

00381 3 24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Estudio Etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal & Chalm. y *Cecropia obtusifolia* Bertol.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :
M. en C. ADOLFO ANDRADE CETTO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA PEREZ AMADOR BARRON

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

272870



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

Este trabajo esta dedicado a los que se fueron:
Fulgencio Andrade Guadarrama (1905-1998) y
Emilia Andrade Buendía (1949-1998)

Y a ti la vida que vienes
Bernardo Andrade Ortega (1999)

Especialmente a ti la vida misma:
Pilar,
Amiga, Compañera, Esposa y Madre.

Agradecimientos

Muy especialmente a mis tutores:

Dr. Helmut Wiedenfel.

Dra. María Cristina Pérez Amador Barron.

Dr. Sergio Islas Andrade.

Y a mis sinodales:

Dr. Michael Heinrich.

Dra. Ma. Cristina Revilla Monsalve.

Dr. Rene Cárdenas Vázquez

Dr. Federico García Jímenez

Acknowledgements

I thank for the financial support to: the DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), to the Pharmazeutisches Institute der Universitaet Bonn, especially to Dr. Helmut Wiedenfeld and to the CONACYT, México.

Con cariño a:

Mi abuela Neri, por el apoyo de toda una vida, a mí Abueluco José Salmerón, a Don Mario Ortega e Isabel Larrocea, que durante estos años han sido mas que suegros, padres

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido.....	1
Resumen	3
Summary	5
Introducción.....	7
Ubicación conceptual del presente trabajo	7
Etnofarmacología	8
Diabetes	10
Ubicación de la enfermedad en el contexto de la salud mundial y nacional	10
Concepto y Clasificación.....	11
Breve historia de la diabetes en México.....	12
Plantas Hipoglucemiantes	13
Antecedentes de estudios de plantas hipoglucemiantes en la	
literatura internacional.....	14
Antecedentes de estudios de plantas hipoglucemiantes en México.....	24
Modelos farmacológicos de estudio.....	27
Hipoglucemiantes orales	32
Sulfonilureas	32
Factores a considerar en este tipo de estudios	34
Antecedentes de las plantas de estudio.....	35
Objetivo general del presente estudio	37
Etnobotánica	38
Objetivo de la metodología etnobotánica	38
Metodología de campo.....	38
Resultados Etnobotánicos	39
Fitoquímica	41
Objetivo de la metodología fitoquímica	41
Metodología fitoquímica	41
Resultados fitoquímicos	45
Equisetum.....	45

Resultados e interpretación de la cromatografía en capa fina	45
Resultados de HPLC.....	45
Análisis espectroscópico.....	47
Análisis de los resultados	59
Cecropia	61
Resultados e interpretación de la cromatografía en capa fina	61
Resultados de HPLC.....	
Análisis espectroscópico.....	63
Análisis de los resultados	68
Conclusiones	70
Farmacología.....	71
Objetivo de la metodología farmacológica	71
Metodología farmacológica	71
Resultados	76
Análisis de los resultados	80
Discusión y conclusiones	84
Apéndice 1, Plantas Mexicanas Hipoglucemiantes	87
Apéndice 2, Bibliografía.....	94

Resumen

La diabetes mellitus tipo 2, es la enfermedad metabólica responsable del mayor número de fallecimientos entre la población adulta en el mundo y en nuestro país. A causa de las complicaciones propias de la enfermedad, millones de personas a nivel mundial dejan de ser productivas con la consiguiente baja en su calidad de vida. A la fecha esta enfermedad se controla en su inicio por medio de dieta y ejercicio físico, pero la mayoría de los pacientes requiere en el corto o mediano plazo el uso de hipoglucemiantes orales y en algunos casos la aplicación de insulina exógena.

En México el deterioro de los pacientes diabéticos, ocupa uno de los principales problemas de salud y se estima que esto ira en aumento en los próximos años. Si bien un gran número de personas se trata con hipoglucemiantes orales, otro gran número de pacientes, principalmente en el ámbito rural se tratan con plantas medicinales, por lo que queda claro la importancia de estudiar los posibles efectos de estas plantas.

La presente investigación abarca el estudio de dos plantas medicinales usadas por la población mexicana para el control de esta enfermedad. Una de las plantas, *Cecropia obtusifolia* Bertol, goza de fama en la medicina tradicional para este efecto y de igual manera es vendida como parte de compuestos "antidiabéticos" y a granel en varios mercados de la república. La otra, *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal & Chalm, es usada principalmente en las comunidades investigadas en el presente trabajo.

En este estudio se ha dado un enfoque etnofarmacológico a la investigación, partiendo de la información obtenida directamente en las comunidades acerca del uso, forma de preparación, colecta y almacenamiento de las plantas. Esto dió como resultado la observación de que ambas plantas son preparadas como té medicinal y empleadas como agua de uso.

Para continuar el enfoque se planteó una parte fitoquímica en la cual se aislaron y caracterizaron los principales componentes del agua de uso. Para ello se usaron extractos acuosos y butanólicos de ambas plantas, la caracterización de los compuestos se realizó con dos fines; el primero fue el de encontrar los metabolitos secundarios presentes en las plantas, los cuales no se habían descrito previamente para estas plantas, es decir el enfoque fue fitoquímico. El segundo fin fue el de tratar de asignar actividad hipoglucemiante a estos compuestos encontrando una justificación farmacológica del uso de las plantas. Para *Equisetum* se aislaron tres glucósidos del caempferol, sustancia reportada como posible hipoglucemiante en la literatura internacional, y el ácido cafeico metabolito comúnmente encontrado en diversas especies. De *Cecropia* se aisló la flavona isoorientina, con posible acción similar a la de los hipoglucemiantes orales y el ácido clorogénico.

Finalmente para comprobar la acción de los extractos se escogió un modelo farmacológico para simular diabetes tipo 2. El modelo consistió en la aplicación intraperitoneal de estreptozotocina a ratas wistar macho para inducir diabetes. Una

vez que los animales se volvieron diabéticos se les aplicó el extracto acuoso y el butanólico de cada planta, con lo que se formaron cuatro grupos, a los dos primeros grupos se les aplicó cada planta respectivamente al tercer grupo se le aplicó un agente hipoglucemiante (glibenclamida) y el cuarto grupo fue usado como control. Los resultados se compararon por medio de las pruebas paramétricas t de student y ANOVA y la no paramétrica U de Mann-Whitney.

Como resultado de estas pruebas se pudo observar que los extractos de ambas plantas tanto acuoso como butanólico ejercen un efecto hipoglucemiante estadísticamente significativo y con una acción similar al ejercido por la glibenclamida.

Summary

Type II diabetes mellitus is the metabolic disease responsible for one of the biggest amount of deaths among people in the world and in our country. Because of the characteristic complications of the disease millions of people stop to be productive with a lowering of their quality of life. Today this disease can be controlled by diet and physical exercise when occurring in a lower state, but mostly the patients need the use of oral hypoglycaemic agents and also in some cases the application of exogenous insulin.

In Mexico the deterioration of the diabetic patients is one of the main problems of health and it is considered that this anger will increase in next years. Although a great number of people have access to synthetically produced oral hypoglycaemic agents another great number of patients, mainly in the rural environment, use medicinal plants. This fact underlines the importance of investigating those plants with respect to their possible activities.

The present investigation embraces the study of two medicinal plants used by the Mexican population for the control of this disease. One of the plants, *Cecropia obtusifolia* Bertol, enjoys fame in the traditional medicine for this effect and in the same way it is sold together with other plants as part of medicinal compound's "antidiabéticos" in several markets of the republic. The second one, *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal & Cham, is used mainly in local special communities.

In this study ethnopharmacological approach has been given to the investigation including informations obtained directly in the communities about the use, preparation form, collection aspects as well as storing of the plants. As one main result it could be found out that both plants are prepared as medicinal teas and employed as a –so-called- "agua de uso".

A further aspect was the phytochemical characterization of the chemical main constituents in the plants and in this "agua de uso".

Therefore plant material collected at its natural habitat underwent a phytochemical examination. Using a special elaborated extraction scheme from both plants a water extract as well as a butanolic one were separated by chromatographical methods.

This was carried out for the following aims: the first one was the finding and the structural characterization of secondary compounds (those compounds should be responsible for the mentioned activities) present in the plants. This part of the work is the phytochemical one.

The second part describes the pharmacological results. Here the hypoglycaemic activity of the extracts, fractions and isolated compounds is measured.

For *E. myriochaetum* three Kaempferol glycosides could be isolated as well as a caffeic ester (kaempferol-3-O-sophoroside, kaempferol-3,7-di-O-β-D-glucoside,

kaempferol-3-O-sophoroside-4'-O-β-D-glucoside, caffeoyl-methylate-4-β-D-glucoside). From *C. optusifolia* the flavone glycoside isoorientin as well as chlorogenic acid was isolated.

In literature similar structures were postulated as possessing hypoglycaemic activity. To check the hypoglycaemic activity a pharmacological model was used to simulate type II diabetes. This model consists on the application of an intraperitoneal dose of streptozotocin to wistar male rats to induce diabetes. Once, the animals became diabetics the water and butanolic extracts of each plant were orally applied. Four groups of animals were formed for each extract: the first and second group was given plant preparations corresponding to the traditional use reported by the natives. To the third group a common oral hypoglycaemic agent (glibendamid) was applied. The last group only was given vehicle (solvent and buffers) and therefore was used as reference.

All results were statistically compared by means of two parametric tests; t-student and ANOVA and the no parametric test of Mann and Whitney U.

As the result of this study it was shown that the extracts (butanolic and water) posses an significant hypoglycaemic effect comparable with this found for glibendamid. As chromatographical comparing analysis showed that the described isolated compounds were the main constituents in both media (the tested extracts as well as the tea "agua de uso") it can be assumed that those constituents are mainly responsible for the described activities.

As a further conclusion it can be pointed out that the use of these plants in the Traditional Mexican medicine as reported in the ethnopharmacological studies was verified by modern analytical as well as pharmacological experiments.

Introducción

Ubicación conceptual del presente trabajo.

El pueblo de México goza de una gran tradición en el uso de plantas medicinales, este hecho data desde los antiguos pobladores del valle de México (Hernández X, 1976), debido a la importancia que este factor ha tenido y sigue teniendo para nuestra sociedad se han descrito desde los códices mexicanos y los historiadores españoles hasta nuestros días una gran cantidad de plantas medicinales con sus usos y aplicaciones.

En la actualidad la simple descripción etnobotánica del uso de las plantas medicinales no responde a las necesidades de salud de nuestra población, por ello el presente trabajo se enmarca en el campo teórico de la etnofarmacología tratando de contribuir de manera precisa en el entendimiento de las plantas medicinales.

Por otro lado tenemos el enorme problema de salud que representa tanto para México como para el resto del mundo la diabetes mellitus, este padecimiento afecta como problema de salud a las personas que lo padecen y en forma de costo económico a la sociedad en general, que debe apoyar a los pacientes en diversos modos.

El presente trabajo pretende hacer un estudio integral (etnofarmacológico) de dos plantas utilizadas para el control de la diabetes tipo 2, aportando el conocimiento del posible efecto de las plantas, ya reportadas en la medicina tradicional para el control de la enfermedad.

El objetivo final del presente estudio es el de apoyar el uso popular de las mismas, mediante un soporte académico en el cual se compruebe la acción hipoglucemiante de la planta. Esto último es de suma relevancia si se considera la posibilidad real de mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos.

El estudio aporta datos farmacológicos en los cuales se demuestra el efecto hipoglucemiante de las plantas, haciendo recomendaciones en la forma de administración de las mismas.

En la parte introductoria de la obra se da una breve visión de la etnofarmacología, la diabetes, las plantas hipoglucemiantes, los modelos farmacológicos para el estudio de la diabetes en animales de laboratorio y una breve revisión de ambas plantas, posteriormente se toca en capítulos separados lo referente a la información y resultados etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos, haciendo al final las conclusiones y recomendaciones de este estudio.

Etnofarmacología.

El concepto de etnofarmacología se derivó de un concepto etnobotánico a finales de los años 1960, en ese momento el término se debía más a la fascinación científica por las drogas psicoactivas que a el concepto mismo de etnofarmacología, el término aparece por primera vez en la literatura científica en el libro de Ebron (Heinrich, 1999), al que los autores dieron el título de; "Búsqueda etnofarmacológica de drogas psicoactivas" a partir de ahí el concepto mismo evolucionó y se extendió con otros sentidos en la literatura científica.

Los autores Bruhn (1982) y Holmstedt (1991) definieron a la disciplina como: "La exploración Interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados u observados por el hombre". Siendo el objetivo principal de esta disciplina el de rescatar y documentar la herencia cultural, antes de que ésta se pierda, así como investigar y evaluar los agentes tradicionalmente empleados.

Los postulados actuales de la etnofarmacología se encuentran dados en la revista oficial (Journal of Ethnopharmacology); el hombre primitivo, tuvo que enfrentar la enfermedad y la muerte, descubriendo una gran variedad de agentes terapéuticos útiles provenientes de plantas y animales. El conocimiento empírico de estas sustancias medicinales y sus potenciales tóxicos, fue pasado por tradición oral y eventualmente anotado en herbolarios y textos o materias medicas, muchas drogas usadas hoy en día llegaron a través del estudio de la medicina tradicional. Los químicos continúan usando drogas derivadas de plantas como prototipos en sus intentos de desarrollar medicamentos más efectivos y menos tóxicos. La búsqueda de principios farmacológicos únicos a partir de remedios tradicionales ya existentes continúa y complementa los logros de la medicina moderna.

Esta disciplina toma metodologías y objetivos de otras ciencias; en la parte inicial de los estudios toma los elementos de la etnobotánica, es decir el principio de una investigación etnofarmacológica debe iniciarse siempre en una comunidad de estudio, para documentar el conocimiento tradicional del uso de las plantas (*in situ*), posteriormente las plantas seleccionadas deben ser correctamente determinadas con ayuda de la taxonomía botánica. Posteriormente deben ser analizadas desde el punto de vista de la fitoquímica en búsqueda de los componentes principales o activos de la planta y de forma paralela debe buscarse el modelo farmacológico adecuado para probar dichos componentes ya sea aislándolos o como un conjunto en la planta misma, el objetivo final del trabajo es probar en un modelo farmacológico adecuado la acción atribuida a la planta.

El estudio de las drogas usadas tradicionalmente no debe abocarse en devolver el uso de los remedios en su forma original y no debe explotar la medicina tradicional, los objetivos de la etnofarmacología son los de rescatar y documentar una importante herencia cultural antes de que ésta se pierda, así como el evaluar e investigar los agentes empleados (Holmstedt, 1991).

