun, K.-H., Lee, M.-Y., Jun, H.-S. (2014). Psoralea corylifolia L. Seed Extract Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice by Inhibition of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/897296>
  - Shetti, S., Kumar, C.D., Sriwastava, N.K., & Sharma, I.P. (2011). Pharmacovigilance of herbal medicines: Current state and future directions. *Pharmacognosy Magazine*, **7**(25): 69–73.

- Singh, K., Kumar, A., Langyan, N., & Ahuja, M. (2009). Evaluation of Mimosa pudica seed mucilage as sustained-release excipient. *AAPS PharmSciTech*, **10**(4): 1121–1127.
- Sola, D., Rossi, L., Schianca, G.P.C., Maffioli, P., Bigliocca, M., Mella, R., Corlianò, F., Fra, G.P., Bartoli, E., Derosa, G. (2015). State of the art paper Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science*, **4**: 840–848.
- Sommer, C. (2004). Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Molecular Neurobiology*, **30**(2): 117–125.
- Soumyanath, A. (2006). Traditional Herbal Medicines for Modern Times. Antidiabetic Plants. (R. Hardman, Ed.) *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). USA: Taylor & Francis Group.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., & Castilho, P.C. (2014). Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. *Journal of Chromatography. A*, **1369**: 2–17.
- Spiteller, G. (2008). Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the Maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1126**: 128–133.
- Stonehouse, A.H., Darsow, T., & Maggs, D.G. (2012). Incretin-based therapies. *Journal of Diabetes*, **4**(1): 55–67.
- Street, R.A., Stirk, W.A., & Van Staden, J. (2008). South African traditional medicinal plant trade-Challenges in regulating quality, safety and efficacy. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**(3): 705–710.
- Sudberg, S., Sudberg, E.M., Terrazas, J., Sudberg, S., Patel, K., Pineda, J., Fine, B. (2010). Fingerprint analysis and the application of HPTLC to the determination of identity and quality of botanicals, from an industry perspective. *Journal of AOAC International*, **93**: 1367–1375.
- Tesfaye, S., & Selvarajah, D. (2012). Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, **28**: 8–14.



- Tokunaga, A., Saika, M., & Senba, E. (1998). 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain*, **76**(3): 349–355.
- Van de Laar, F.A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, **4**: 1189–1195.
- Veshkurova, O., Golubenko, Z., Pshenichnov, E., Arzanova, I., Uzbekov, V., Sultanova, E., Salikhov, S., Williams, H.J., Reibenspies, J.H., Puckhaber, L.S., Stipanovic, R.D. (2006). Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (family Malvaceae). *Phytochemistry*, **67**(21): 2376–2379.
- Viguier, F., Michot, B., Hamon, M., & Bourgoin, S. (2013). Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types. *European Journal of Pharmacology*, **716**(1-3): 8–16.
- Villaseñor R., J. L., Espinosa G. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Wawer, I., & Zielinska, A. (2001). <sup>13</sup>C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **39**: 374–380.
- WHO (1999). WHO monographs on selected medicinal plants, Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WHO (2002a). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra: World Health Organization. 74.
- WHO (2002b). WHO monographs on selected medicinal plants, Geneva, Switzerland, World Health Organization
- WHO (2007). WHO monographs on selected medicinal plants, Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WHO (2009). WHO monographs on selected medicinal plants, Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WHO (2010). WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS), Geneva, Switzerland, World Health Organization.



- Winkler, M., Stephan, D., Bieger, S., Kühner, P., Wolff, F., Quast, U. (2007). Testing the bipartite model of the sulfonylurea receptor binding site: binding of A-, B-, and A + B-site ligands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **322**(2): 701–708.
- Xie, Y., Jiang, Z.-H., Zhou, H., Cai, X., Wong, Y.-F., Liu, Z.-Q., Bian, Z.X., Xu, H.X., Liu, L. (2007). Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**(1): 204–212.

## 8. ANEXO I.

**PUBLICACIÓN: Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*.**

Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology*, **161**, 36–45.



## Research Paper

Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata* ☆

Krutzkaya Juárez-Reyes<sup>a</sup>, Fernando Brindis<sup>a</sup>, Omar N. Medina-Campos<sup>a</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>a</sup>, Robert Bye<sup>b</sup>, Edelmira Linares<sup>b</sup>, Rachel Mata<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 August 2014

Received in revised form

18 November 2014

Accepted 29 November 2014

Available online 6 December 2014

## Keywords:

*Anoda cristata*

Acacetin

Diosmetin

Hypoglycemic

Antihyperglycemic

## Chemical compounds studied in this article:

Acacetin (PubChem CID: 480-44-4)

Diosmetin (PubChem CID: 530-34-3)

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Some studies refer that the entire plant of *Anoda cristata* is consumed as food and medicine; in particular for treating diabetes, inflammation, fever, cough, and wounds. The aim of this study was to establish the preclinical efficacy of *Anoda cristata* as hypoglycemic and/or antihyperglycemic agent using well-known animal models.

**Materials and methods:** The acute toxicity was analyzed by the Lorke method. Acute hypoglycemic as well as oral glucose and sucrose tolerance tests were used to determine the hypoglycemic and antihyperglycemic action of *Anoda cristata*. Several preparations of the plant, including a mucilage (M), an aqueous (T-AE), a free mucilage aqueous (FM-AE), and an organic (OE) extracts, were tested in healthy and NA-STZ-hyperglycemic mice. Glibenclamide (15 mg/kg), acarbose (5 mg/kg) and metformin (200 mg/kg) were used as positive controls. The major compounds acacetin (**1**) and diosmetin (**2**), isolated from an infusion of the plant applying chromatographic methods, were evaluated as hypoglycemic agents using the same assays. The FM-AE was tested also in rats with metabolic syndrome induced by a high-fructose fed. Finally some assays were performed to determine the antioxidant capacity of the FM-AE *in vitro*.

**Results:** The results demonstrated that the extracts and compounds from *Anoda cristata* were effective for reducing blood glucose levels in healthy and NA-STZ-hyperglycemic mice when compared with vehicle groups ( $p < 0.05$ ). The FM-AE exerted also positive effect over different biochemical parameters altered in rats with metabolic syndrome induced by a fructose diet. FM-AE has also antioxidant action effectively trapping ONOO<sup>-</sup> and ROO<sup>•</sup> radicals. The major flavonoids isolated from the plant, namely acacetin (**1**) and diosmetin (**2**), caused significant hypoglycemic effect and possessed antioxidant activity. **Conclusion:** *Anoda cristata* is effective to diminish glucose levels *in vivo* and to ameliorate different disorders related with the metabolic syndrome in rats. According to the results, the efficacy of *Anoda cristata* preparations could be due to the presence of active principles with different mode of actions at the molecular level, including  $\alpha$ -glycosidases inhibitors, insulin secretagogues, glucose entrapment and radical trapping agents.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** IDF, International Diabetes Federation; GLI, glibenclamide; STZ, streptozotocin; NA, nicotinamide; T-AE, total aqueous extract; FM-AE, free mucilage aqueous extract; M, mucilage; OP-AE, organic phase of free mucilage aqueous extract; OE, organic extract; OGTT, oral glucose tolerance test; OSTT, oral sucrose tolerance test; MS, metabolic syndrome

☆ Taken in part from the Ph.D. thesis of K. Juárez-Reyes

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5289; fax: +52 55 5622 5329.

E-mail address: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx) (R. Mata).

## 1. Introduction

Metabolic syndrome is a multiplex risk factor that arises from insulin resistance accompanying abnormal adipose deposition and function. It is a risk factor for coronary heart disease, as well as for diabetes, fatty liver, and several cancers. The underlying causes of metabolic syndrome include overweight and obesity, physical inactivity and genetic factors. According to the International Diabetes Federation (IDF), 382 million people of the world population suffer from diabetes, 90% of which are affected by type 2 diabetes mellitus. The incidence of this illness is increasing rapidly, and it is estimated that by 2035 this will rise to 592

million people. Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic high blood glucose levels, and alterations of carbohydrate, fat and protein metabolisms due to deficiencies in insulin secretion and/or action. The hyperglycemic condition promotes protein glycation, which in turn causes tissue damage and different complications including heart and peripheral vascular complaints, retinopathy, nephropathy and neuropathy.