El primer ejemplo documentado de cómo debe funcionar esta disciplina data del año 1803, si bien no fue un estudio etnofarmacológico como tal si abarcó todas las áreas de la disciplina, fue iniciado por el naturalista francés Leschenault de la Tour en la

isla de Java, él colectó la sustancia usada en la punta de una flecha envenenada, obtuvo información detallada proporcionada por los nativos acerca de los ingredientes y forma de preparación del veneno y colectó los ejemplares botánicos para su posterior estudio. En Francia el botánico Jussieu extrajo el componente principal e identificó la planta como *Strychnos* sp. El veneno fue dado a los investigadores Magendine y Raffenuau quienes estudiaron los efectos en gallinas, conejos, perros y caballos, observando que después de la administración del veneno se producían violentas convulsiones, asfixia y en cinco minutos la muerte, posteriormente al buscar la acción de la droga descubrieron que el efecto se ejerce sobre la espina dorsal (Brunh y Holmstedt, 1982).

Este caso fue la primera vez que se demostró el efecto de un veneno sobre un órgano específico. Una década después los investigadores Pelletier y Caventou aislaron el principio activo identificándolo como el alcaloide estricnina, esta sustancia fue introducida al uso clínico en el siglo XIX para contrarrestar el cólera, epilepsia, tuberculosis, etc. En la actualidad el alcaloide es reconocido como un potente veneno; la acción producida se debe a su interferencia con la inhibición postsináptica mediada por glicina. A demás de ser venenoso el alcaloide posee un extraordinario sabor amargo, una parte de estricnina puede volver amargas 5000,000 partes de agua (Mann, 1987).

Los compuestos aislados de las plantas y sus acciones farmacológicas son diversos, entre los mas utilizados hoy en día como fármacos y que fueron reportados por la medicina tradicional, encontramos: la efedrina usada en problemas respiratorios, el aceite de ricino que posee propiedades purgantes, la salicina, ácido acetil salicílico principal componente de la aspirina, usada como analgésico, antipirético, etc., el cardenólido digitoxina útil en enfermedades cardiacas y el diterpeno taxol con propiedades antitumorales (Mann, 1987). Aunado a esto hay que contar los compuestos aislados de plantas (no reportados por la medicina tradicional) a los que se les ha encontrado acción farmacológica importante, como los alcaloides vinblastina y vincristina útiles en el control de diversos tipos de cáncer o la diosgenina a partir de la cual se desarrollaron los anticonceptivos orales. Así mismo de las plantas se han aislado otros compuestos con actividad farmacológica como la Cafeína y la Morfina.

Debido a que las plantas siguen siendo la principal fuente de nuevos productos naturales, se entiende la importancia de los estudios en los que se aísle el principio activo, o al menos se demuestre la propiedad farmacológica de la planta ya que esto beneficia tanto a las comunidades rurales como a la sociedad en general.

Diabetes

Ubicación de la enfermedad en el contexto de la salud mundial y nacional.

La diabetes mellitus es la enfermedad que ocupa el tercer sitio como problema de salud a escala mundial y cuarto lugar en el ámbito nacional (WHO, 1998).

La Organización Mundial de la Salud estima que en 1995 había 135 millones de adultos diabéticos en el mundo (WHO, 1998), para el año 2025 el organismo predice que existirán 300 millones de adultos diabéticos en el planeta, esto implica un incremento del 120% en el número de casos, de este porcentaje el 30% será en los países desarrollados y un 70% en los países en vías de desarrollo.

Los tres países con mayor incidencia son los Estados Unidos de América, China y la India, mientras que México ocupó en 1995 el noveno puesto con 3.8 millones de diabéticos; en el año 2025 ocupará el séptimo puesto con 11.7 millones de diabéticos (Figura 1).

No.	País, 1995	Millones	País, 2025	Millones
1.	India	19.4	India	57.2
2.	China	16.0	China	37.6
3.	U.S.A.	13.9	U.S.A.	21.9
4.	Rusia	8.9	Pakistán	14.5
5.	Japón	6.3	Indonesia	12.4
6.	Brasil	4.9	Rusia	12.2
7.	Indonesia	4.5	México	11.7
8.	Pakistán	4.3	Brasil	11.6
9.	México	3.8	Egipto	8.8
10.	Ucrania	3.6	Japón	8.5

Figura1, países con mayor número de diabéticos a escala mundial cálculos para los años 1995 y 2025. Tomado de La Organización Mundial de la Salud (WHO, 1998).

En los Estados Unidos de América el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Nutricionales (NIDDKD, 1998) estima que hay 15.7 millones de diabéticos en ese país, el equivalente al 5.9% de la población. De este número 10.3 millones cuentan con diagnóstico y 5.4 están sin diagnosticar. De los diez millones de pacientes diagnosticados se calcula que entre el 85 y el 90% presentan diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina).

En México la Secretaría de Salud informa que la Diabetes Mellitus es la cuarta causa de mortalidad en el país (SSA, 1998), según datos del Instituto Mexicano del Seguro Social se calculan 4 millones de diabéticos, el instituto reportó para 1995 3,148 casos de muerte como consecuencia de la enfermedad de los cuales 1,306 eran hombres y 1,842 mujeres (IMSS, 1998).

El mismo Instituto estimó que en 1994 existían 4 millones de pacientes diabéticos en el país, pero esto corresponde a los casos diagnosticados. El IMSS estima que por cada paciente con diagnóstico existe uno sin él, por lo que el número de diabéticos en México puede ser cercano a los 8 millones de personas.

La diabetes mellitus tipo 2 es, como se puede observar, la enfermedad de origen endocrino que ocupa el primer sitio a escala mundial y nacional como problema de salud, por lo que es de suma importancia el encontrar medicamentos que coadyuven a resolver algunos de los efectos del padecimiento o por lo menos a frenar su aparición en el corto plazo. Cabe mencionar que en los Estados Unidos de América el gasto del estado en atención a pacientes con esta enfermedad fue en 1992 de \$8,500 millones de dólares, mientras que en México fue de 104 millones de dólares (WHO, 1998).

En nuestro país la Diabetes tenderá a aumentar en los próximos años causando mas gasto social y trastornos a un sin número de pacientes, por lo que cualquier intento de contribuir a frenar los efectos de la enfermedad es fundamental para nuestra población.

Concepto y Clasificación.

En forma práctica la Diabetes Mellitus puede definirse como; "Cualquier trastorno que produzca elevación de la glucosa plasmática después del ayuno. En términos concretos es una enfermedad determinada genéticamente en la que el sujeto que la padece tiene alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, junto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a esta" (Islas, 1993).

La diabetes se clasifica de acuerdo a la OMS* en:

Tipo 1, anteriormente llamada dependiente de insulina o juvenil, ocupa del 5% al 10% de todos los casos diagnosticados, los factores de riesgo son autoinmunidad y carga genética aunados a factores ambientales.

Tipo 2, anteriormente llamada no dependiente de insulina o diabetes de la madurez, ocupa del 90 al 95% de todos los casos, los factores de riesgo son; edad avanzada (mayor de 40 años), obesidad, historia familiar de la enfermedad y generalmente intolerancia a la glucosa.

Diabetes Gestacional; aparece en 2% a 5% de las mujeres embarazadas pero desaparece al termino del embarazo, esta asociada a obesidad.

Otros tipos, relacionados a trastornos en el metabolismo de la glucosa, resultados de cirugías, drogas, infecciones, etc., estos ocupan solo del 1% al 2% de todos los casos diagnosticados.

*Tomado del: "National Institute for Digestive and Kidney Disease".

Este trabajo se centra en la Diabetes mellitus tipo 2, que como se mencionó anteriormente es la de mayor incidencia tanto en el ámbito nacional (cerca del 90% de los casos) como a escala mundial.

La diabetes mellitus tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes y se caracteriza clínicamente por los siguientes rasgos: alta frecuencia familiar, manifestación clínica por lo general en edad adulta y asociación estadística con obesidad e hipertensión arterial (Lifshitz, 1993).

La participación de factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad parece indudable, debido a la alta frecuencia en gemelos monocigóticos y la evidente agregación familiar, pero aún no se conocen las causas genéticas del desarrollo de la enfermedad, se ha tratado de asociar al cromosoma 11, donde está el gen codificador para la insulina, este se encuentra en el brazo corto del cromosoma y lo estructuran 1355 pares de bases.

La hipótesis binaria propuesta por Islas *et al*, (1993) para entender el complejo proceso, indica que aparece una resistencia a la insulina en las células blanco, tal vez con mediación genética, y que varios de los estados de resistencia a la insulina, como la obesidad y la hipertensión arterial, son síndromes prediabéticos en los que la hipersecreción pancreática compensa la resistencia a la insulina. Cuando la "reserva pancreática" se va agotando, aparece la intolerancia a la glucosa y cuando las células β son incapaces de responder a las concentraciones de glucosa aparece la DMNID franca. (*Idem ant*).

Otros factores a considerar son la elevación de la producción de glucosa hepática basal en pacientes con diabetes tipo 2 y alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos libres.

El diagnóstico para esta enfermedad es, elevación de la glucosa plasmática por arriba de 200 mg/dl después de dos horas de haber aplicado una carga oral de glucosa y síntomas clásicos de diabetes, polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso.

Breve Historia de la Diabetes en México.

A escala mundial podemos citar que este padecimiento ha venido azotando a la humanidad desde hace siglos, los primeros reportes de los síntomas, datan del año 1500 a. C. y corresponden al papiro egipcio de Ebers. Pero no es sino hasta 1869 que Langerhans describe los islotes que llevan su nombre y en 1921 Banting y Best asilan la insulina y reconocen su acción hipoglucemiante; en 1955 se introducen los hipoglucemiante orales (Marble, 1971).

A pesar de que el reconocimiento de los síntomas y la enfermedad misma se han presentado en el hombre y en nuestro pueblo desde tiempos antiguos, el entendimiento

de la enfermedad, sus causas y consecuencias se dio hasta el siglo pasado y no es sino hasta este siglo cuando se aísla la insulina y se desarrollan los medicamentos para reducir el nivel de glucosa en sangre. La consecuencia inmediata de esto es que a pesar de que la enfermedad existe, por lo menos desde hace 3,500 años, no es sino hasta este siglo cuando se da un entendimiento de ella por la ciencia médica quien lo transmite al conocimiento popular.

En México el primer reporte de la enfermedad lo realizó Esteynefer en el siglo XVIII, en 1869 González Ureña escribe una monografía sobre diabetes en el Estado de Michoacán y en 1950 Salvador Zubirán se interesa en el estudio de la diabetes fundando el Instituto Nacional de la Nutrición, que junto con otros grupos como los del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) realizan en la actualidad las investigaciones en este campo (Andrade, 1995).

En nuestro país el mal debió de existir desde las culturas precolombinas, pero el incremento de los casos es notorio en este siglo; como causa probable del aumento en el número de casos tenemos la conjunción de tres factores:

- a) La carga genética intrínseca de nuestra población, que la hace susceptible a la diabetes tipo 2.
- b) La inadecuada alimentación.
- c) El aumento en la esperanza de vida, en nuestro país se ha dado un proceso gradual de envejecimiento de la población, al reducirse la mortalidad. Actualmente la esperanza de vida, al nacer, se ubica en 75.5 años en el caso de las mujeres y en 69.5 años en el de hombres (SSA, 1998).

Si consideramos que el padecimiento se presenta generalmente en la quinta década de vida y la esperanza de vida en nuestro país rebasó ese límite al principio de siglo; y aunado a esto los factores mencionados como; disposición genética y mala nutrición, se podrá entender él por que han aumentado los casos de diabetes.

Debido a que este trabajo intenta encontrar algún principio activo aislado de las plantas, con propiedades hipoglucemiantes, se hace una revisión de los hipoglucemiantes orales presentes en el mercado hasta este momento, para no entorpecer la continuidad del trabajo, esta se da en el apéndice 2.

Plantas Hipoglucemiantes

Para esta unidad consideraremos dos partes, en la primera se hace una revisión de los estudios citados en la literatura mundial y en la segunda se revisan brevemente los estudios realizados en México, la finalidad de esto es la de tratar de asociar las familias de plantas mas estudiadas, con los metabolitos secundarios de ellas aislados y conocer algunos de los efectos hipoglucemiantes atribuidos a los compuestos.

Lo primero que cabe destacar de los estudios a escala mundial y nacional es que a pesar del gran número de plantas reportadas y la gran cantidad de compuestos aislados, en la actualidad solo se ha obtenido un derivado de plantas medicinales útil como hipoglucemiante, la metformina.

En segundo lugar cabe mencionar que los estudios farmacológicos sobre plantas medicinales se han ido modificando pasando de lo más simple a lo más complejo, atravesando por épocas en las que se enfocó mucho hacia cierto compuesto, como las hipoglucinas y otras en las que se estudiaron ciertos modelos animales. Un problema general de estos estudios es que son pocos en los que se intenta extraer el principio activo, en la mayoría de ellos se prueba si la planta es hipoglucemiante o no, usando los extractos de la misma ya sean, acuosos, metanólicos, hexánicos, clorofórmicos etc., podemos decir que de los años 1990 a la fecha los investigadores se centran más en una sola especie y además de probar los extractos intentan aislar los principios activos.

Antecedentes de estudios de plantas hipoglucemiantes en la literatura Internacional.

Para la comprensión de los estudios realizados en el ámbito internacional se realizó una búsqueda electrónica en, "medline", "chemical" y "biological" "abstracts", para ello se relacionó las palabras diabetes, hipoglucemiante, planta, hierba y fitomedicina, solo se tomaron en cuenta los trabajos escritos en inglés, francés o alemán o que tuvieran un resumen en ese idioma.

La búsqueda reportó 532 citas entre los años 1969 a 1997, para seleccionar los datos que se presentan a continuación se tomó en cuenta que el trabajo correspondiera al efecto hipoglucemiante de una o varias plantas, considerando que no todos los trabajos reportan metabolitos secundarios o que en algunos casos no se usaron modelos animales y que muchos géneros de plantas se repiten, los datos no son homogéneos, es decir el número de géneros no corresponde al número de modelos animales reportados y metabolitos aislados. La revisión para 1998 se realizó posteriormente, los datos obtenidos no se incluyen en las gráficas totales, pero sí se mencionan los compuestos de interés.

Podemos mencionar que Ernst (1997) considera que hay mas de 400 plantas con actividad hipoglucemiante reportadas, mientras que Pérez (1997) calcula 800 especies para estudios realizados en modelos animales, en el estudio de Andrade, (1995) se citan 150 especies solo para México, pero el autor calcula que deben existir unas 400, dado que muchas de ellas no cuentan con un reporte adecuado. Esto nos llevaría a pensar que a escala mundial el número de especies usadas como hipoglucemiantes en la medicina tradicional debe ser superior a 800.

A nivel mundial, por el gran número de reportes sobre una sola especie cabe destacar los estudios sobre *Momordica charantia* L., familia cucurbitaceae con 26 trabajos y los de *Trigonella foenum-graecum* L. Leguminoceae con 13 estudios, aclarando que *Momordica* ha sido reportada recientemente como hepatotóxica en ratas (Ernst, 1997).

Tenemos que las familias de plantas con mayor número de géneros estudiados con acción hipoglucemiante son: Fabaceae, Asteraceae, Liliaceae, Moraceae, Cucurbitaceae, Poaceae, Euphorbiaceae y Convolvulaceae (figura 2). Destacando que prácticamente todas las familias de plantas cuentan por lo menos con un género que ha sido reportado como hipoglucemiante.

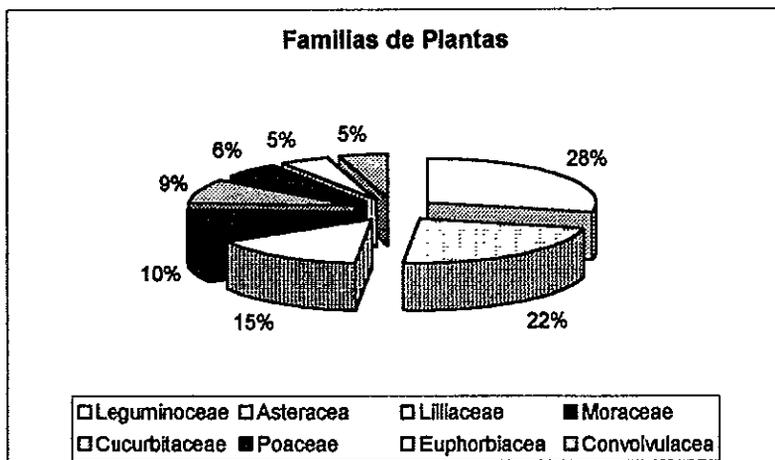


Figura 2, Familias de plantas con mayor número de géneros reportados en la literatura internacional.

No es de extrañar que las familias mayormente representadas sean compuestas y leguminosas, pero esto ciertamente se debe a que son las dos familias con mayor distribución mundial. Tomando en cuenta que la mayoría de los estudios están realizados en regiones tropicales como Africa, Asia y Latino América podemos entender la notable presencia de Moraceas, Liliaceas, Cucurbitaceas, pero destaca ciertamente la presencia de poaceae, las cuales han sido reportadas en norte América como hipoglucemiantes.

Ciertamente en los niveles de estudio actuales es imposible concluir que alguna familia de plantas presente la mayoría de los géneros hipoglucemiantes conocidos, es decir: **no hay evidencia clara de una relación entre la taxonomía de la especie y la actividad hipoglucemiante.**

Los compuestos metabólicos presentes en las plantas fueron separados de acuerdo a la ruta metabólica de origen (figura 3) en:

- Polisacáridos se encontraron:
 - 20 Mucílagos y 12 Glicanos*.
- De la ruta de la Acetil Coenzima A y el ácido shikimico se encontraron:
 - 15 flavonoides.
- De la ruta del ácido mevalónico e isopreno se encontraron:

- 21 terpenos y 4 esteroides.
 - Compuestos que provienen de la ruta de los aminoácidos:
 - 11 aminoácidos y péptidos.
 - 27 alcaloides.
 - Otros compuestos 19.
- * El número de glicanos es de 30, pero solo se considera un solo tipo ya que para cada especie se reportan las variantes A, B, C etc.

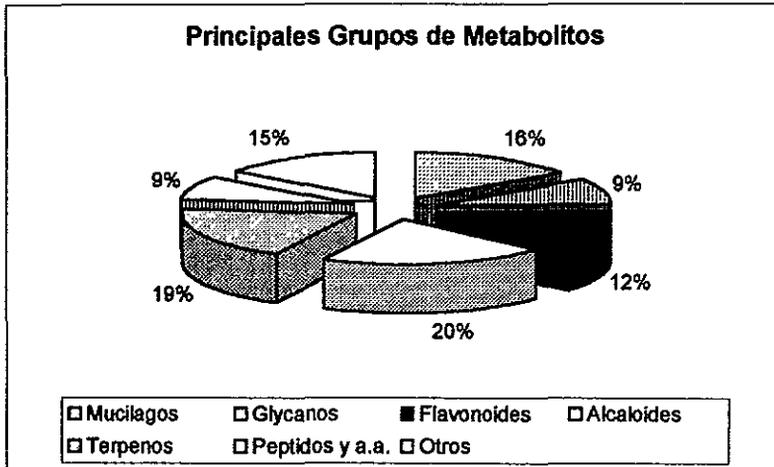


Figura 3, comparación de los grandes grupos de metabolitos secundarios.

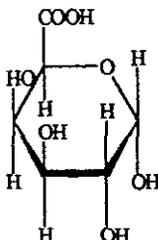
Al igual que en la revisión taxonómica no hay una correlación clara entre el grupo de compuestos y la actividad hipoglucemiante, se observa que predominan los terpenos y los alcaloides pero no de forma contundente esto puede sustentarse además en un estudio realizado en 1989 en el que se revisó la bibliografía existente hasta ese momento en donde se menciona que: " Una revisión de los compuestos de diversas familias de plantas encontró que son diversos los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante" (Atta, 1989).

A pesar de no haber un tipo de compuesto señalado como hipoglucemiante, algunos compuestos han sido reportados con esta propiedad, a continuación mencionamos los más importantes en su momento tomando en cuenta cada grupo de metabolitos considerados.

Polisacáridos y Glicanos: entre estos compuestos se han mencionado como hipoglucemiantes a la γ -celulosa, varios mucilagos y especialmente a los glicanos.

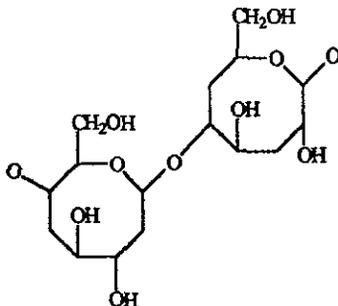
Mucílagos: el grupo de Tomoda reportó mas de 20 mucílagos solubles en agua obtenidos de diferentes familias de plantas, los compuestos aislados de la familia Malvaceae de los géneros, *Abelmoschus*, *Althea* e *Hibiscus* mostraron un considerable efecto hipoglucemiante en ratones (Pérez, 1997), todos éstos compuestos tienen como base un ácido urónico, tienen en sus partes principales las estructuras del (1—4)-O-β-(ácido D-glucopyranosil-urónico), (1—3)-O-α-(ácido D-galactopyranosil-urónico) y (1—2)-O-α-L-Rhamnopyranosa. La estructura del ácido D- galacto urónico es:

Otras plantas con polisacáridos son las que contienen pectinas entre ellas



podemos mencionar a *Coccinia indica* Wight (Cucurbitaceae), de esta especie se aisló una pectina que a dosis de 200 mg/día produjo un efecto hipoglucemiante significativo en ratas, el efecto parece estar asociado al decremento de absorción intestinal de glucosa, debido al aumento de acción de las enzimas hexokinasa y glycogenosintetasa, lo que lleva a una mayor síntesis de glycogeno (Pérez, 1997).

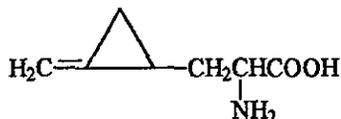
Otra especie es la ya mencionada *Trigonella foenum-graecum* L. cuyo efecto hipoglucemiante se ha asociado mas a una fibra dietética al igual que el nopal, *Opuntia* sp. A continuación se presenta la estructura general de una pectina (fibra soluble) con un efecto hipoglucemiante demostrado, aislada de *Cirsium depascolips*, Asteraceae:



El mecanismo de acción de las fibras parece estar dado por la aceleración en el tránsito intestinal que reduce la absorción de glucosa en el mismo, se ha comprobado que en pacientes con diabetes la administración de fibras solubles (pectinas) retarda la aplicación de insulina (Bruneton, 1995). La administración de estas sustancias baja los niveles séricos de colesterol y LDL, factor importante en la diabetes. En los estudios realizados en 1998 no se reportan glicanos y glucósidos solos, los estudiados están asociados a flavonoides y terpenos.

Glicanos, estos compuestos fueron estudiados en la década de los ochenta por el grupo de Konno y Hikino, ellos aislaron aproximadamente 50 compuestos entre los que podemos mencionar los eleuteranos, orizabanos, dioscoreanos etc., todos estos compuestos demostraron actividad hipoglucemiante (Hikino, 1986, 1989) en modelos animales, pero los autores no lograron dilucidar el mecanismo de acción de ellos.

Aminoácidos y péptidos: Las hipoglicinas A y B reportadas en la década de los 60, fueron aisladas de *Blighia sapida* Benth & Hook. (Sapindaceae), planta originaria de Africa, su efecto es el de inhibir la gluconeogénesis en el hígado y riñón, las sustancias son metilen-ciclopropanos, aminoácidos con la siguiente estructura (Stecher, 1976):



Estos aminoácidos bloquean la β -oxidación de los ácidos grasos, produciendo una deficiencia en la producción de energía que es compensada con un intenso catabolismo de los carbohidratos, esto produce una marcada hipoglicemia y en algunos casos hasta la muerte del paciente (Bruneton, 1995). Por razones obvias el uso de estos aminoácidos fue descartado totalmente como hipoglucemiantes.

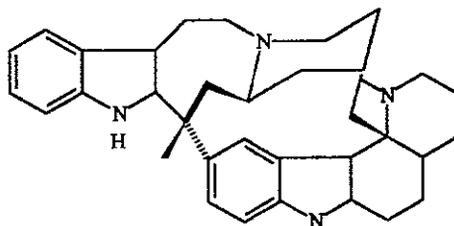
Como ya se mencionó una de las especies mas estudiadas es *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminiceae), de esta especie se aísla la 4-hidroxi-isoleucina, a este aminoácido se le atribuye un efecto potenciador de la insulina (Sauvaire, 1998). Los autores demostraron el efecto del compuesto sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos de rata y humano llegando a la conclusión, de que éste solo actúa con altas concentraciones de glucosa por lo que es estrictamente dependiente de la glucosa. Probablemente este nuevo compuesto tenga un futuro para el control de pacientes con diabetes tipo II.

Algunos péptidos, como los aislados de *Centaurea aspera* L., han demostrado su acción en conejos. Del mismo modo, de *Panax ginseng* Meyer se aislaron las fracciones DPG-3-2 y EPG-3-2, a las cuales se les demostró efecto hipoglucemiante en ratones (Pérez, 1997).

Entre las proteínas reportadas para este fin tenemos las del genero *Momordica* como las momorcharinas y luffaculinas que son glicoproteínas cuya actividad hipoglucemiante ha sido probada en varios estudios. Un resumen lo ofrece Raman, (1996), en el cual concluye que efectivamente estas proteínas son hipoglucemiantes pero a muy altas dosis.

Alcaloides: De *Catharanthus roseus* G. Don, planta probablemente originaria de Madagascar, fueron reportados inicialmente alcaloides para el tratamiento de la diabetes ya que la planta goza de gran reputación entre los habitantes de esa zona para este fin.

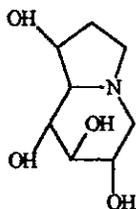
En 1991 se realizaron estudios sobre el efecto hipoglucemiante del extracto alcohólico resultando positivos en ratas diabéticas (Chattopadhyay, 1991). La estructura fundamental de la vinblastina y vincristina es la siguiente:



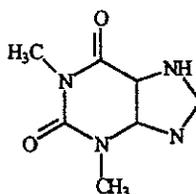
Sin embargo desde principios de los años 1960 ya se había reportado el efecto de estos alcaloides como útiles en la quimioterapia contra cáncer (Noble, 1990) Debido a que nunca se les atribuyó un efecto hipoglucemiante directo a los alcaloides se continúan usando en la terapia de cáncer. La acción principal de estos compuestos es la de bloquear la formación de microtúbulos durante la mitosis, exactamente entre las fases M y G2.

Otros alcaloides como trigonellina, lupinina, leurosina, vindolina, etc., aislados de diversas especies han sido reportados como hipoglucemiantes, sin embargo la principal acción de estas sustancias en general es sobre el sistema nervioso como depresivos, estimulantes, simpatomiméticos, anticolinérgicos y anestésicos.

Entre los alcaloides que han presentado efecto hipoglucemiante en modelos animales tenemos, la dioscorina aislada de *Dioscorea dumetorum* Tubers Pax (Dioscoreaceae), criogenina aislada de *Decodon verticillatus* L. Ellior (Erytraceae), galegina aislada de *Galega officinalis* L. (Leguminosae), lepidina obtenida de *Lepidus ruderale* L. (Cruciferae), lathyrina obtenida de *Lathyrus japonica* Sic. (Leguminosae). La capsicina, aislada de *Capsicum annum* L. ha mostrado inhibir el transporte intestinal de glucosa. La castanospermina, aislada de *Castanospermum australe* A. Cum (Leguminosae), ejerce su efecto inhibiendo enzimas a escala intestinal, la estructura del alcaloide es la siguiente (Pérez, 1997):



Castanospermina



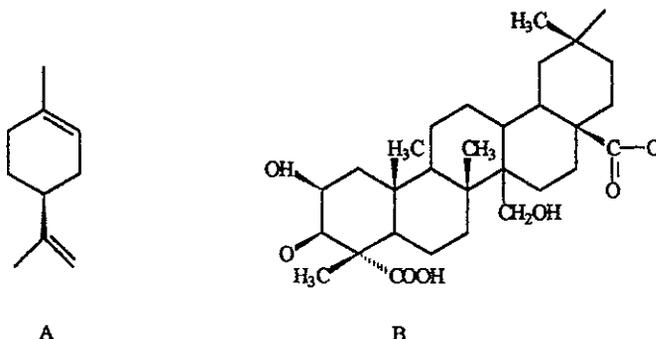
Teofilina

La teofilina, aislada de *Camellia sinensis* L., ha demostrado aumentar la actividad extracelular de ATPasas, estimuladas por calcio, así como la reducción de la glucólisis,

(ver estructura anterior). Otros alcaloides con efecto comprobado en modelos animales son: criogenina, lepidina, berberina, etc. (Pérez, 1997).

Estudios recientes llevados a cabo por los laboratorios Shaman Inc., reportan la actividad hipoglucemiante de un alcaloide indolquinolinico; la criptolepina aislado de *Cryptolepis sanguinolenta*, esta substancia baja los niveles de glucosa en plasma de ratones diabéticos, se observó que aumenta la toma de glucosa por células 3T3-L1, acción que puede dar el efecto hipoglucemiante. (Luo, 1998).