There is no cure for type 2 diabetes mellitus, but the condition can be managed by changing patients lifestyle, and using treatments for keeping blood glucose level within the normal range to prevent the development of long-term effects. Oral medications are available to lower hyperglycemia, but these products possess side effects after prolonged use (Moller, 2001; Aicher et al., 2010; Tahrani et al., 2011). In consequence, the need for the search for new therapeutic options, including plants commonly consumed as food and medicine, has increased notably (Campbell-Tofte et al., 2012). Mexico is rich in edible medicinal plants highly prized by the population for the treatment of diabetes but only a few of these have been investigated for their preclinical or clinical efficacy (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Alarcón-Aguilar and Roman-Ramos, 2006; Mata et al., 2013). *Anoda cristata* (L.) Schlttdl. (Malvaceae) is among these species. According to Rendón et al. (2001), *Anoda cristata* grows in different environments throughout Mexico where it is commonly known as “alache”, “quelite” (edible plant or herbal food), and field poppy. A few ethnobotanical studies refer the use of *Anoda cristata* as food. Thus, young, tender leaves and buds are consumed as “quelites” and can be eaten alone or combined with squash, beans, or corn (Rendón et al., 2001). The entire plant, including flowers, is used with other plants to treat stomach inflammation, fever, cough, and wounds. An infusion prepared from the dry aerial parts (a feast, ~10 g in 1 L of water) of the plant is also employed as drinking water for treating diabetes. In addition, the above ground plant is frequently used as forage for cattle. As other plants of the Malvaceae, *Anoda cristata* contains high amounts of mucilages (Rendón et al., 2001; Echevarría-Machado et al., 2005; Bautista-Cruz et al., 2011).

As part of our systematic investigation of Mexican medicinal flora as source of new alternative treatments for type 2 diabetes mellitus, in this work we describe the hypoglycemic, and anti-hyperglycemic action of *Anoda cristata* using different animal models.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and solvents

Dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), hexane, and ethanol, analytical or HPLC grade, were purchased from Merck, Darmstadt, Germany; acarbose, glibenclamide (GLI), metformin, nicotinamide (NA), streptozotocin 98% (STZ), sucrose, glucose, and Tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Commercial fructose (Savien, KMD, Mexico City, Mexico) was employed.

### 2.2. Experimental animals and ethical aspects

The toxicity studies and antidiabetic tests were performed on male mice ICR (body weight range, 25–30 g); metabolic syndrome-induced rats were accomplished with male Sprague Dawley rats (body weight range 220–260 g). Both types of animals were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan Laboratories SA de CV, Mexico). The animals were housed in groups of 10 mice or two rats under standard laboratory conditions (12 h light–dark cycle under controlled temperature,  $22 \pm 1$  °C) and maintained on a standard pellet diet and water *ad libitum*. After the experiments,

all animals were sacrificed in a  $\text{CO}_2$  chamber. All experimental procedures involving animals and their maintenance were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with the international rules on care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used ( $n=8$ ) as well as any discomfort. The animal protocols (FQ/CICUAL/085/14, and FQ/CICUAL/086/14) for this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Facultad de Química-UNAM.

### 2.3. Plant material

The aerial parts of *Anoda cristata* were collected in Tepeaca (Puebla, Mexico) in November 2012. A plant specimen was authenticated by Professors Robert Bye and Edelmira Linares and deposited at the ethnobotanical collection of the National Herbarium (MEXU), UNAM, Mexico City (Voucher no: 2755).

### 2.4. Extracts preparation

The plant material was dried and grounded using a Thomas Willey laboratory mill (mesh size 2 mm). Dried and pulverized *Anoda cristata* plant material (50 g) was extracted with 2 L of boiling water during 30 min. After filtration, the infusion was evaporated to dryness under reduced pressure to give 6.0 g of total aqueous extract (T-AE). The procedure was repeated as needed. In order to obtain the free mucilage aqueous extract (FM-AE), the infusion was treated with ethanol in 1:1 ratio; the resulting precipitate (mucilage) was removed by centrifugation (10,000g; 20 min) (Bhatty, 1993), and the supernatant was evaporated to dryness under reduced pressure to give a free mucilage aqueous extract. For each 6 g of total aqueous extract, 4.75 g of FM-AE was obtained. The procedure was repeated as needed.

### 2.5. Isolation of acacetin (1) and disometin (2)

#### 2.5.1. General experimental procedures

Melting points were determined using a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. NMR spectra were recorded using a Varian Unity Plus 400 spectrometer, at either 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), in  $\text{DMSO}-d_6$ ; tetramethylsilane (TMS) was employed as internal standard. Open column chromatography was carried out on silica gel 60, 70–230 mesh (Merck, Darmstadt, Germany). Thin layer chromatography analyses were performed on silica gel 60  $\text{F}_{254}$  plates (Merck, Darmstadt, Germany), and visualization of the plates was carried out using a ceric sulfate (10%) solution in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

#### 2.5.2. Isolation and characterization of compounds 1 and 2

170 g of FM-AE were re-suspended in distilled water and partitioned with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 L  $\times$  3) and EtOAc (1 L  $\times$  3). The organic phases were combined and concentrated *in vacuo* to yield a brown residue (OP-AE, 2.152 g). 400 mg of which were subjected to open column chromatography on silica gel, and eluting with a gradient of hexane–EtOAc (10:0–0:10) and EtOAc–MeOH (10:0–0:10) to yield 17 secondary fractions ( $\text{F}_1$ – $\text{F}_{17}$ ). From fractions  $\text{F}_8$  and  $\text{F}_{11}$  crystallized 20 mg of acacetin (1) and 25 mg of diosmetin (2), respectively, which were the two major components of OP-AE (Fig. S1). The mother liquors were not further processed. The structures of compounds 1 and 2 (Fig. 1) were established by spectroscopic and spectrometric analyses and compared with literature data (Wawer and Zielinska, 2001; Park et al., 2007).

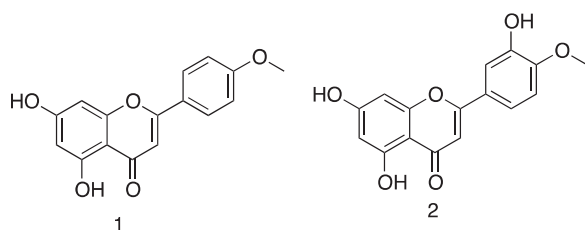


Fig. 1. Chemical structures of acacetin (1) and diosmetin (2).

## 2.6. Acute toxicity assay

Mice were divided into control and test groups ( $n=3$ ) and treated in two phases according to the Lorke protocol. In the first one, the control group and the test groups received intragastric doses of vehicle, 10, 100 and 1000 mg/kg of T-AE, FM-AE, M or OE. In the second, the animals received doses of 1600, 2900 and 5000 mg/kg of the same treatments. In each phase, mice were observed daily during 14 days for mortality, toxic effects and/or changes in behavioral pattern. At the end of the each phase the animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and the main organs (liver, heart, lung, spleen and kidneys) were observed macroscopically and compared with those of the control group (Lorke, 1983).

## 2.7. Pharmacological evaluations

### 2.7.1. Preparation of test samples

All treatments (T-AE, FM-AE, M, OE and compounds 1 and 2) were suspended in saline solution with 0.05% Tween 80 (vehicle) for oral administration (*po*). As a hypoglycemic positive control, GLI was used at the dose of 15 mg/kg. Acarbose was employed as an antihyperglycemic drug at the dose of 5 mg/kg. Glucose (1 g/kg) and sucrose (3 g/kg) were used as carbohydrates to carry out the glucose and sucrose tolerance tests, respectively.