Terpenos: al igual que con los otros grupos de metabolitos los terpenos también han sido mencionados frecuentemente como hipoglucemiantes, podemos citar terpenos como el α -pineno, cineoleno y limoneno (A) aislados de *Myrtus comunis* L. (Gauthier, 1995). Sesquiterpenos como el gossypol y la vulgarina. Diterpenos como la alvicina, carosina y buformina (Tashmukhamenova, 1992). Triterpenos como las escinsas; Ia, Ib, IIa, IIb, y IIIa, aisladas de las semillas de *Aesculus hippocastanum* L. (Yoshikawa, 1994) y la senegenina (Kako, 1996). A continuación se presentan las estructuras del limoneno (A) y de la senegenina (B):



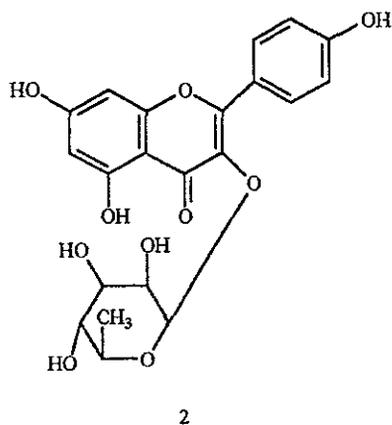
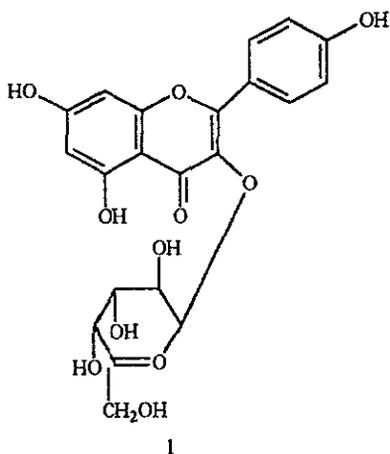
Las propiedades reportadas para los terpenos varían mucho según las estructuras, así tenemos que los aceites esenciales son antisépticos, espasmolíticos, sedantes e irritantes. Los sesquiterpenos tienen propiedades contra bacterias y hongos principalmente aunque también son responsables de muchas alergias. Los diterpenos por su parte son conocidos por sus actividades como antitumorales, antihipertensivos, anti-inflamatorios, analgésicos, abortivos, etc. Por último entre las actividades de los triterpenos podemos citar sus propiedades como antitusivos, anticonceptivos, diuréticos, etc. (Bruneton, 1995).

Entre los terpenos reportados con actividad hipoglucemiante podemos mencionar al ácido gymneco, triterpeno aislado de *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae), este compuesto inhibe la absorción de glucosa en el intestino de rata, produciendo con esto una disminución de la glucosa plasmática, se observó que la glucogénesis y el anabolismo de proteínas se incrementan y la actividad de enzimas dependientes de insulina como hexokinasa y glucogeno sintetasa se incrementan. El ácido toméntico, aislado de *Poterium aeneistroides* Desf. (Rosaceae), redujo el nivel de glucosa plasmática, así como el nivel de insulina circulante en ratas en ayuno, aunque los niveles de estas substancias se mantuvieron iguales al usar ratas diabéticas, lo que

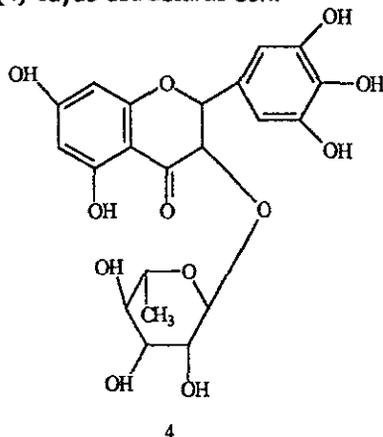
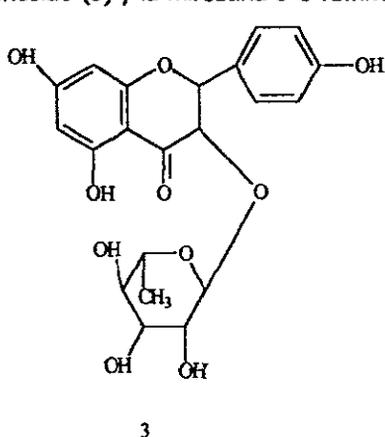
sugiere que el ácido toméntico actúa incrementado la secreción de los islotes de Lanherhans activos (Pérez, 1997).

El ultimo reporte sobre triterpenos corresponde a las senegeninas II a IV (ver figura B) aisladas de *Polygala senega* L. Var latiflora Torrey et Gray (Kako, 1996 y 1997), los autores demostraron que el compuesto reduce la glucosa sanguínea en ratones hipoglicemicos.

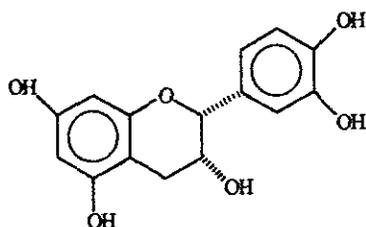
Flavonoides: Se han reportado varios de estos compuestos así como estructuras afines con actividad hipoglucemiante; entre los grupos afines podemos mencionar la kolaflavona aislada de *Garcinia kola* Hook. E. (Gutiferaceae) y la xantona bellidifolina aislada de *Ficus bengalensis* L. (Moraceae) cuya marcada acción hipoglucemiante fue observada en ratas. Entre los flavonoides pueden citarse los aislados de *Bahuinia variegata* L. (Cesalpinaceae), caempferol 3-galactosido (1) y 3-ramno glucosido (2), para los que se reporta una actividad hipoglucemiante moderada (Atta, 1989) y cuyas estructuras son:



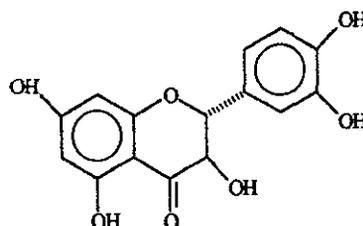
También cabe mencionar los aislados de *Zizyphus rugosa* Lam. (Rhamnaceae), que al igual que los anteriores presentan una actividad moderada y son el caempferol 3-0-ramnosido (3) y la mircetina 3-0-ramnosido (4) cuyas estructuras son:



De *Pterocarpus marsupium* Roxb. (Leguminosae), se aisló la (-)epicatequina (5) a la cual se le atribuye un efecto hipoglucemiante debido a la regeneración de las células β , esto fue probado en ratas. Por otro lado la quercetina (6) mostró actividad hipoglucemiante, provocando una liberación mayor de insulina en islotes de ratas, los investigadores sugieren que este efecto se debe en parte a cambios en el metabolismo del Ca^{+2} (Pérez, 1997).



5



6

La principal actividad de los flavonoides está ligada a su capacidad de disminuir la permeabilidad y fragilidad capilar lo que les dio el nombre de vitamina "P", aunque en la actualidad no se les reconoce esta acción. Otras propiedades son como antiinflamatorios, antialérgicos, hepatoprotectores, antiespasmódicos, y para disminuir el colesterol.

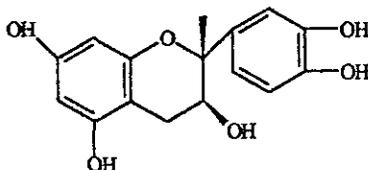
En estudios recientes Yoshikawa *et al*, (1998) aislaron de *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae) los flavonoles: mircetina y quercetina entre otros así como las flavanonas, myrciaditras I, II y las acetofenonas, myrciaphenonas A y B. Los autores probaron el efecto del extracto que contenía estos compuestos encontrando que son inhibidores de las alfa glucosidasas y aldosa reductasas, faltaría por determinar cual de estos elementos es el principal responsable de esta acción.

Caempferol: Por ser de especial interés para el presente estudio se menciona este compuesto; como se observa, numerosos derivados del caempferol ya han sido reportados como hipoglucemiantes, podemos citar, entre los que se les ha comprobado actividad hipoglucemiante en modelos animales a:

Año	Especie	Compuesto
1966	<i>Bahunia variegata</i>	Caempferol 3-galactosido Caempferol 3-ramno glucosido
1972	<i>Fagonia sp</i>	Caempferol
1983	<i>Zizhyphus rugosa</i>	Caempferol 3-O-ramnosido
1993	<i>Morus insignis</i>	Caempferol-3-O-b-glucopiranosido.
1995	<i>Centaurea Sp</i>	Caempferol
1997	<i>Sterculia rupestris</i>	Caempferol-3-O-(2gal-rhamnosylobinosido)

Respecto a la flavona iso-orientina, también de interés para este trabajo, podemos mencionar que se ha aislado de especies como *Passiflora incarnata* L., pero que el efecto farmacológico de la planta se atribuye a alcaloides, del mismo modo ha sido reportada en otras especies pero sin propiedades medicinales.

La epicatequina que es un flavanol, pero que sus unidades recurrentes forman los taninos, fue aislada de *Pterocarpus marsupium* Roxb (leguminoceae) ha sido reportada como hipoglucemiante (Atta, 1989), la estructura del compuesto es:



Los taninos presentan una afinidad por las proteínas, lo cual los ha hecho útiles como antidiarréicos y en tratamientos para la piel, incluidas quemaduras leves y heridas, también presentan un efecto vasoconstrictor.

Una propiedad importante de los taninos, en especial de las proantocianidinas es la de disminuir la permeabilidad capilar (Bruneton, 1995), efecto que podría asociarse a la acción hipoglucemiante, al permitir el ingreso de glucosa. En los estudios realizados en 1998 tampoco se reporta la actividad de algún tanino.

Como se ha visto en la presente sección son muchos los metabolitos secundarios y primarios descritos con acción hipoglucemiante, podemos recalcar que no hay un grupo específico de metabolitos que tengan la buscada acción hipoglucemiante o que predomine sobre los demás, podemos decir también que para aminoácidos, alcaloides, pectinas y flavonoides se ha encontrado por lo menos un compuesto específico con actividad hipoglucemiante y como se observa, los mecanismos difieren, pero cabe recalcar que los estudios en los que esto se ha podido lograr son recientes, lo que indica que en un futuro el estudio de plantas hipoglucemiantes y la posibilidad de aislar principios activos es prometedor para lo cual se deberá seguir el modelo farmacológico adecuado.

Finalmente cabe recalcar el estudio de *Trigonella foenum-graecum*, planta con mas de 13 estudios reportados en la bibliografía internacional, mas otros tantos trabajos que no se publicaron en revistas arbitradas, el efecto hipoglucemiante comprobado en la semilla fue atribuido a diversos extractos y compuestos, hasta que finalmente en 1998 se encontró la acción del aminoácido 4-hidroxi-isoleucina, esto nos demuestra el largo camino que ha de seguir un estudio que llegue a una conclusión relevante.

Antecedentes de estudios de plantas hipoglucemiantes en México

Desde la antigüedad y en el transcurso de la historia, la tradición de la población mexicana en el uso de plantas medicinales para equilibrar la salud ha estado ampliamente difundida, no es la excepción la diabetes mellitus, para la cual pacientes y especialistas tradicionales unen sus esfuerzos en la búsqueda de remedios vegetales.

La herbolaria mexicana reporta, en la actualidad, aproximadamente 150 plantas hipoglucemiantes (Andrade, 1995) pero la población en su mayoría rural, se encuentra en un proceso de búsqueda de nuevos recursos. Cabe aclarar que ni en los códigos mexicanos ni en los libros anteriores al siglo XIX se hace mención alguna a plantas para contrarrestar la diabetes, esto es debido a que la enfermedad como tal no se conocía en esa época

A partir de la década de 1950 se difunde de una manera amplia a la población el conocimiento médico del "mal", dando una causa y efecto; la gente lo ha asimilado e incorporado al saber popular como "azúcar en la sangre", lanzándose a una búsqueda de plantas medicinales para equilibrar la salud en este punto.

Debido a este proceso de búsqueda, el número de plantas utilizadas es aproximadamente de 400 (*idem ant.*), ya que cada comunidad va incorporando sus plantas, las cuales por el proceso mismo de ensayo-error se irán desechando, quedando en la medicina popular solo aquellas que demuestren su efecto hipoglucemiante.

Corresponde a los investigadores colaborar con los especialistas tradicionales y pacientes, en la búsqueda de recursos que no presenten efectos secundarios y no perjudiquen en el tiempo la salud de la población.

Podemos resumir diciendo que el concepto de Diabetes como enfermedad es nuevo (relativamente hablando, 50 años) para médicos y personas lo que ha provocado que la medicina tradicional todavía se encuentre en un proceso de búsqueda de recursos.

Son diversos los estudios que se han realizado en México sobre diabetes mellitus y plantas medicinales, por su tipo se pueden dividir en; aquellos reportes etnobotánicos donde se dan nombres de plantas útiles, en diversas comunidades, para el control de la diabetes, entre estos trabajos cabe destacar por el número de especies mencionadas el de Martínez (1964), el de Díaz (1977), el de Aguilar (1994) y el de Argueta (1994) así como diversas tesis de licenciatura y grado que reportan distintas plantas hipoglucemiantes, entre ellas la más rica en número de especies reportadas, por su uso en mercados, es la de Legorreta, 1989.

Trabajos farmacológicos en los que se realizan pruebas en animales de laboratorio basándose en los reportes etnobotánicos, pero sin tener una continuidad con éstos, pueden citarse los de Pérez, R. M. (1989), Pérez S. en (1992) y (1997), Román-Ramos y Alarcón (91, 92, 95, 97 y 98) y la recopilación de Pérez Gutiérrez (1998).

Trabajos farmacológicos realizados en pacientes según el uso tradicional de la planta, por ejemplo los de Frati-Munari (88, 90 y 91).

Finalmente una gran cantidad de trabajos fitoquímicos que han estudiado muchas de estas plantas y han aislado una gran variedad de compuestos, pero en la mayoría de las ocasiones no se han orientado a buscar algún compuesto hipoglucemiante o no se han llevado en forma conjunta los estudios con pruebas farmacológicas.

Cabe recalcar que en estos trabajos en los que se dan a conocer los usos de las plantas, la actividad hipoglucemiante o sus componentes fitoquímicos, no tienen en general correlación entre ellos, perdiéndose la información y continuidad, no por esto estos trabajos dejan de ser de gran utilidad y valor en sus respectivas ramas, gracias a ellos en la actualidad el grupo de Alarcón ha estudiado de manera inicial 62 especies hipoglucemiantes mexicanas lo que da un punto de inicio a futuras investigaciones.

Para aclarar lo anteriormente expuesto podemos ejemplificar el estudio de *Psacallium decompistum* (Gray) Robins, esta planta fue reportada originalmente por Bye (1986) como hipoglucemiante, la raíz hervida en té es usada por los tarahumaras para este fin, es colectada en la parte noroeste del desierto de Chihuahua. Estudios fitoquímicos de la raíz (Romo, 1966) llevaron al aislamiento de lactonas sesquiterpénicas como; cacalol, cacalona, matorona etc. Evidentemente el efecto hipoglucemiante no se pudo atribuir a estos compuestos.

En 1997 Alarcón realiza un estudio en conejos hiperglicémicos, probando lo que se supone es la raíz, pero el material lo adquiere en el mercado de Sonora, es sabido que en este lugar se expenden raíces de *Psacallium peltatum* presente en el valle de México, por lo que la autenticidad de la raíz puede ponerse en duda. Segundo punto de duda los autores preparan una infusión dejando hervir 40g de raíz seca en 300 ml de agua por 10 min, podemos preguntarnos si esto corresponde a la preparación tradicional?, Bye no reporta como se prepara el té por los tarahumaras, por lo que la dosis empleada experimentalmente no necesariamente coincide con la empleada de manera tradicional.

Finalmente basados en estos estudios y en conjunto con el grupo de Jiménez Estrada los autores anteriores, extraen la raíz con éter de petróleo y aíslan la hidroperoxycacalona. Como conocimiento de los compuestos presentes en la raíz es muy buena contribución pero para el estudio del efecto hipoglucemiante esto es irrelevante tomando en cuenta que la preparación tradicional es un extracto acuoso (polar), que no coincide con el extracto que los autores realizan, es decir es poco probable que si existe un compuesto hipogluceminante en la raíz se encuentre en un extracto etéreo.

Lo que se quiere ejemplificar aquí es la importancia de la etnofarmacología en su conjunto, la planta debe colectarse en la comunidad de origen y debe prepararse de acuerdo a la tradición, a menos que estudios farmacológicos demuestren lo contrario.

La propuesta concreta de este estudio es que en el futuro los trabajos para plantas hipoglucemiantes incluyan una sola especie en principio, que esta especie sea colectada y la información etnobotánica recabada en la comunidad de origen, se realicen pruebas del efecto hipoglucemiante en un modelo animal que simule en lo posible a la diabetes tipo II, pueden usarse ratas, ratones o conejos inyectados con estreptozotocina o adquirir ratas obesas. Si se comprueba el efecto del extracto preparado en la forma tradicional, proceder al análisis fitoquímico del mismo pero haciendo una extracción de acuerdo a la preparación tradicional. Posteriormente probar

el extracto obtenido, si tiene efecto positivo aislar los componentes y probarlos uno por uno, en caso de no ser posible el aislamiento de los principios probar el extracto en pacientes, es posible que algunos extractos funcionen en conjunto.

Como se mencionó anteriormente debido al proceso de búsqueda de recursos vegetales tanto la literatura nacional como internacional cuentan con diversos reportes de plantas hipoglucemiantes, cabe señalar que por ejemplo en el trabajo de Aguilar, (1994), donde se hace una revisión de las plantas del herbario medicinal del IMSS, el número de especies hipoglucemiantes detectadas fue tan alto que no fue posible ponerlas en el índice bajo el rubro diabetes.

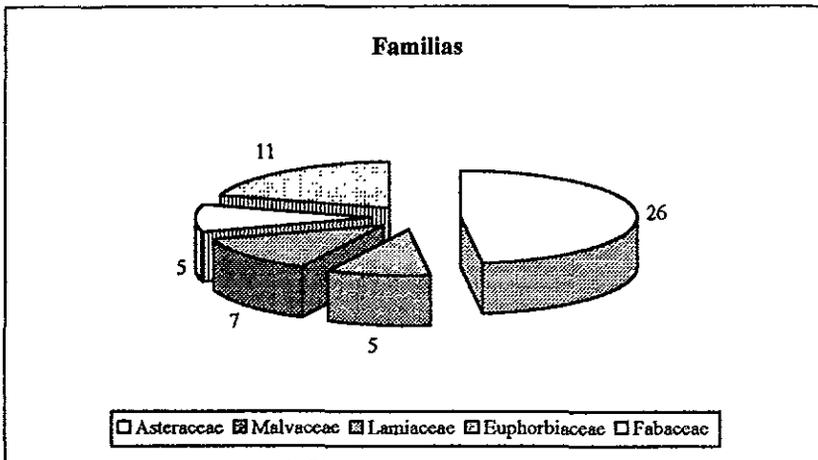


Figura 4, número de especies de las principales familias reportadas en la bibliografía nacional.

En la revisión realizada por Andrade, (1995) se citan 150 especies reportadas en las diversas fuentes nacionales. El mismo número es citado por Alarcón, (1993) pero sin dar una lista de las especies, el mismo autor cita que del total 40 habían sido estudiadas experimentalmente y de ellas a 33 se les ha comprobado un efecto hipoglucemiante.

Debido a que los reportes que tenemos en la literatura nacional son en su mayoría etnobotánicos se realizó una gráfica comparando el porcentaje de especies con actividad hipoglucemiante reportadas por familia, solo se muestran las familias con mayor número de especies reportadas (Figura 4).

Comparando este resultado con la literatura internacional tenemos que, las Asteraceas y Leguminosas predominan pero aquí invierten el orden, mientras que las Euphorbiaceas aparecen en ambas gráficas.

Este resultado confirma de forma definitiva que la gran diversidad y distribución de compuestas y leguminosas provoca que sean las plantas mas representadas.

En el apéndice 1, se hace un resumen de las principales plantas mexicanas estudiadas, se citan solo aquellas con estudios completos.

Modelos Farmacológicos de Estudio.

Para el estudio de las plantas hipoglucemiantes sería óptimo que todos los trabajos iniciaran con una investigación etnobotánica, continuaran con una fitoquímica y finalizaran con la parte farmacológica, analizando tanto los extractos como la planta misma de acuerdo a su preparación tradicional.

Es de vital importancia el contar con los modelos de estudio adecuados para apoyar los estudios fitoquímicos y etnobotánicos, los modelos experimentales ofrecen una gran ventaja en el estudio de la enfermedad, la diabetes permanente en animales es un modelo apropiado para el estudio de medidas que permitan prevenirla. El uso de animales también da oportunidad de estudiar la interacción de dieta, fármacos, tóxicos y agentes infecciosos (Méndez, 1994).

La diabetes experimental se puede definir como: "la aparición espontánea o inducida de la enfermedad en un modelo animal" (Méndez, 1993). Los modelos experimentales pueden separarse en Diabetes espontánea y Diabetes Inducida.

El modelo animal predominante en el estudio de las plantas hipoglucemiantes, al nivel de la literatura internacional (1969 a 1998) es el conejo (55%); este predomina sobre el uso de ratas o ratones, y el uso de conejos a los cuales se les aplica una carga oral de glucosa es predominante sobre otros tipos de modelos empleados en el mismo animal. Los datos generales en porcentaje de las tres especies mas usadas se presentan en la figura 5. Cabe aclarar que en años recientes, es decir, de 1995 a la fecha el uso del modelo predominante ha disminuido aumentando el uso de animales con diabetes inducida, principalmente ratas a las que se les induce la enfermedad por inyección de estreptozotocina. (Los datos aquí mencionados se obtuvieron con la misma metodología seguida para buscar los metabolitos secundarios).

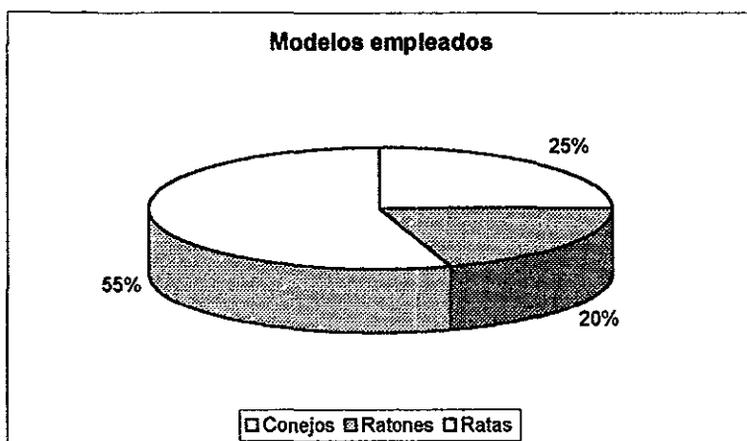


Figura 5, modelos animales empleados para el estudio de plantas hipoglucemiantes, datos en porcentaje.

Diabetes Espontánea:

Al igual que en el hombre un variado número de animales puede presentar diabetes entre ellos podemos citar carpas, delfines, roedores, perros, gatos, cabras, caballos, hipopótamos etc. El primer reporte de diabetes espontánea fue descrito en un mono en 1851 (Méndez, 1994), pero solo perros, gatos y algunos primates se han estudiado en detalle. La diabetes en estas especies se presenta generalmente con los mismos síntomas que en el humano: polifagia, poliuria, polidipsia y pérdida de peso.

Animales no obesos: La mayoría de los modelos corresponden a roedores, en este tipo de animales el desarrollo de diabetes se debe generalmente a una etiología autoinmune.

Animales obesos: Los síndromes de hiperglucemia, hiperinsulinemia y obesidad son comunes en los roedores de laboratorio. En general tienden a ser muy obesos y a mostrar reversión espontánea de la diabetes. Los animales presentan hiperfagia, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia.

Diabetes Inducida:

Inducción física: El primer mecanismo de inducir diabetes experimental fue reportado en 1889, Von Mering y Minkowski produjeron diabetes en perros mediante pancreatectomía total (Marble, 1971), en la actualidad se sigue empleando este modelo experimental.

Las lesiones en el hipotálamo pueden causar obesidad, las ratas sometidas a este tipo de lesión presentan obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.

Otra forma de inducción es mediante la influencia de hormonas como adrenalina, glucagón y somatotropina que pueden producir hiperglucemia ya que tienen un efecto antagonista sobre la insulina (Méndez, 1994). También la administración de hidrocortisona induce hiperglucemia e hiperplasia en las células beta.

Inducción química: El uso de agentes químicos para inducir diabetes permite realizar estudios de los acontecimientos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren durante un estado diabético y después de este (Méndez, 1993).

La inducción química se puede producir por tres clases de agentes. Los primeros son sustancias tóxicas específicas que destruyen las células beta y causan un estado de deficiencia primaria de insulina, como ejemplo esta el clorhidrato de hidrouracilo. El segundo grupo actúa sobre las células beta pero sin destruirlas. Un tercer grupo incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitando el páncreas y produciendo como consecuencia diabetes. Este último grupo incluye las hormonas contra insulina, anticuerpos antiinsulina y algunos agentes quelantes como el zinc.

Es importante mencionar que la dosis diabética es la cantidad de agente inductor que en 80% de los animales de una especie dada produce hiperglucemia

sostenida y necrosis de las células beta sin causar daño en otros órganos (Méndez, 1994).

Los principales agentes inductores de diabetes son el aloxan (Alx) y la estreptozotocina (Stz), los cuales se ubican en el grupo de agentes que actúan sobre las células beta.

Ambos compuestos actúan de acuerdo a la propuesta de Okamoto (Méndez, 1994) que se resume en:

Alx o Stz---- generación de H_2O_2 ---- Fragmentación del ADN----- destrucción de la célula β .

Se ha planteado que *in vivo* la generación de H_2O_2 produce radicales oxígeno libres que llevan a la fragmentación del ADN esto juega un papel importante en el desarrollo de la diabetes (Nobuyuki, 1991).

Aloxan :

La droga fue descrita en 1868 por Liebig quien la aisló de la mucosidad excretada durante infecciones de disentería. La fórmula condensada es $C_4H_2N_2O_4$, la droga era usada como antineoplásico en adenoma celular de los islotes (Stecher, 1976).

Se piensa que el mecanismo de acción del aloxan es la destrucción de las células beta del islote y se ha observado que ciertos azúcares presentan un efecto protector contra esta droga (Méndez, 1993).

En modelos experimentales la droga provoca síntomas similares a la diabetes tipo I en el hombre como son: la pérdida de peso, poliuria, glucosuria etc.

Otros autores (Soto, 1994) consideran que el efecto diabético del aloxan se debe a la liberación de oxígeno altamente reactivo, éste se produce en una reacción redox entre la sustancia y su producto reducido el ácido dialúrico, los iones peróxido liberados son citotóxicos para las células beta. Se ha observado que el tratamiento con agentes que neutralicen estos radicales evita el efecto de la droga en sistemas biológicos. Es aceptado que esta droga es un generador de **radicales** oxígeno libres (Eizirki, 1994).

Otros efectos son: la inhibición de la hexoquinasa, la inactivación de la Co A y la reacción al destruir la membrana de las células beta.

Estreptozotocina

El primer reporte de la estreptozotocina como agente inductor de diabetes fue dado por Nathan, (1963). En un estudio llevado a cabo en ratas y perros Beagle reporta el efecto diabético.

La estreptozotocina es un antibiótico aislado de *Streptomyces achromogenes*, es un derivado de las nitroaminas con la fórmula empírica $C_{14}H_{27}N_5O_{12}$.

El efecto inicial observado por los autores es que a dosis de 50 mg/Kg en administración intravenosa, la droga producía diabetes en ratas entre 2 y 206 días

después de la inyección. Los autores concluyen que la acción de la sustancia se da a nivel del páncreas por una degeneración de los islotes, ya que las células beta no presentaron granulación.

En la actualidad se proponen varios mecanismos de acción de la droga, se plantea que es selectiva sobre las células beta, la sustancia se fija a la membrana, penetra en la célula produciendo una deficiencia de NAD, disminuyendo su síntesis e incrementando su hidrólisis. Nobuyuki *et al*, (1991) demostraron que la droga produce peróxido de hidrogeno que lleva a la fragmentación del ADN celular. Así mismo se atribuye una interferencia directa entre el grupo nitroso y el ADN (*idem. ant.*), por lo que la droga funciona como un **agente alquilante**, esto esta ampliamente reconocido (Eizirik, 1994).

La droga es usada para producir diabetes tipo I e incluso puede producir un componente autoinmune, al administrar bajas dosis, 30 mg/kg, por espacio de cinco días se observó una hiperglicemia de 20 a 30 días después, esta remitió temporalmente para establecer una diabetes franca en 3 meses, el proceso diabetogeno disparado por la droga se pudo asociar a un incremento en el nivel de anticuerpos antiinsulina (Elias, 1994).