### 2.7.2. Induction of hyperglycemia in mice, acquisition of blood samples and measurement of blood glucose levels

To induce a hyperglycemic condition in mice, first an *ip* administration of NA (50 mg/kg) dissolved in saline solution was used (Masiello et al., 1998). 15 min later a single intraperitoneal injection (*ip*) of freshly prepared STZ (130 mg/kg) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 was administered. One week later, mice with blood glucose levels higher than 150 mg/dL were considered hyperglycemic and included in the study. Blood samples were obtained from the caudal vein by means of a small incision at the end of the tail. A commercial glucometer One Touch Ultra 2 (Johnson & Johnson, Milpitas, CA, USA) was used to estimate the blood glucose levels (mg/dL) by the enzymatic glucose oxidase method. For each treatment was calculated the percentage variation of glycemia with respect to the initial (0 h) level, according to the following equation: % variation of glycemia =  $[(G_t - G_i)/G_i] \times 100$ , where  $G_i$  is initial glycemia value and  $G_t$  is the glycemia value after treatment administration (Escandón-Rivera et al., 2012).

### 2.7.3. Acute hypoglycemic assay

Healthy or NA-STZ-hyperglycemic mice were treated with T-AE, FM-AE, M (31.6, 100, and 316 mg/kg of body weight), 1 or 2 (3, 10 and 31.6 mg/kg of body weight). Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after treatment administration. GLI (15 mg/kg, *po*) was used as positive control and saline solution as vehicle control. The hypoglycemic response was evaluated using the total area under the curve by the trapezoidal method (Escandón-Rivera et al., 2012).

### 2.7.4. Oral glucose tolerance test (OGTT)

Groups of eight healthy or NA-STZ-hyperglycemic mice were placed in acrylic boxes. All groups were put on fast during 4 h before the experiments, with water *ad libitum*. The preparations (T-AE, FM-AE, M) from *Anoda cristata* were tested at doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg of body weight, *po*; metformin (200 mg/kg) was suspended in the same vehicle. Time 0 min was set before treatment with the extract or compounds; 30 min later a glucose load (1 g/kg) was administered *po* to the animals. Blood samples were obtained 30, 60, 90, 120, and 180 min, and the % variation of glycemia was calculated.

### 2.7.5. Oral sucrose tolerance test (OSTT)

The assay was performed using the same methodology described for the OGTT but using sucrose (3 g/kg of body weight) as the carbohydrate. In this experiment the extracts (T-AE, FM-AE, M and OE) were tested in healthy and hyperglycemic animals. In both cases the doses were 31.6, 100 and 316 mg/kg or 31.6, 56.2 and 100 mg/kg for OE. As positive control acarbose was used (5 mg/kg, *po*). The % variation of glycemia was calculated for all treatments.

### 2.7.6. Induction of metabolic syndrome (MS) in Sprague Dawley rats

After adaptation during seven days, rats were randomly divided into four groups ( $n=8$ ) and housed as couples in acrylic cages. Rats were fed with regular rodent chow (2018S pellets: 44.2% carbohydrate, 18% protein, 6.2% fat; 3.1 kcal/g; Teklad Global Diets, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA). In addition, group I (vehicle control) received water, and groups II–IV were fed with regular rodent chow and 10% fructose solution as drinking water. The fructose solution was administered throughout the experiment. The animals were weighed and measured (nose to anus length) at the beginning and at the end of the experiment period; Lee index was calculated dividing the cubic root of the final body weight (g) by the final body length (cm) and multiplying by 1000. The period for inducing metabolic syndrome was 12 weeks (Ferreira de Moura et al., 2009). The bottles of water or fructose solution were refilled each 2 days. The differences between the full bottles and the content 48 h later were considered as the amount of fructose solution ingested during the period.

#### 2.7.6.1. Oral glucose tolerance test in MS-induced rats. OGTT was

conducted as previously described. Fasting (4 h) 12 weeks metabolic syndrome-induced rats were divided in groups ( $n=8$ ). Group I was used as vehicle control group, group II as fructose control group both received vehicle (saline solution, *po*) and groups III and IV were treated with FM-AE (100 mg/kg and 316 mg/kg, *po*; 0.2 mL/100 g bw). Basal glycemia was recorded before intragastric administration of treatments; 30 min later all animals received a glucose load (2 g/kg bw, *po*). Blood samples were collected at 30, 60, 90, and 120 min after glucose load. Percentage variation of glycemia was calculated as previously described for mice.

#### 2.7.6.2. Effects of daily treatment with FM-AE in MS-induced

rats. After the OGTT, the animals were allowed to recover during six days while receiving water or fructose solution in their diet. Week 14 (day 98) animals from groups III and IV were treated during seven days with free mucilage dry aqueous extract (FM-AE) of *Anoda cristata* (100 mg/kg and 316 mg/kg, *po*,  $n=8$ ) while maintaining the fructose administration diet. Group I was treated with vehicle (*po*), water and normal diet, whereas group II with vehicle (*po*) and fructose solution as drinking water till day 104.



**2.7.6.3. Collection of blood and liver samples.** At day 105, all animals were fasted for 4 h, with free access to water, and anesthetized with an intramuscular injection of ketamine–xylazine (80–10 mg/kg) to obtain blood with retro-orbital puncture. The serum was separated of blood by centrifuging (3000g, 5 min). After collecting blood samples, livers were excised immediately. All serum and tissue samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use for determination of biochemical parameters.

**2.7.6.4. Biochemical parameters determination.** The serum total cholesterol, triglycerides, uric acid and glucose levels were determined using colorimetric reactions with commercial kits (RANDOX Laboratories, Antrim, United Kingdom).

**2.7.6.5. Measurement of hepatic glycogen content.** Hepatic glycogen content was analyzed according to the procedure of Murat and Serfaty, 1974. Briefly, 50 mg of liver samples was homogenized in 1 mL of ice-cold citrate buffer (0.1 M, pH 4.2). Homogenates were diluted with citrate buffer to obtain a concentration of 5 mg/mL. 10  $\mu\text{L}$  of this dilution was mixed with 10  $\mu\text{L}$  of amyloglucosidase (exo-1,4- $\alpha$ -glucosidase, EC 3.2.1.3; 1 mg/mL, Sigma-Aldrich). The mixture was allowed to stand at room temperature for 2 h. A sample (10  $\mu\text{L}$ ) was used to determine free glucose using a Trinder GOD–POD method (Spinreact, Spain).

**2.7.6.6. Serum insulin levels.** The insulin levels were estimated using the Rat Insulin Enzyme Immunoassay Method (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA).

## 2.8. In vitro antioxidant activity

### 2.8.1. $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging assay

The xanthine–xanthine oxidase system was used to determine the  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging capacity of the extract. Generation of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and xanthine oxidase activity were measured as the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT at 560 nm) and uric acid (at 295 nm) production, respectively, by using a spectrophotometer (DU-640 series Beckman) as previously described (Gaona-Gaona et al., 2011). Nordihydroguaiaretic acid was used as standard (Fontana et al., 2001). All tests were performed in triplicate. The results were expressed as percent of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging capacity of FM-AE (40–4000  $\mu\text{g}$ ).

### 2.8.2. $\cdot\text{OH}$ scavenging capacity

The ability of FM-AE to scavenge hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) was assessed using the  $\text{Fe}^{3+}$ –EDTA– $\text{H}_2\text{O}_2$ –deoxyribose system following a well described method (Floriano-Sanchez et al., 2006);  $\cdot\text{OH}$  was generated by  $\text{Fe}^{3+}$ –EDTA– $\text{H}_2\text{O}_2$  reaction and terephthalic acid (TA) was used to assess the radical generation (Gaona-Gaona et al., 2011). The extent of deoxyribose degradation by the formed  $\cdot\text{OH}$  was measured directly in the aqueous phase by the thiobarbituric acid (TBA) test measuring the optical density at a wavelength of 532 nm using a Genesys 8 spectrophotometer. Dimethylthiourea was used as standard for  $\cdot\text{OH}$  scavenging.

### 2.8.3. Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) scavenging capacity

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) scavenging activity was executed as previously described (Floriano-Sanchez et al., 2006) by monitoring fluorescein formation from 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCF). DL-penicillamine was used as reference compound.

### 2.8.4. $\text{H}_2\text{O}_2$ scavenging assay

The scavenging capacity was evaluated applying the method described by Long et al. (1999) using the FOX reagent (xylene orange, ammonium ferrous sulfate and  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). The concentration

of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was recorded at 560 nm. Sodium pyruvate was used as standard.

### 2.8.5. Singlet oxygen scavenging assay

The production of singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) by sodium hypochlorite and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was determined using a spectrophotometric method (Medina-Campos et al., 2007). The  $^1\text{O}_2$  scavenging assay is based on N,N-dimethyl-p-nitrosoaniline (DMNA) bleaching in the presence of  $^1\text{O}_2$ . The extent of  $^1\text{O}_2$  production and the effect of extract on it were determined by measuring the decrease in the absorbance of DMNA at 440 nm. The relative scavenging efficiency (% inhibition in production of  $^1\text{O}_2$ ) was estimated from the difference in absorbance of DMNA with and without the addition of increasing amounts of FM-AE. Glutathione was used as a reference.

### 2.8.6. Hypochlorous (HOCl) scavenging assay

For HOCl scavenging assay, the catalase method was utilized. The peak of catalase disappeared at 404 nm with HOCl, indicating protein oxidation. Experiments were carried out as previously described (Aruoma and Halliwell, 1987). Lipoic acid was used as reference compound.

### 2.8.7. Peroxyl radical ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) scavenging assay

For  $\text{ROO}^{\cdot}$  scavenging the ORAC fluorometric assay was used (Huang et al., 2002). In this assay, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used as peroxyl radical generator; Trolox was used as standard and fluorescein was used as fluorescent probe. Fluorescence was read each minute using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm using a Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, VA, USA). The change of fluorescence intensity is an index of the degree of free radical damage.

## 2.9. Statistical analysis

The data obtained were analyzed by the Prism program Version 4.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and expressed as the means  $\pm$  SEM of 8 animals in each group. To determine statistically significant differences between groups an ANOVA (one or two ways) was used followed by Dunnett's or Bonferroni *post-hoc* tests;  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Acute toxicity study in mice

Since *Anoda cristata* is a weed frequently employed by humans as medicine and food, the first step in this investigation was to assess the potential acute toxic effect in mice of a few extracts of the aerial parts of the plant (T-AE, FM-AE, M and OE). For this endeavor, the Lorke procedure was employed (Lorke, 1983). The different treatments did not provoke animal death, behavioral alterations, lesions, or bleeding of the internal tissues and organs of the animals. Thus, none of the extracts tested were toxic according to the Lorke criteria. These results are consistent with the safe consumption of this edible green indigenous species, which according to a previous study possesses high protein content (Rendón et al., 2001; Bautista-Cruz et al., 2011).

### 3.2. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects in mice of *Anoda cristata* extracts

In order to establish the potential of *Anoda cristata* for treating diabetes, different assays were performed using a well-known

A-STZ-hyperglycemic mice model (Masiello et al., 1998). Experimental induction of type 2 diabetes was achieved by treating mice with streptozotocin (STZ, 130 mg/kg), 15 min after an injection of nicotinamide (NA, 50 mg/kg). The treatment with NA provokes partial protection against the cytotoxic action of STZ by scavenging free radicals. In turn, this action causes minor damage to pancreatic  $\beta$ -cells creating a hyperglycemic condition similar to type 2 diabetes (Mythili et al., 2004). The doses of NA and STZ used were in the range usually reported to induce a hyperglycemic condition in different experimental animals (Fröde and Medeiros, 2008).

Oral administration of T-AE, FM-AE, M (31.6, 100 and 316 mg/kg) or OE (31.6, 56.2 and 100 mg/kg) caused significant reduction in blood glucose levels in healthy (Fig. S2) and NA–STZ treated (Fig. 2) mice when compared with vehicle-treated group. The best hypoglycemic effect was observed with FM-AE (Fig. 2B); on the other hand, M showed better hypoglycemic action than T-AE (Fig. 2C and A). The results for M are in agreement with the beneficial effect of mucilages for ameliorating blood glucose levels in hyperglycemic rodents and humans (Nuñez-López et al., 2013; Rodríguez-Morán et al., 1998; Kumar et al., 2005). Mucilages are naturally occurring, high molecular weight polysaccharides consisting of sugars and uronic acid units (Singh et al., 2009). In a recent paper, Nuñez-López et al. (2013) suggested that the glucose lowering effect of these products is associated with a glucose entrapment mechanism, due to the viscosifying and swelling properties of these substances.

Next, T-AE, FM-AE, and M (31.6, 100 and 316 mg/kg) were assayed using an OGTT; the results (Figs. 3–5) indicated that they lowered blood glucose levels in healthy and hyperglycemic mice. Those effects can be only explained in terms of an inhibitory action of glucose transport and/or with a glucose entrapment mechanism in the case of M (Nuñez-López et al., 2013). The extracts (31.6, 100 and 316 mg/kg for T-AE and M; and 31.6, 56.2 and 100 mg/kg for OE) were tested also by means of an OSTT. This test is performed usually to assess if the antihyperglycemic effect of a drug implicates inhibition of intestinal  $\alpha$ -glycosidases; these enzymes catalyze carbohydrate breakdown into monosaccharides in order to facilitate their absorption. The results illustrated in Figs. 6–8 revealed that all preparations tested were antihyperglycemic in healthy and hyperglycemic mice; in this case the rate of glucose absorption into the bloodstream was reduced. Therefore, an inhibitory effect on intestinal  $\alpha$ -glycosidases might be involved in the antihyperglycemic action of the extracts. The lower effect displayed by the mucilage in the OSTT, in particular in diabetic animals, suggests a glucose trap mechanism. Altogether, the results revealed that *Anoda cristata* extracts possess significant antihyperglycemic and hypoglycemic actions.

### 3.3. Hypoglycemic effect of compounds 1 and 2

Next, the two major flavonoids of the aqueous extract (Fig. S1), namely acacetin (1) and diosmetin (2), were isolated,