Algunos autores como Bonner, (1981) han sugerido que con una inyección en animales neonatos se logra un modelo para diabetes tipo II. Los autores inyectaron la droga en dosis de 90 mg/Kg, a ratas Sprague-Dawley de dos días de nacidas. Se basan en la observación del numero de células en el islote, ya que cuando la droga se administra a ratas adultas se destruye una gran cantidad del islote, lo que corresponde a la diabetes tipo I, pero en la diabetes tipo II se ha observado que la destrucción del islote no es mayor, en el experimento por ellos realizado las ratas inyectadas como neonatos recuperaron hasta 75% del islote en estado adulto, presentando un incremento en la concentración de glucosa plasmática a las ocho semanas.

En 1992 Alder y colaboradores demostraron que los parámetros bioquímicos de ratas inyectadas con estreptozotocina y ratas normales solo varían en la glucosa sanguínea y la hemoglobina glucosilada.

La estreptozotocina en solución es una mezcla de dos anómeros, alfa y beta, los cuales alcanzan el equilibrio en la solución a las dos horas de haber preparado esta y haberla almacenado en condiciones de obscuridad (Povoski, 1993).

Se ha demostrado (Eizirik, 1994) que la estreptozotocina no es diabetógena para seres humanos, por lo menos a las mismas dosis que lo es para roedores, esto se demostró en cultivos celulares de células β .

Es de interés señalar en el presente estudio el reporte de Islas (1999) en ratas Wistar macho, en él demuestra que la producción de insulina por los islotes decae notablemente después de 21 días de la inyección de la droga y por medio de microscopía electrónica muestra como aparecen anticuerpos antiinsulina en el islote, después de la inyección, y como estos anticuerpos acaban con el islote después de 21 días, así mismo la producción de insulina por el islote entre los días 7 y 14 no varía de manera significativa.

Hasta principios de los años 90 la droga de elección para modelos animales era el aloxan (Figura 6), pero de 1990 a la fecha se ha incrementado el uso de estreptozotocina, se puede atribuir a los siguientes factores:

- La estreptozotocina presenta mayor estabilidad que el aloxan, los anómeros se estabilizan en dos horas.
- El aloxan requiere generalmente de una dosis de refuerzo, lo cual limita la duración del estado diabético.
- El mecanismo de acción del aloxan puede inhibirse, por ejemplo con azúcares.
- La estreptozotocina da una mayor gama de variación a los estudios ya que puede producir diabetes tipo 1 o tipo 2, así como diversos factores de ambas.
- La semejanza entre los factores bioquímicos de pacientes diabéticos y modelos animales, es similar a los modelos inducidos con estreptozotocina.

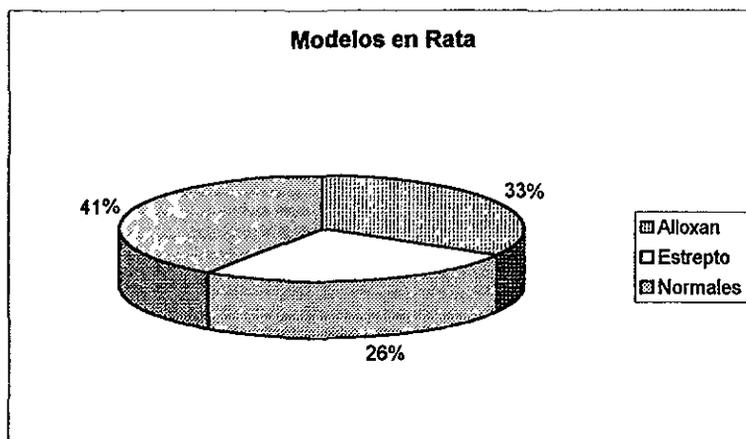


Figura 6, modelos experimentales en rata.

Podemos señalar que en la actualidad el modelo experimental de elección es la rata o ratón al que se le induce diabetes por medio de estreptozotocina. En los estudios realizados en México por la mayoría utiliza conejos con carga oral de glucosa, que como se comento fue un modelo ampliamente usado en los años 70, este tipo de modelo puede simular una situación en la que la hipoglucemia no sea dependiente de la concentración de insulina pero tiene la gran desventaja de que la carga oral de glucosa (COG) solo se mantiene por espacio de horas no mimetizando en realidad a la diabetes, a esto cabe agregar que los autores no aportan otro tipo de parámetros bioquímicos como podría ser la concentración de insulina o lípidos, para validar totalmente el modelo.

Hay que tomar en cuenta, de acuerdo a Eizirk, (1994) que el efecto diabético de ambas drogas se da por destrucción en el ADN de las células b del páncreas, y que

de acuerdo a los autores la capacidad de reparación de éste se incrementa del siguiente modo rata < raton < humano, por lo que el modelo de estudio mas aceptado de acuerdo a la destrucción del páncreas es la rata.

Como conclusión y basados en lo anteriormente expuesto, este estudio seleccionó como modelo animal a emplear la rata a la que se le aplica una inyección intraperitoneal de estreptozotocina.

Hipoglucemiantes Orales

La gran diversidad de las estructuras químicas aisladas de plantas medicinales y reportadas como hipoglucemiantes, lleva a revisar los medicamentos usados en la farmacología actual para el mismo fin, en esta sección se hace una breve revisión de las sulfonilureas, con especial énfasis en la glibenclamida, por ser la substancia de referencia utilizada en este estudio.

Sin duda alguna el avance más importante en el manejo de pacientes diabéticos fue en 1921 cuando Banting y Best, aislaron la Insulina y la usaron satisfactoriamente en el tratamiento de un niño diabético.

No obstante fue hasta 1955 cuando se introdujeron los hipoglucemiantes orales, que son hasta ahora los medicamentos de elección en el manejo del paciente con diabetes tipo 2. Las cuatro clases de fármacos con las que se cuenta en la actualidad; inhibidores de las alfa glucosidasas, sulfonilureas, biguanidas y tiazolidinedionas tienen diferentes mecanismos de acción.

Sulfonilureas

Todos los miembros de esta clase de agentes son arilsulfonilureas substituidas. Se dividen en dos grupos o generaciones de compuestos. El primer grupo incluye; tolbutamida, acetohexamida, tolazamida y clorpropamida. La segunda generación incluye la glipzida (glibenclamida), y glicazida, que son más potentes que los compuestos de primera generación.

Las sulfonilureas causan hipoglucemia por estimulación de las células β del páncreas y aumento de la sensibilidad de los tejidos periféricos a la hormona.

El efecto predominante se ejerce sobre la secreción de insulina ya que estos compuestos no funcionan en pacientes y animales pancreatectomizados o en pacientes que no poseen insulina endógena (Goodman, 1994).

Cuando se administran por vía endógena, ejercen su efecto sobre la primera fase de la secreción de insulina; sin embargo también son efectivos para estimular la secreción durante una comida (*idem ant.*)

Los efectos de las sulfonilureas se inician mediante su interacción con los receptores de la superficie de las células b del páncreas, esto reduce la conductancia de un canal de K⁺ sensible al ATP, de modo que estos agentes semejan los secretagogos

fisiológicos (p. ej., glucosa, leucina) que también disminuyen la conductancia de este canal (*idem ant.*).

Sin embargo se ha observado que después de varios meses de administración de la droga los niveles de insulina regresan a los valores iniciales, anteriores a la administración del medicamento, pero los niveles de glucosa sanguínea permanecen reducidos. Esto ha provocado que se busquen otros efectos de las drogas, encontrándose que reducen el nivel de glucosa que el hígado aporta al torrente sanguíneo y aumentan el número de receptores de membrana a la insulina.

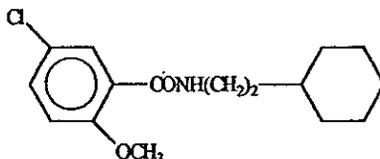
Los pacientes ideales para recibir tratamiento con estas sustancias deben:

- Tener células b funcionales, el páncreas debe producir insulina.
- Haber sido diagnosticados con diabetes tipo 2, después de los 30 años de edad.
- Tener el padecimiento por menos de cinco años.
- Comer de manera regular, no saltar las comidas y llevar un programa de dieta.
- Mantener los niveles de glucosa sanguínea por debajo de 250 mg/dl a través de dieta y ejercicio.
- No aplicarse insulina.

Glibenclámda:

El nombre genérico de esta sustancia es Glipzida, el nombre químico correspondiente es 1-ciclohexil-3-([p-(2-(5-metilpirazincarboxiamida)etil]fenil]-sulfonil)urea, la formula molecular es $C_{21}H_{27}N_5O_4S$, y el peso molecular es de 445.55

La formula del compuesto es:



Mecanismo de acción: El modo primario de acción de la glipzida en modelos animales, parece ser la estimulación de las células β en la secreción de insulina, ello depende de que existan células beta funcionales en el islote.

En el humano la glipzida parece reducir los niveles de glucosa sanguínea en forma aguda, estimulando la liberación de insulina en el páncreas, sin embargo el mecanismo de acción en administraciones prolongadas no ha podido establecerse, los niveles de insulina en ayuno, no aumentan con la administración de glipzida por periodos prolongados. (Mosby, 1998)

Un factor de suma importancia en la administración de esta sustancia, es la estimulación en la secreción de insulina en respuesta a la alimentación, la respuesta insulínica a la alimentación ocurre a los 30 minutos posteriores a la administración oral de glibenzida, pero los niveles elevados de insulina no permanecen más allá de este periodo, lo que sugiere que factores extra pancreáticos deben jugar un papel en el mecanismo de acción de la glibenzamida.

La absorción gastrointestinal en el hombre es uniforme y se da de forma rápida y completa, la concentración plasmática ocurre entre 1 y 3 horas después de la administración de una sola dosis (5 mg). La dosis inicial recomendada para el humano es de 5 mg al día administrados con el desayuno, la dosis mínima de acción son 2.5 mg (Mosby, 1998).

Factores a considerar en este tipo de estudios.

Debido a que la diabetes mellitus tipo 2 es la enfermedad endocrina de mayor importancia en nuestro país, la población mexicana principalmente en el ámbito rural, se encuentra en la búsqueda y uso de recursos vegetales que le permitan equilibrar su salud, estos elementos cuentan con dos características fundamentales:

- a) El bajo costo respecto a los medicamentos de patente.
- b) La confianza intrínseca de las personas en la medicina tradicional.

Pero no necesariamente todos los vegetales empleados en este momento tienen un efecto hipoglucemiante, esto aunado a que para un control efectivo sobre la DMNID, se requiere de un adecuado control de la dieta y el ejercicio, provoca que la mayoría de las personas sufra de las complicaciones de la enfermedad en el mediano y largo plazo.

Cabe mencionar también que después del inicio abrupto de la enfermedad, ésta entra en un periodo asintomático aparente (llamado luna de miel), en el que el paciente deja de acudir a la consulta médica y tiende a dejar de controlarse o bien utiliza remedios alternativos, suponiendo en la mayoría de los casos que el mal ha cesado.

La diabetes tipo 2 es una enfermedad de gran impacto social, en la cual, el entendimiento del uso de recursos vegetales para su control juega un papel importante en la realidad actual de México.

Antecedentes de las plantas de estudio.

De la gran diversidad de plantas que existen en nuestro país con efecto hipoglucemiante, se escogieron dos para el presente estudio. La selección de las plantas se basó en el trabajo previo de Andrade, 1995. El Equiseto se escogió debido a que en el citado estudio se encontró un efecto hipoglucemiante de la planta y a que no hay reportes sobre los componentes o actividad de la especie. La Cecropia se seleccionó debido a su amplia reputación en la medicina tradicional mexicana y a la falta de un estudio de este tipo respecto a la planta.

Equisetum myrlochaetum Schlecht & Cham.

Descripción: Plantas con tallos aéreos de 2 a 5 y hasta 8 m de alto, con verticilos regulares de las ramas, de 2 a 23 mm de diámetro, acanalados con 16 a 48 canales; vainas del tallo con un radio largo y ancho de 11.5, margen oscuro en el lado superior, el resto del mismo color del tallo, ocasionalmente en los especímenes grandes la base de la vaina oscura; estomas en una línea, en cada lado del surco; ramas con 6 a 8 canales con tubérculos que recuerdan a los dientes de una sierra, apuntando hacia el ápice; estróbilo terminal en las ramas y en el tallo principal, romo o con un mucrón; estróbilos del tallo de hasta 12 mm de diámetro; estróbilos de las ramas 10 mm de largo y 4 mm de diámetro (Palacios, 1998).

Distribución: Esta especie se distribuye ampliamente en nuestro país, se le encuentra en cañadas, orillas de arroyos, terrenos arenosos húmedos y sobre laderas calizas con vegetación de bosque mesófilo de montaña, matorral submontano, bosque de Pinos, bosque tropical caducifolio, bosque tropical subperenifolio y bosque de galería, se distribuye de 300 a 2,100 m.

Etnobotánica: Conocida comúnmente como Cola de caballo, se ha reportado su uso en los estados de la costa occidental del país como Oaxaca y Guerrero, la planta entera se aprovecha en cocción administrada por vía oral para curar males renales (Argueta, 1994). En general las especies del género *Equisetum* se utilizan en México para curar males renales y de las vías urinarias. También se ha reportado a algunas especies para tratar padecimientos del aparato digestivo como gastritis, úlcera, vómito, dolor e inflamación del estómago.

Antecedentes fitoquímicos: El único reporte para la planta fue realizado por Mata y cols. (1992) en el cual reporta la presencia de: B-sistosterol, pinocembrina, crisina, B-d-glucosistosterol y una mezcla de ácidos grasos compuesta de: ácido laurico, mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico, esteárico, behénico y lignocérico.

Antecedentes Farmacológicos: No se han realizado estudios referentes al efecto hipoglucemiante de la planta. Pérez (1985) realizó pruebas con ratones, en donde demostró el efecto diurético del extracto clorofórmico a dosis de 50 mg/Kg.

Posible toxicidad del género: El género Equiseto comprende 33 especies y se le ha atribuido toxicidad debida a la presencia de alcaloides (palustrina) y saponinas, pero la principal actividad tóxica es debido a la presencia de la enzima tiaminasa que destruye

la vitamina B1, aunque no se han reportado casos de toxicidad en humanos, generalmente estos, se dan al confundir la especie *E. arvense* que es medicinal con *E. palustre* (Mann, 1987). Cabe señalar que el estudio fitoquímico de esta planta no detectó alcaloides.

Cecropia obtusifolia Bertol.