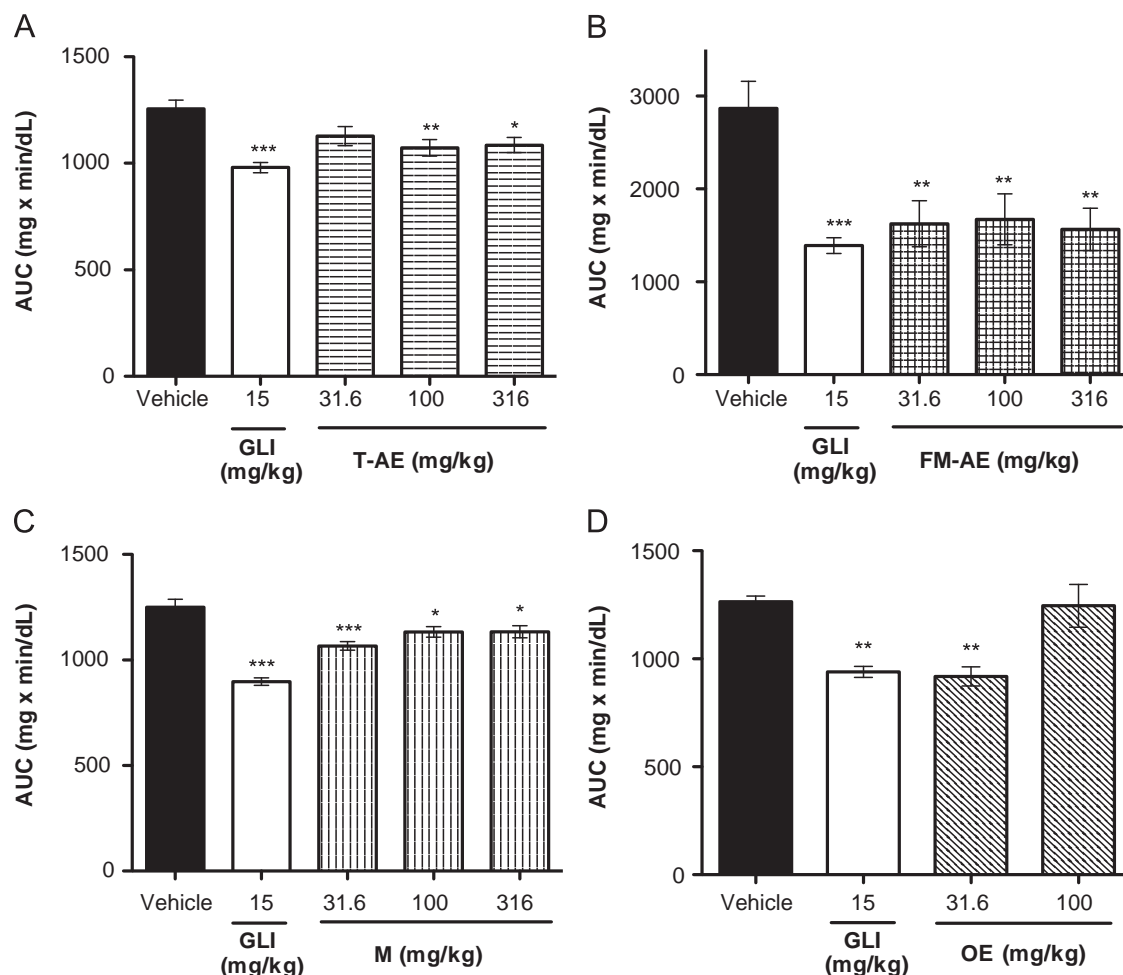
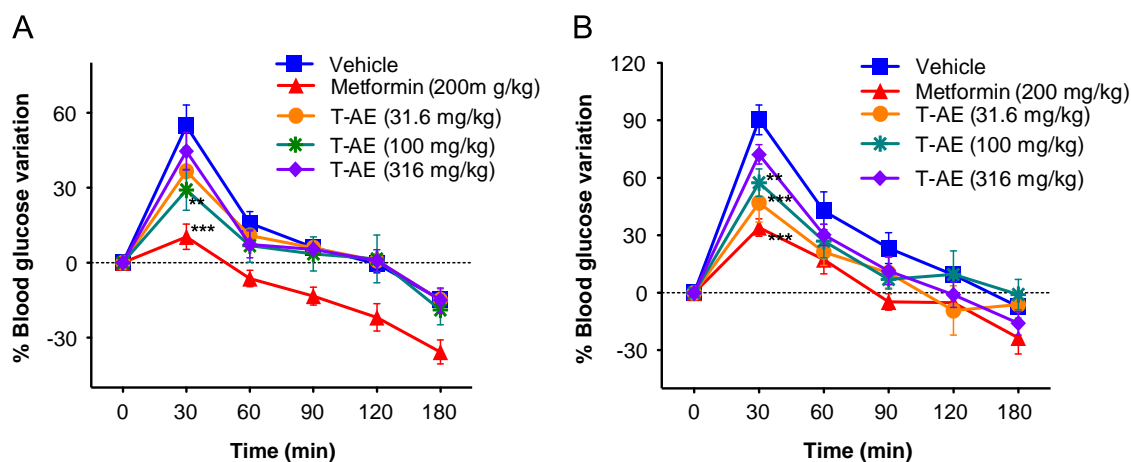
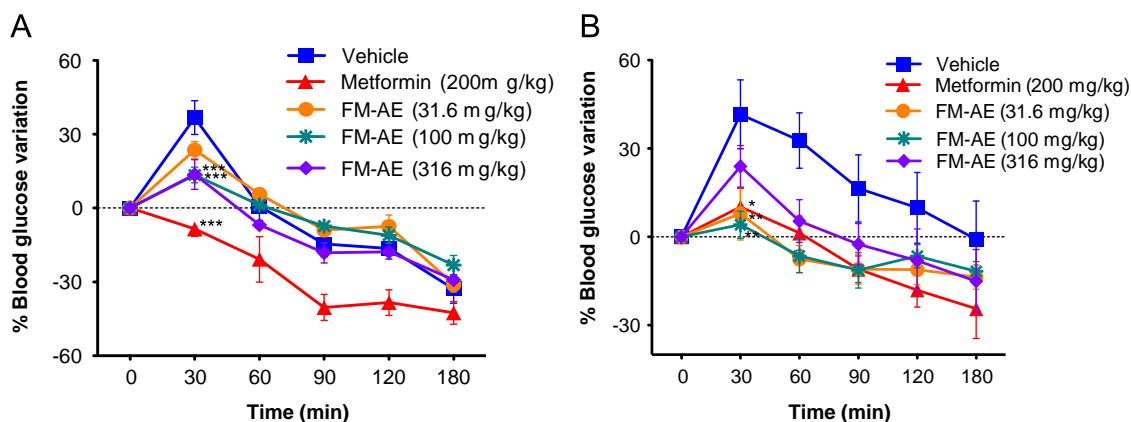


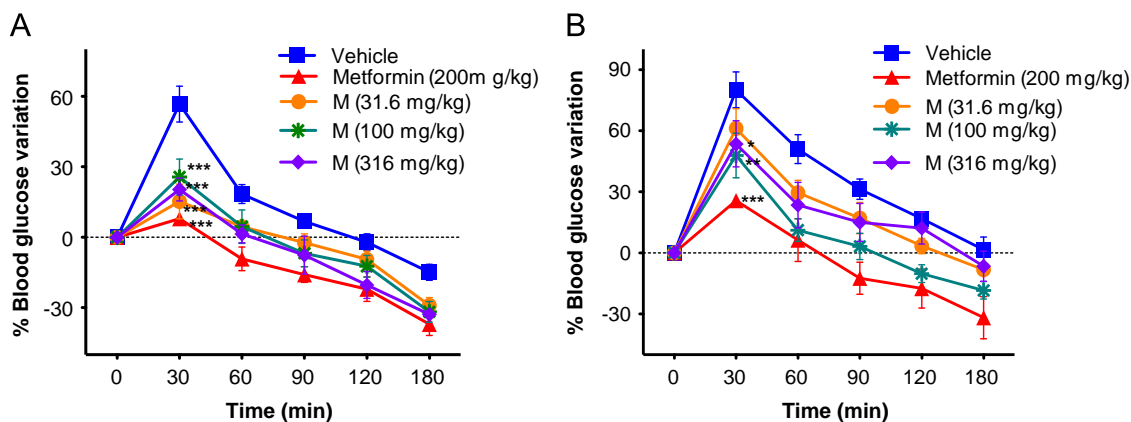
Fig. 2. Hypoglycemic actions of (A) T-AE, (B) FM-AE, (C) M and (D) OE in NA–STZ hyperglycemic mice. Bars represent the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Dunnett's test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.



**Fig. 3.** Influence of the T-AE on postprandial blood glucose levels in healthy (A) and NA-STZ hyperglycemic (B) mice during an OGTT. Values are presented as the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.



**Fig. 4.** Influence of FM-AE on postprandial blood glucose levels in healthy (A) and NA-STZ hyperglycemic (B) mice during an OGTT. Values are presented as the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.