Descripción: Arbol monopódico de hasta 20 metros, con el tronco derecho, hueco, que produce raíces zancudas de sección circular; copa irregular estratificada, con pocas ramas gruesas que salen horizontalmente del tronco, la corteza externa es de color gris claro, las hojas se encuentran dispuestas en espiral y aglomeradas en la punta de las ramas, son simples, peltadas y profundamente palmado-partidas, de color verde oscuro en el haz y grisáceas en el envés. Las ramas jóvenes albergan numerosas y agresivas hormigas del género *Azteca*. Especie dioica con flores en espigas axilares sostenidas por una bráctea espatiforme caediza, espigas masculinas pardo grisáceas de 12 a 15 de 8 a 10 cm de largo, espigas femeninas de 4 a 6 de 13 a 0 cm de largo. Frutos achenios agregados en las espigas que contienen una semilla de sabor parecido al higo (Sarukan, 1997).

Distribución: Especie pionera de la vegetación secundaria abundante y conspicua en las zonas tropicales con una amplia distribución en México, desde Tamaulipas y S.L.P hasta Tabasco y Chiapas (*Idem ant.*).

Etnobotánica: Este árbol tiene diversos nombres según la región; en Oaxaca e Hidalgo se le conoce como Hormiguillo, Guarumbo o Chancarro y es usada tradicionalmente para tratamiento de la diabetes, para ello se emplea la infusión de las hojas y ramas en forma oral, tomadas como agua de tiempo (Argueta, 1994). Otros usos reportados para la planta son para la presión arterial, piquete de alacrán, quemaduras y como analgésico.

Antecedentes fitoquímicos: En un ensayo preliminar se aislaron esteroides y taninos del grupo pirogalol y los azúcares; ramnosa, glucosa y xilosa; se identificó el estigmasterol y el β sistosterol, cabe comentar que no hay nada publicado al respecto (Argueta, 1994). En otro estudio se reporta la presencia de saponinas, taninos, esteroides y fenoles y la ausencia de alcaloides, flavonoides y glucosidos cardiotónicos (Trejo, 1983).

Antecedentes farmacológicos: En 1983, en un estudio realizado con ratones CD1 con diabetes inducida por aloxan se reportó la actividad hipoglucemiante del extracto de la planta, la glucosa fue medida por medio de tiras dextroxtis, el extracto que reportan los autores como activo es el hexánico (Trejo, 1983).

Roman Ramos y cols., (1991) reporta la acción hipoglucemiante del extracto acuoso de la hoja, para demostrar el efecto tomaron dosis de 132 g de hoja hervidos en un litro de agua, esta infusión se aplicó a conejos hiperglicémicos en dosis de 4ml/kg de peso, los animales se hicieron hiperglicémicos por la inyección intracutánea de glucosa en dosis de 2g/kg los autores reportan un efecto hipoglucemiante de la planta con una $p < 0.005$ a los 60 minutos, con una $p < 0.05$ a los 120 y 180 minutos y sin significancia estadística a los 240 y 300 min.

Posible toxicidad: El extracto acuoso y liofilizado de las hojas provocó taquicardia en ratas al administrarse por vía intravenosa en dosis de 10 mg/kg (Argueta, 1994).

Objetivo general del presente estudio.

Basados en las aportaciones realizadas en la introducción del presente estudio, la metodología se dividió en tres partes fundamentales; etnobotánica, fitoquímica y farmacología. Para poder dar continuidad al escrito cada sección se manejó de forma individual es decir en cada una cuenta con su objetivo, metodología y resultados, al final de la obra se dan las conclusiones generales del estudio.

Objetivos Generales

- Realizar el estudio etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlecht & Cham
- Realizar el estudio etnofarmacológico de *Cecropia obtusifolia* Bertol.

Los objetivos específicos de cada metodología se detallan en los capítulos correspondientes.

Posible toxicidad: El extracto acuoso y liofilizado de las hojas provocó taquicardia en ratas al administrarse por vía intravenosa en dosis de 10 mg/kg (Argueta, 1994).

Objetivo general del presente estudio.

Basados en las aportaciones realizadas en la introducción del presente estudio, la metodología se dividió en tres partes fundamentales; etnobotánica, fitoquímica y farmacología. Para poder dar continuidad al escrito cada sección se manejó de forma individual es decir en cada una cuenta con su objetivo, metodología y resultados, al final de la obra se dan las conclusiones generales del estudio.

Objetivos Generales

- Realizar el estudio etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlecht & Cham
- Realizar el estudio etnofarmacológico de *Cecropia obtusifolia* Bertol.

Los objetivos específicos de cada metodología se detallan en los capítulos correspondientes.

Objetivo de la metodología Etnobotánica

Objetivo específico: Recabar la información sobre el uso tradicional de; *Equisetum myriochaetum* Schlecht & Cham y *Cecropia obtusifolia* Bertol en las comunidades de estudio.

Metodología de campo.

La finalidad de la metodología de campo fue la de coleccionar el material vegetal en sus lugares de origen así como de obtener la información respecto a la forma de colecta, uso y dosificación empleadas por los especialistas y pacientes.

Comunidades de estudio: Basados en los trabajos etnobotánicos previamente realizados por Gómez Campos (1986) y Andrade (1995) se escogió a la comunidad de Xochipala en el estado de Guerrero.

Con base a la distribución de las especies y trabajos etnobotánicos realizados por Andrade (1996, 1997) se escogieron las comunidades de San Felipe Usila en Oaxaca y Tlanchinol Hidalgo.

Para corroborar el uso medicinal de las plantas, reportado en las comunidades de estudio, se visitaron los mercados de plantas medicinales de Iguala y Chilpancingo en Guerrero, San Luis Potosí en San Luis Potosí, Huejutla en Hidalgo, Tuxtepec en Oaxaca, Tepoztlán en Morelos y Sonora en México DF. Como puede observarse el trabajo se desarrolló principalmente en la zona centro de México.

En las comunidades de Xochipala, Gro. y Uscila Oax., se aplicó un cuestionario dirigido, reportado previamente en Andrade (1995), sobre las plantas de interés; se obtuvo la forma de colecta, de secado, preparación, parte empleada y dosis administrada, utilizadas por los especialistas en la materia. Los datos del cuestionario se apoyaron en datos tomados en libretas de campo, el resto de la metodología etnobotánica se siguió de acuerdo a Andrade (*idem ant.*)

En compañía de los mencionados especialistas tradicionales se procedió a la recolecta de las plantas, el material vegetal se colectó fresco, se realizaron ejemplares de herbario que fueron depositados en el herbario de plantas medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social y se colectaron de cuatro a cinco kilos de material vegetal fresco (Partes aéreas de *Equisetum* y hojas de *Cecropia*); éste se seco a temperatura ambiente en los sitios de colecta, se transportó a la ciudad de México y fue molido, con un molino mecánico, para su posterior uso, el material molido se almacenó a temperatura ambiente en bolsas de papel estraza.

En los mercados de plantas medicinales se buscaron ambas plantas; sobre la base de entrevistas dirigidas practicadas a los locatarios del mercado se confirmó tanto el uso, la forma de preparación, la dosis empleada y la forma de administración de las

plantas, estos datos coinciden con los proporcionados por los especialistas tradicionales y las personas diabéticas de las comunidades visitadas.

Resultados Etnobotánicos

En el presente trabajo se reportan los resultados concretos tomados de la aplicación de las entrevistas y colecta de datos, tanto en las comunidades de estudio como en los mercados, los datos conceptuales de la enfermedad obtenidos como resultado de las entrevistas pueden consultarse en Andrade (1995, 1997).

Solo mencionaremos que la diabetes es conocida popularmente como azúcar en la sangre y que su causa se atribuye a un susto, a gusto o disgusto.

Equisetum. En nuestra investigación etnobotánica se encontró que la Cola de Caballo se utiliza en la comunidad de Xochipala Guerrero para tratar a pacientes con diabetes tipo 2.

La planta es colectada en la cañada de "tres cruces", para lo cual se colecta entera (sin raíz) y se deja secar uno o dos días al sol, después de esto es almacenada en costales o bolsas en un lugar fresco.

Los especialistas usan toda la planta hervida en agua en dosis de 60 g de planta por 500 ml del agua, el té obtenido se deja enfriar y se consume durante el día en forma de agua de uso.

En los mercados de la parte central de nuestro país, San Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, México y el DF., la planta se usa principalmente para afecciones renales, pero comúnmente es también utilizada en compuestos junto con otras plantas, que son recetados como hipoglucemiantes.

Cecropia. Por su parte el Guarumbo es usado en la comunidad de San Felipe Usila, Oaxaca y en la comunidad de Tlanchinol Hidalgo para aliviar los síntomas de la diabetes.

En la primera comunidad se colecta la planta en los alrededores, ya que crece espontáneamente, principalmente en el cerro "casa". El árbol se corta desde la base y se toman las numerosas hojas que de ella salen, estas se doblan y se guardan en costales para su transportación, una vez en el poblado las plantas se secan al sol y el especialista guarda las hojas en costales (de un árbol se obtienen aproximadamente 60 hojas). Una vez secas utiliza de dos a tres hojas hervidas en 250 ml de agua, empleándolas como agua de uso.

En la comunidad de Tlanchinol Hgo., la planta se colecta en el camino a San Salvador, básicamente donde inicia el bosque tropical y ya fuera de los límites de la comunidad, pero dentro del municipio. La forma de colecta y preparación es similar a la reportada en San Felipe Usila.

plantas, estos datos coinciden con los proporcionados por los especialistas tradicionales y las personas diabéticas de las comunidades visitadas.

Resultados Etnobotánicos

En el presente trabajo se reportan los resultados concretos tomados de la aplicación de las entrevistas y colecta de datos, tanto en las comunidades de estudio como en los mercados, los datos conceptuales de la enfermedad obtenidos como resultado de las entrevistas pueden consultarse en Andrade (1995, 1997).

Solo mencionaremos que la diabetes es conocida popularmente como azúcar en la sangre y que su causa se atribuye a un susto, a gusto o disgusto.

Equisetum. En nuestra investigación etnobotánica se encontró que la Cola de Caballo se utiliza en la comunidad de Xochipala Guerrero para tratar a pacientes con diabetes tipo 2.

La planta es colectada en la cañada de "tres cruces", para lo cual se colecta entera (sin raíz) y se deja secar uno o dos días al sol, después de esto es almacenada en costales o bolsas en un lugar fresco.

Los especialistas usan toda la planta hervida en agua en dosis de 60 g de planta por 500 ml del agua, el té obtenido se deja enfriar y se consume durante el día en forma de agua de uso.

En los mercados de la parte central de nuestro país, San Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, México y el DF., la planta se usa principalmente para afecciones renales, pero comúnmente es también utilizada en compuestos junto con otras plantas, que son recetados como hipoglucemiantes.

Cecropia. Por su parte el Guarumbo es usado en la comunidad de San Felipe Usila, Oaxaca y en la comunidad de Tlanchinol Hidalgo para aliviar los síntomas de la diabetes.

En la primera comunidad se colecta la planta en los alrededores, ya que crece espontáneamente, principalmente en el cerro "casa". El árbol se corta desde la base y se toman las numerosas hojas que de ella salen, estas se doblan y se guardan en costales para su transportación, una vez en el poblado las plantas se secan al sol y el especialista guarda las hojas en costales (de un árbol se obtienen aproximadamente 60 hojas). Una vez secas utiliza de dos a tres hojas hervidas en 250 ml de agua, empleándolas como agua de uso.

En la comunidad de Tlanchinol Hgo., la planta se colecta en el camino a San Salvador, básicamente donde inicia el bosque tropical y ya fuera de los límites de la comunidad, pero dentro del municipio. La forma de colecta y preparación es similar a la reportada en San Felipe Usila.

Las entrevistas en los mercados investigados reportaron siempre el mismo uso para la planta con la misma dosis.

Para ambas plantas se colectó el material empleado por los especialistas tradicionales y se peso en una balanza granataria, del mismo modo se midió el agua empleada en los tés en una probeta, cabe mencionar que el resultado obtenido es un promedio de varias mediciones efectuadas con lo cual se elaboró la figura 7. Se regresó a las comunidades de origen tantas veces como fue necesario para obtener material vegetal nuevo utilizado en las dos etapas siguientes.

Nombre Científico	Nombre Popular	Uso	Parte Empleada	Gramos	Agua/ml
<i>Equisetum myriochaetum</i>	Cola de Caballo	Hipoglucemiante	Tallos y vainas (partes aéreas)	60 en seco	500 ml.
<i>Cecropia Obtusifolia</i>	Guarumbo Hormiguillo	Hipoglucemiante	Hojas	25 en seco	250 ml.

Figura 7, Resultado del estudio etnobotánico.

Fitoquímica

En este capítulo se describe la metodología fitoquímica y los resultados con ella obtenidos, esta parte se desarrolló en su totalidad en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania en los siguientes periodos; mayo a diciembre de 1996, mayo a julio de 1997 y diciembre 1997 a enero de 1998.

Objetivo de la metodología fitoquímica:

Objetivos específicos: Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*.

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la fracción butanólica, del extracto metanólico, de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*.

Metodología:

El procedimiento se realizó para ambas plantas por lo que se describe solo una vez, en caso de algún procedimiento especial para alguna especie este se remarca, para facilitar en el manejo, la extracción se divide en diversas etapas.

Etapas 1a Extracción:

Se pesaron 700 gramos de material vegetal seco y molido, se colocaron para extracción en aparato de Soxhlet.

La primera extracción se realizó con n-hexano (2 litros) durante 24 horas, de aquí se obtuvo el extracto hexánico (eHx), el material se dejó en el cartucho y se secó a temperatura ambiente, posteriormente se extrajo con metanol (2 litros) por 48 horas (segunda extracción), obteniéndose el extracto metanólico (eMe).

De Ambos extractos se produjeron 5 litros los cuales se evaporaron a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor Buchi.

Los extractos secos se colocaron en matraces de 100 ml y fueron guardados en congelación a -4° C.

Etapas 2a Cromatografía en capa fina:

A los extractos obtenidos; hexánico, metanólico y posteriormente fracción butanólica se les realizó cromatografía en placa fina usando (DC-alufolien Kiesegel) 60 F₂₅₄ 20x20 2mm.

El sistema se corrió con cuatro mezclas de dicloro-metano (MeCl) - metanol (MeOH), en cámaras de vidrio con las siguientes concentraciones de cada solvente:

Fitoquímica

En este capítulo se describe la metodología fitoquímica y los resultados con ella obtenidos, esta parte se desarrolló en su totalidad en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania en los siguientes periodos; mayo a diciembre de 1996, mayo a julio de 1997 y diciembre 1997 a enero de 1998.

Objetivo de la metodología fitoquímica:

Objetivos específicos: Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuso de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*.

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la fracción butanólica, del extracto metanólico, de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*.