**Fig. 5.** Influence of M on postprandial blood glucose levels in healthy (A) and NA-STZ hyperglycemic (B) mice during an OGTT. Values are presented as the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.

characterized and tested in an acute hypoglycemic assay. Compound **1** (3 and 31.6 mg/kg) caused significant decrease in blood glucose levels in healthy and hyperglycemic mice when compared with vehicle-treated groups; compound **2** (3, 10 and 31.6 mg/kg) was active at all doses tested in healthy mice, but in hyperglycemic animals was active only at the lower dose (Figs. 9 and 10). Both compounds have previously shown biological activities related with their antidiabetic potential. Thus, a few diosmetin glycosides

induced a decrease in blood glucose, cholesterol and triglycerides levels in diabetic rats; these glycosides provoked also an increment of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in liver (Michael et al., 2013). In other studies, it was found that plant extracts containing diosmetin and acacetin were insulinotropic and antihyperglycemic (Stefkov et al., 2011). Furthermore, the antiglycaemic activity induced by an *Artocarpus heterophyllus* extract has been attributed to its content of diosmetin (**2**) and other flavonoids (Deve



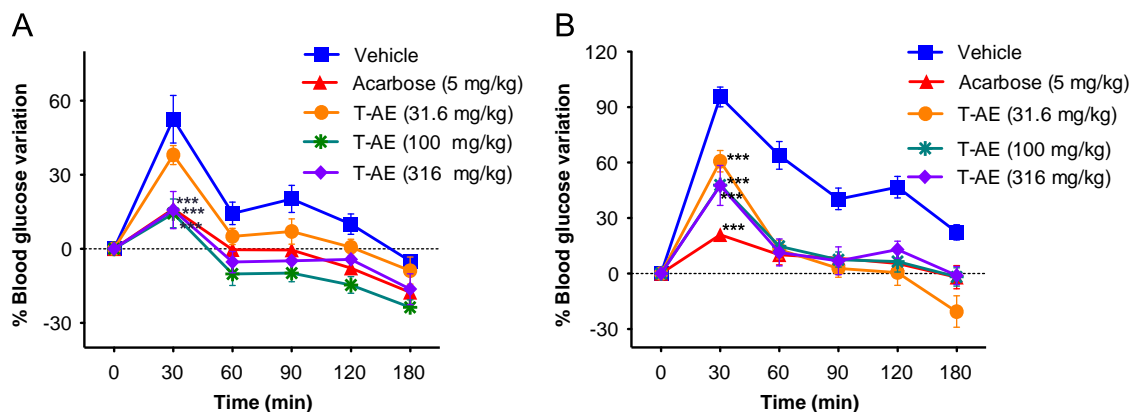


Fig. 6. Influence of T-AE on postprandial blood glucose levels in healthy (A) and NA-STZ hyperglycemic (B) mice during an OSTT. Values are presented as the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.

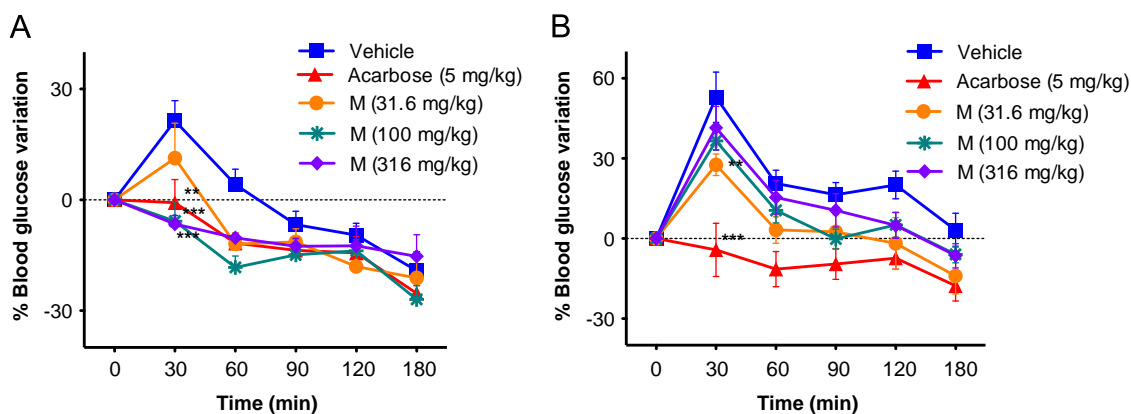


Fig. 7. Influence of M on postprandial blood glucose levels in healthy (A) and NA-STZ hyperglycemic (B) mice during an OSTT. Values are presented as the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. \*, \*\*, \*\*\* denotes significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.

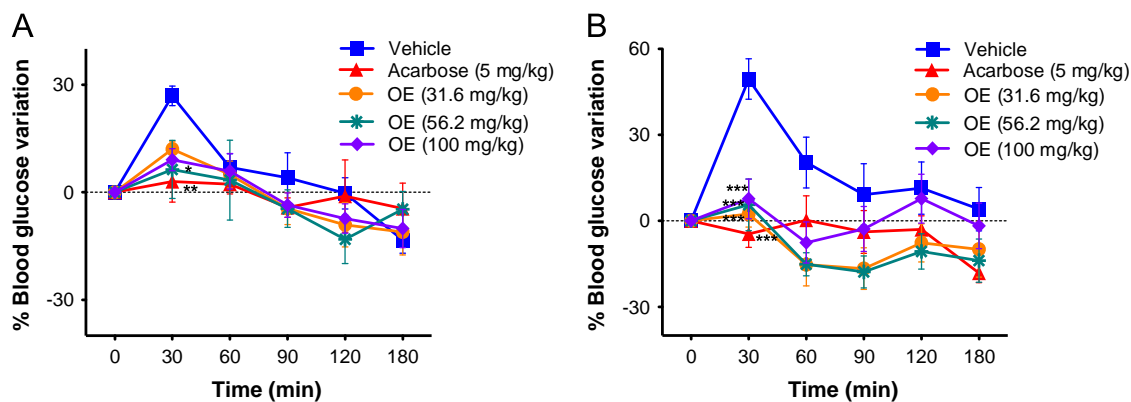


Fig. 8. Influence of OE on postprandial blood glucose levels in healthy (A) and NA-STZ hyperglycemic (B) mice during an OSTT. Values are presented as the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.

et al., 2014). Acacetin and its glycosides exhibited also significant inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidases (Escandón-Rivera et al., 2012; Ezzat and Salama, 2014) while acacetin (1) and diosmetin (2) behaved as PPAR agonists *in vitro* (Matin et al., 2009, 2013).

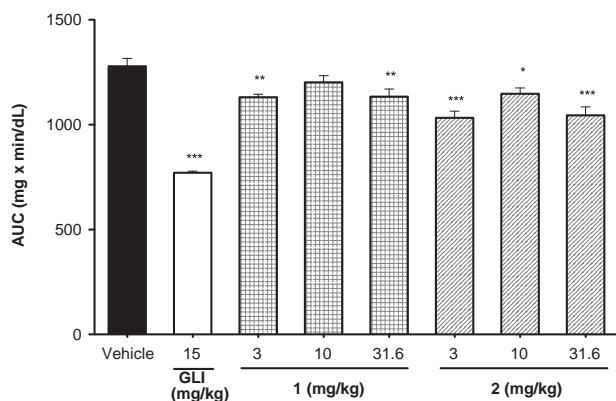
#### 3.4. Effect of day treatment of FM-AE on fructose induced MS rats

Considering the good hypoglycemic and antihyperglycemic action of *Anoda cristata* preparations, the study was extended to assess the effect of FM-AE on a series of biochemical parameters

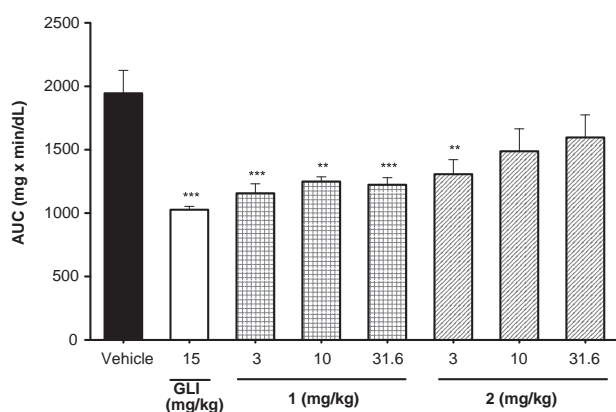
usually altered in individuals with metabolic syndrome. Diagnosis of this metabolic alteration implies positive results to at least three signs or symptoms, namely, insulin resistance, glucose intolerance, hypertension, obesity, and blood lipid profile variations. Then, a set of experiments with rats fed with a fructose diet was performed. Rats fed with fructose develop these metabolic impairments (Ferreira de Moura et al., 2009; Kim et al., 2010; Cheng et al., 2014) because fructose does not stimulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells, thus provoking a decrement of leptin, appetite increment and weight gain (Elliott et al., 2002; Basciano et al.,

2005). Furthermore, according to some authors (Ferreira de Moura et al., 2009), a high flux of fructose to the liver perturbs glucose metabolism, glucose uptake pathways, and stimulates lipogenesis and triglycerides accumulation. In consequence, reduced insulin sensitivity, hepatic insulin resistance and glucose intolerance are observed (Basciano et al., 2005; Ferreira de Moura et al., 2009).

The results of the experiments with rats fed with a fructose diet for FM-AE are summarized in Table 1. The data revealed important differences between controls (vehicle or fructose 10%) and FM-AE



**Fig. 9.** Hypoglycemic effect of compounds **1** and **2** in healthy mice. Bars represent the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Dunnett's test. \*, \*\*, \*\*\* denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.



**Fig. 10.** Hypoglycemic effect of compounds **1** and **2** in NA-STZ hyperglycemic mice. Bars represent the mean for  $n=8$  mice. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Dunnett's test. \*, \*\*, \*\*\* denotes significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs vehicle group.

**Table 1**

Effects of FM-AE from *Anoda cristata* on fructose-fed rats with metabolic syndrome.

Parameter	Control (vehicle)	Control (fructose 10%)	FM-AE (100 mg/kg)	FM-AE (316 mg/kg)
Lee index	295.52 ± 2.18 <sup>c</sup>	314.82 ± 2.56	308.45 ± 1.74	307.91 ± 1.32 <sup>a</sup>
Body weight (g)	387.33 ± 4.37	446.67 ± 20.43	427.33 ± 8.19	428.33 ± 26.31
Fat depot weight (g)	8.26 ± 0.73 <sup>c</sup>	14.36 ± 0.55	10.19 ± 0.54 <sup>c</sup>	8.70 ± 0.49 <sup>c</sup>
Serum insulin (ng/mL)	1.02 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.05	0.67 ± 0.06	1.10 ± 0.15 <sup>a</sup>
Serum glucose (mmol/L)	6.72 ± 0.20 <sup>b</sup>	7.82 ± 0.27	6.85 ± 0.24 <sup>a</sup>	6.18 ± 0.16 <sup>c</sup>
Serum total cholesterol (mmol/L)	2.49 ± 0.02	2.55 ± 0.07	2.69 ± 0.09	2.62 ± 0.12
Serum triglycerides (mmol/L)	0.81 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.71 ± 0.04	1.50 ± 0.09	1.37 ± 0.07 <sup>b</sup>
Serum uric acid (mmol/L)	0.18 ± 0.016	0.23 ± 0.021	0.174 ± 0.005	0.203 ± 0.013
Glycogen (mg/liver mg)	38.26 ± 6.10 <sup>a</sup>	24.24 ± 2.02	17.83 ± 0.78	24.30 ± 1.21

Values are reported as the mean ± SE for  $n=8$  rats. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Dunnett's test. Letters a–c denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs control fructose 10% group.

treated animals. Although no significant changes in body weight were observed, the rats fed with fructose exhibit a greater Lee index than those treated with FM-AE (316 mg/kg). The Lee index for rats is equivalent to the human body mass index; indirectly, this parameter measures body fat and the degree of overweight or obesity (Basciano et al., 2005; Kim et al., 2010). On the other hand, compared with control-vehicle rats, the fat depot was higher in the high fructose-fed rats. This parameter was considerably reduced in the FM-AE treated groups. The high levels of serum glucose, triglycerides and uric acid observed in fructose-fed rats also decreased significantly in the groups treated with FM-AE. Moreover, the group treated with 316 mg/kg of FM-AE exhibited significantly higher insulin levels than those in both control groups (groups I and II). Finally, no significant differences in serum total cholesterol and glycogen levels were detected between treated and non-treated animals. Thus, treatment with FM-AE decreased fat depot weight and Lee index in fructose induced MS rats due to an increment in insulin secretion and a reduction of lipogenesis. On the other hand, this preparation seems to decrease the production of uric acid after a load of fructose. If these effect is related to a decrease in the activity of the enzyme xanthine oxidase, usually increase upon fructose consumption, remains an open question.

Glucose intolerance represents other important symptom in the metabolic syndrome therefore FM-AE was evaluated to assess its ability to improve glucose tolerance after an OGTT. The results in Table 2 indicate that FM-AE suppressed significantly the post-prandial peak 30 min after the oral administration of the carbohydrate load, at the two doses tested; these results are shown graphically in Fig. S3. Thus, FM-AE could ameliorate glucose intolerance in individuals affected with metabolic syndrome.

### 3.5. *In vitro* antioxidant activity

Oxidative stress is considered the unifying factor in the development of diabetes complications (Sakai et al., 2003; Houstis et al., 2006; Bashan et al., 2009; Afanas'ev, 2010; Bagul et al., 2012). Changes in oxidative stress, either stemming from glucose mediated increase free radical generation and/or reduction of endogenous antioxidant, are strong contenders for the title of root cause of diabetic complications. Therefore, the regulation of damaging ROS and RSN levels in diabetes by antioxidants and free radical scavengers represents an attractive benefit during the treatment of type 2 diabetes mellitus. In this context, FM-AE was evaluated as potential antioxidant and free radical scavenger agent following standard protocols (Medina-Campos et al., 2007; Gaona-Gaona et al., 2011).

FM-AE was only able to scavenged  $\text{ROO}^\bullet$  (Fig. S4; FM-AE  $\text{IC}_{50}=3.72 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ) radical, which attack all types of biological molecules and has been detected in diabetes, Alzheimer's

**Table 2**  
Effects of FM-AE from *Anoda cristata* on fructose-fed rats with metabolic syndrome during an OGTT.

Test samples	Initial glycemia (mg/dL)		% blood glucose variation			
	0 min		30 min	60 min	90 min	120 min
Vehicle	90.33 ± 2.82 (0%)		55.54 ± 7.59 <sup>c</sup>	46.74 ± 11.20	28.40 ± 13.41	18.01 ± 12.20
Control (fructose 10%)	91.17 ± 3.97 (0%)		134.14 ± 34.31	80.91 ± 15.45	33.79 ± 10.72	26.24 ± 11.15
FM-AE (100 mg/kg)	88.33 ± 3.54 (0%)		62.38 ± 2.42 <sup>c</sup>	39.76 ± 4.31	22.73 ± 6.68	7.70 ± 5.73
FM-AE (316 mg/kg)	91.67 ± 3.86 (0%)		48.09 ± 3.83 <sup>c</sup>	39.58 ± 4.97	32.45 ± 10.32	24.14 ± 8.98

Values are reported as the mean ± SE for  $n=8$  rats. Data were analyzed by ANOVA and *post-hoc* Bonferroni test. Letters a–c denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) vs control fructose 10% group.

disease, atherosclerotic tissues of patients with cardiovascular diseases, as well as during cell apoptosis and DNA-damage (Spiteller, 2008).

In conclusion, the information generated in this study indicates that the consumption of *Anoda cristata* is effective *in vivo* to ameliorate a hyperglycemic condition. Our data suggest that the efficacy of *Anoda cristata* preparations could be due to the presence of compounds with different targets at the molecular level, including  $\alpha$ -glycosidases inhibitors, glucose transport enhancers and/or glucose entrapment agents, secretagogues, leptin and lipogenesis regulators. The presence of acacetin (1) and diosmetin (2), which are PPAR agonists and antioxidant agents, partially accounts for the observed effects (Matin et al., 2009, 2013). Taken together, these results indicate that *Anoda cristata* represents a valuable phytotherapeutic agent for treating type 2 diabetes mellitus. This work will be also useful for creating food composition databases including information of those edible plants useful for lowering the risk of type 2 diabetes and cardiovascular diseases.

## Acknowledgments

We thank Isabel Rivero, Araceli Pérez, Lucia Macias and Héctor Rico for their valuable technical assistance. We are indebted to Sol Cristians for the picture of *Anoda cristata*. K. Juárez-Reyes acknowledges a fellowship from CONACyT, México (240011) to carry out graduate studies, and Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM. This work was supported by grants from CONACyT, México (150906) and DGAPA-UNAM (IN212913).

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.052>.

## References

- Afanasyev, I., 2010. Signaling of reactive oxygen and nitrogen species in diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3, 361–373.
- Aicher, T.D., Boyd, S.A., McVean, M., Celeste, A., 2010. Novel therapeutics and targets for the treatment of diabetes. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2, 209–229.
- Alarcón-Aguilar, F.A., Roman-Ramos, R., 2006. Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants. In: Soumyanath, A. (Ed.), 2006. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 179–194 (Chapter 9).
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325–348.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., 1987. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Biochemical Journal* 248, 973–976.
- Bagul, P.K., Middela, H., Matapally, S., Padiya, R., Bastia, T., Madhusudana, K., Reddy, B.R., Chakravarty, S., Banerjee, S.K., 2012. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacological Research* 66, 260–268.
- Basciano, H., Federico, L., Adeli, K., 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition and Metabolism*, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-2-5>.
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., Rudich, A., 2009. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological Reviews* 89, 27–71.
- Bautista-Cruz, A., Arnaud-Viñas, M.R., Martínez-Gutiérrez, G.A., Sánchez-Medina, P.S., Pérez-Pacheco, R., 2011. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 3404–3411.
- Bhatty, R.S., 1993. Further compositional analyses of flax: mucilage, trypsin inhibitors and hydrocyanic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70, 899–904.
- Campbell-Tofte, J.L.A., Mølgaard, P., Winther, K., 2012. Harnessing the potential clinical use of medicinal plants as anti-diabetic agents. *Journal of Botany: Targets and Therapy* 2, 7–19.
- Cheng, S.M., Cheng, Y.J., Wu, L.Y., Kuo, C.H., Lee, Y.S., Wu, M.C., Huang, C.Y., Ting, H., Lee, S.D., 2014. Activated apoptotic and anti-survival effects on rat hearts with fructose induced metabolic syndrome. *Cell Biochemistry and Function* 32, 133–141.
- Deve, A.S., Kumar, S.T., Kumaresan, K., Rapheal, V.S., 2014. Extraction process optimization of polyphenols from Indian *Citrus sinensis* – as novel antiglycative agents in the management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 13, 11–20.
- Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L.A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R., Moreno-Valenzuela, O.A., 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology* 31, 129–135.
- Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K., Havel, P.J., 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 911–922.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R., 2012.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products* 75, 968–974.
- Ezzat, S.M., Salama, M.M., 2014. A new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. growing in Egypt. *Natural Product Research* 28, 812–818.
- Ferreira de Moura, R., Ribeiro, C., Aparecida de Oliveira, J., Stevanato, E., Rostom de Mello, M.A., 2009. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *British Journal of Nutrition* 101, 1178–1184.
- Florianio-Sanchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O.N., Rocha, D., Sanchez-Gonzalez, D.J., Cardenas-Rodriguez, N., Pedraza-Chaverri, J., 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research* 40, 523–533.
- Fontana, M., Mosca, L., Rosei, M.A., 2001. Interaction of enkephalins with oxyradicals. *Biochemical Pharmacology* 61, 1253–1257.
- Frøde, T.S., Medeiros, Y.S., 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 173–183.
- Gaona-Gaona, L., Molina-Jijón, E., Tapia, E., Zazueta, C., Hernández-Pando, R., Calderón-Oliver, M., Zarco-Márquez, G., Pinzón, E., Pedraza-Chaverri, J., 2011. Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286, 20–27.
- Houstis, N., Rosen, E.D., Lander, E.S., 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L., 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multi-channel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4437–4444.
- Kim, H.Y., Okubo, T., Juneja, L.R., Yokozawa, T., 2010. The protective role of amla (*Emblia officinalis* Gaertn.) against fructose-induced metabolic syndrome in a rat model. *British Journal of Nutrition* 103, 502–512.
- Kumar, G.S., Shetty, A.K., Salimath, P.V., 2005. Modulatory effect of fenugreek seed mucilage and spent turmeric on intestinal and renal disaccharidases in streptozotocin induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 60, 87–91.
- Long, L.H., Evans, P.J., Halliwell, B., 1999. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262, 605–609.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.

- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G., 1998. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47, 224–229.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases. *Journal of Natural Products* 76, 468–483.
- Matin, A., Gavande, N., Kim, M.S., Yang, N.X., Salam, N.K., Hanrahan, J.R., Roubin, R.H., Hibbs, D.E., 2009. 7-Hydroxy-benzopyran-4-one derivatives: a novel pharmacophore of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  (PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ ) dual agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 6835–6850.
- Matin, A., Doddareddy, M.R., Gavande, N., Nammi, S., Groundwater, P.W., Roubin, R.H., Hibbs, D.E., 2013. The discovery of novel isoflavone pan peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21, 766–778.
- Medina-Campos, O.N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S., Rocha, D., Maldonado, P.D., Mendoza-Patino, N., Pedraza-Chaverri, J., 2007. Sallylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2030–2039.
- Michael, H.N., Salib, J.Y., Eskander, E.F., 2013. Bioactivity of diosmetin glycosides isolated from the epicarp of date fruits, *Phoenix dactylifera*, on the biochemical profile of alloxan diabetic male rats. *Phytotherapy Research* 27, 699–704.
- Moller, D.E., 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414, 821–827.
- Murat, J.C., Serfaty, A., 1974. Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clinical Chemistry* 20, 1576–1577.
- Mythili, M.D., Vyas, R., Akila, G., Gunasekaran, S., 2004. Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microscopy Research and Technique* 63, 274–281.
- Nuñez-López, M.A., Paredes-López, O., Reynoso-Camacho, R., 2013. Functional and hypoglycemic properties of nopal cladodes (*O. ficus-indica*) at different maturity stages using *in vitro* and *in vivo* tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 10981–10986.
- Park, Y., Moon, B.H., Yang, H., Lee, Y., Lee, E., Lim, Y., 2007. Spectral assignments and reference data. Complete assignments of NMR data of 13 hydroxymethoxyflavones. *Magnetic Resonance in Chemistry* 45, 1072–1075.
- Rendón, B., Bye, R., Nuñez, J., 2001. Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schl. (Malvaceae) in central México: uses, management and population differentiation in the community of Santiago Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico. *Economic Botany* 55, 545–554.
- Rodríguez-Morán, M., Guerrero-Romero, F., Lazcano-Burciaga, G., 1998. Lipid- and glucose-lowering efficacy of *Plantago psyllium* in type II diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 12, 273–278.
- Sakai, K., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Suefuji, M., Nakamaru, K., Hirashima, Y., Kawashima, J., Shirohani, T., Ichinose, K., Brownlee, M., Araki, E., 2003. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300, 216–222.
- Singh, K., Kumar, A., Longyan, N., Ahuja, M., 2009. Evaluation of *Mimosa pudica* seed mucilage as sustained-release excipient. *AAPS PharmSciTech* 10, 1121–1127.
- Spiteller, G., 2008. Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the Maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1126, 128–133.
- Stefkov, G., Kulevanova, S., Miova, B., Dinevska-Kjovkarovska, S., Mølgaard, P., Jäger, A.K., Josefsen, K., 2011. Effects of *Teucrium polium* spp. *capitatum* flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Pharmaceutical Biology* 49, 885–892.
- Tahrani, A.A., Bailey, C.J., Del Prato, S., Barnett, A.H., 2011. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *The Lancet* 378, 182–197.
- Wawer, I., Zielinska, A., 2001. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magnetic Resonance in Chemistry* 39, 374–380.