Metodología:

El procedimiento se realizó para ambas plantas por lo que se describe solo una vez, en caso de algún procedimiento especial para alguna especie este se remarca, para facilidad en el manejo, la extracción se divide en diversas etapas.

Etapas 1a Extracción:

Se pesaron 700 gramos de material vegetal seco y molido, se colocaron para extracción en aparato de Soxhlet.

La primera extracción se realizó con n-hexano (2 litros) durante 24 horas, de aquí se obtuvo el extracto hexánico (eHx), el material se dejó en el cartucho y se secó a temperatura ambiente, posteriormente se extrajo con metanol (2 litros) por 48 horas (segunda extracción), obteniéndose el extracto metanólico (eMe).

De Ambos extractos se produjeron 5 litros los cuales se evaporaron a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor Buchi.

Los extractos secos se colocaron en matraces de 100 ml y fueron guardados en congelación a -4° C.

Etapas 2a Cromatografía en capa fina:

A los extractos obtenidos; hexánico, metanólico y posteriormente fracción butanólica se les realizó cromatografía en placa fina usando (DC-alufolien Kieselgel) 60 F₂₅₄ 20x20 2mm.

El sistema se corrió con cuatro mezclas de dicloro-metano (MeCl) - metanol (MeOH), en cámaras de vidrio con las siguientes concentraciones de cada solvente:

Fitoquímica

En este capítulo se describe la metodología fitoquímica y los resultados con ella obtenidos, esta parte se desarrolló en su totalidad en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania en los siguientes periodos; mayo a diciembre de 1996, mayo a julio de 1997 y diciembre 1997 a enero de 1998.

Objetivo de la metodología fitoquímica:

Objetivos específicos: Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*.

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la fracción butanólica, del extracto metanólico, de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*.

Metodología:

El procedimiento se realizó para ambas plantas por lo que se describe solo una vez, en caso de algún procedimiento especial para alguna especie este se remarca, para facilidad en el manejo, la extracción se divide en diversas etapas.

Eta 1a Extracción:

Se pesaron 700 gramos de material vegetal seco y molido, se colocaron para extracción en aparato de Soxhlet.

La primera extracción se realizó con n-hexano (2 litros) durante 24 horas, de aquí se obtuvo el extracto hexánico (eHx), el material se dejó en el cartucho y se secó a temperatura ambiente, posteriormente se extrajo con metanol (2 litros) por 48 horas (segunda extracción), obteniéndose el extracto metanólico (eMe).

De Ambos extractos se produjeron 5 litros los cuales se evaporaron a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor Büchi.

Los extractos secos se colocaron en matraces de 100 ml y fueron guardados en congelación a -4° C.

Eta 2a Cromatografía en capa fina:

A los extractos obtenidos; hexánico, metanólico y posteriormente fracción butanólica se les realizó cromatografía en placa fina usando (DC-alufolien Kieselgel) 60 F₂₅₄ 20x20 2mm.

El sistema se corrió con cuatro mezclas de dicloro-metano (MeCl) - metanol (MeOH), en cámaras de vidrio con las siguientes concentraciones de cada solvente:

- 1) MeCl 85% - MeOH 15%.
- 2) MeCl 80% - MeOH 20%.
- 3) MeCl 50% - MeOH 50%.
- 4) MeCl 70% - MeOH 10%- 20% acetona.

Las placas obtenidas se rociaron con los siguientes reveladores ("Naturstoff-Reagenz"):

Dragendorff; detecta alcaloides.

Acido Bourínico; detecta flavonoides.

Reactivo de Ehrlich; detecta grupos amino libres y fenoles.

Vainillina; detecta terpenos.

Anisaldehido; detecta glicosidos.

Una vez detectadas las sustancias de interés presentes en los extractos, en este caso flavonoides, se procedió a realizar otra extracción con mayor especificidad.

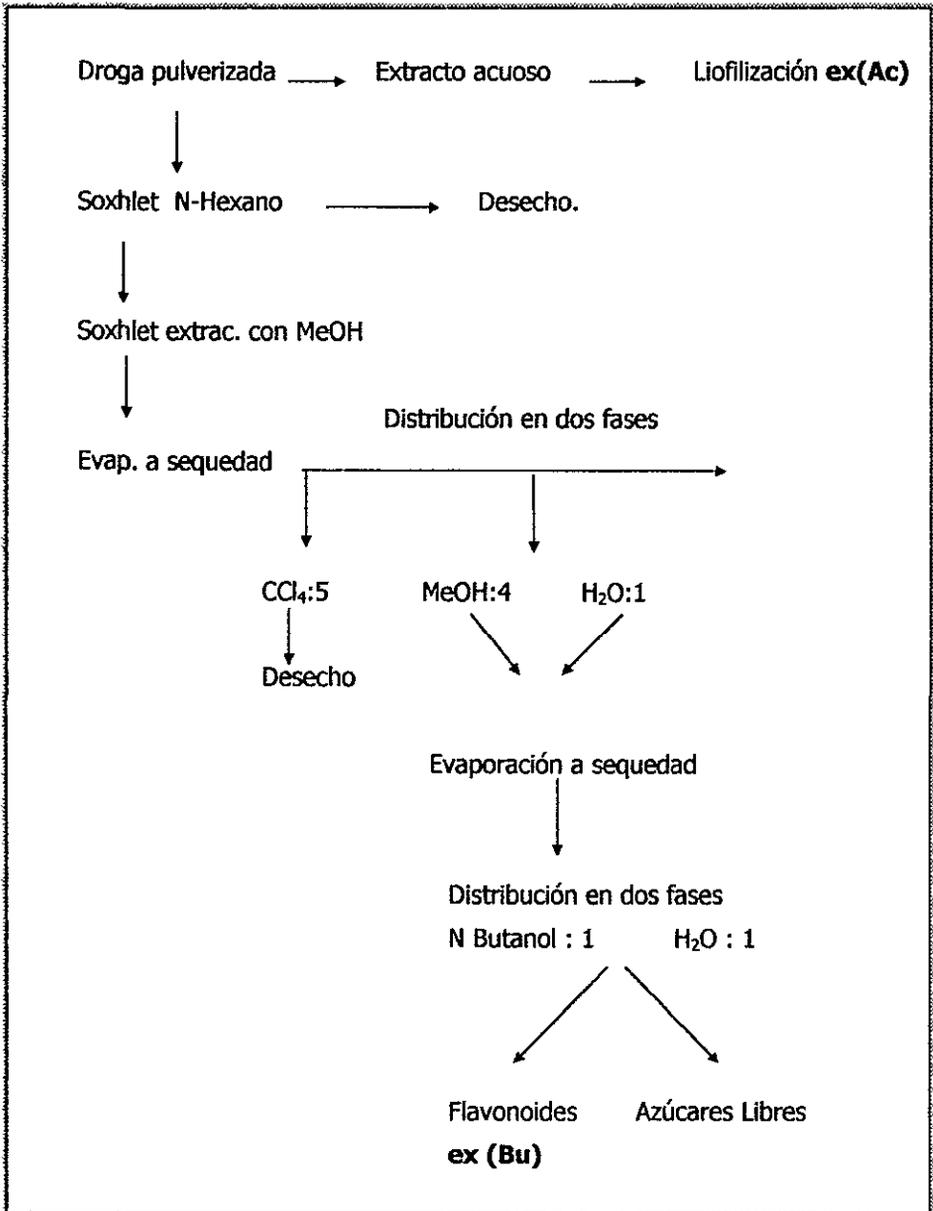
Etapa 1b Extracción:

El extracto metanólico obtenido, se trató con una mezcla de tetracloruro de carbono y metanol (CCl_4 / 80% MeOH 1:1), ésta se colocó en un embudo hasta que se observó una separación. La fase de tetracloruro de carbono que contiene principalmente las clorofilas fue desechada y la fase metanólica fue tratada con una mezcla de metanol-agua MeOH/ H_2O , esta fase se evaporó a sequedad y posteriormente fue disuelta en butanol-agua (n-BuOH/ H_2O 1:1).

El residuo butanólico se liofilizó y congeló para su posterior utilización. La fase acuosa que contiene los azúcares libres fue también liofilizada y congelada para el análisis posterior.

El esquema general de extracción para las dos plantas puede resumirse en el siguiente cuadro:

Esquema general de la extracción



Etapas 2b Cromatografía (separación):

El residuo butanólico fue aplicado en una columna "flash"; 100 x 2 cm Polygoprep 60-30 C₁₈ (Macherey & Nagel, Düren, Germany) usando como eluyentes; H₂O/MeOH/AcCN 80:10:10, por periodos de 4 ml/min, la fase móvil se desplazó a presión (6 bar) mediante nitrógeno gaseoso.

Con ayuda del cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC; High Performance Liquid Chromatography), se buscó la mejor resolución en la mezcla de eluyentes para la fase móvil. Las fracciones obtenidas en la columna fueron monitoreadas bajo las siguientes condiciones; columna, ET 250/8/4 Nucleosil 120-5 C₁₈, Macherey & Nagel; 0.04M H₃PO₄/AcCN/MeOH, 0-9 min.: 85/8/7 a 70/15/15, a 20 min.: 70/15/15; 1.5 ml/min.; 220 y 255 nm UV-det.

Una vez encontrado el sistema adecuado es decir aquel que nos dio la mejor separación de los componentes, este se uso para volver a correr la columna "Flash" colectando las muestras con la ayuda de un colector automático cada 3 minutos.

Se obtuvieron en promedio 90 tubos en cada columna, a cada tubo se le realizó un HPLC, comparándolo con el extracto butanólico original, los tubos que coincidieron en los tiempos de retención de la sustancia buscada y en los que su espectro coincidía con el espectro de una de las sustancias del extracto total, fueron colocados juntos y evaporados a sequedad.

Cada sustancia semipura fue cristalizada usando una mezcla de acetona, etanol, agua, para el caso de las sustancias que no cristalizaron se realizo una nueva columna para purificarlas.

Para la purificación se uso una columna de vidrio con silica gel 60, 0.063 a 0.200 a 230 mes/mm, la columna se corrió con aire y se colectaron muestras cada 20 ml, los eluyentes usados fueron metanol:acetonitril en concentraciones de 80:20, 90:10 y metanol:agua 90:10. Las fracciones colectadas se volvieron a probar en el HPLC y se mandaron a pruebas espectroscópicas para obtener sus estructuras.

Finalmente se obtuvieron para Equiseto cuatro sustancias puras las cuales fueron denominadas s1, s2, s2b o s3 y s4.

Para Cecropia se obtuvieron dos sustancias que fueron denominadas s1 y s2.

Etapas 3 Pruebas:

Las seis sustancias fueron enviadas a los siguientes análisis: Resonancia Magnética nuclear ¹H, Resonancia Magnética Nuclear ¹³C y Espectroscopia de masas, los espectros de RNM, fueron realizados en D₆-DMSO/ D₂O t a 400 y 100 MHz, respectivamente con un EIMS: 180°C; 70.

Resultados

Equisetum:

Resultados e interpretación de la cromatografía en capa fina.

- Aspersión con reactivo de Dragendorff: negativo para todas las placas, implica la no presencia de alcaloides.

- Aspersión con ácido difenil-bourinico: La placa con la mezcla 4 (ver etapa 2) del extracto MeOH presenta un corrimiento claro de toda la muestra, en las otras placas el color se concentró en la parte de arriba.

Se repite la placa con el extracto BuOH y se observan cuatro zonas distinguibles de color verde y azul agua, indicando la presencia de **flavonoides**, como glucosidos.

- Aspersión con el reactivo de Ehrlich: negativo para todas las placas, indica la ausencia de grupos amino libres y fenoles.

- Aspersión con Vanillina: las placas del extracto hexánico no mostraron nada, las de metanol y butanol muestran un corrimiento de color permanente pero no se distingue separación de compuestos. Posible presencia de terpenos o clorofilas.

- Aspersión con Anisaldehido: las placas del extracto hexánico resultaron negativas, en las placas del extracto butanólico se observa una concentración superior de color, indica la presencia de **glucosidos**.

Conclusión de TLC: el extracto hexánico no presenta ningún compuesto de interés, los compuestos de interés están en el extracto de butanol, el mejor corrimiento es la placa 2 en la que se aprecian cuatro manchas correspondientes a flavonoides.

HPLC.

Con el sistema citado se corrieron varias muestras del extracto butanólico, obteniendo cuatro picos con los siguientes tiempos de retención: R_t , **1:** 13.2 min., **2:** 11.0 min., **3:** 6.6 min., **4:** 9.5 min.).

Finalmente se uso HPLC preparativo (SP 250/10 Nucleosil 120-7 C_{18} , Macherey & Nagel) para la purificación final de los compuestos de los cuales se obtuvo; **s1** (25 mg), **s2** (20 mg), **s3** (12 mg), **s4** (7 mg).

A continuación se presentan los cromatogramas (HPLC) representativos del extracto acuoso (fig. 8) el extracto butanólico (fig. 9) y una comparación de ambos extractos (fig. 10)

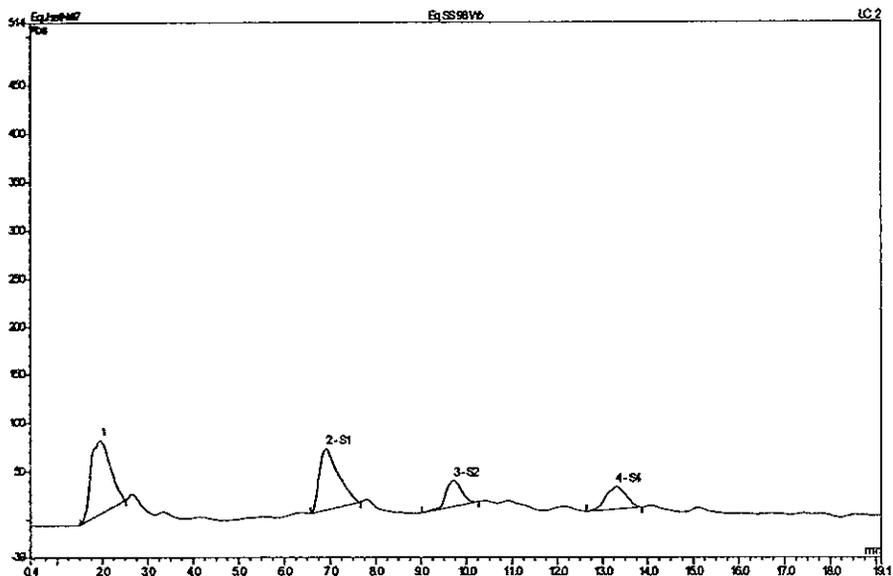


Figura 8, HPLC del extracto acuoso de Equiseto donde se observa la presencia de tres compuestos, s1, s2 y s4.

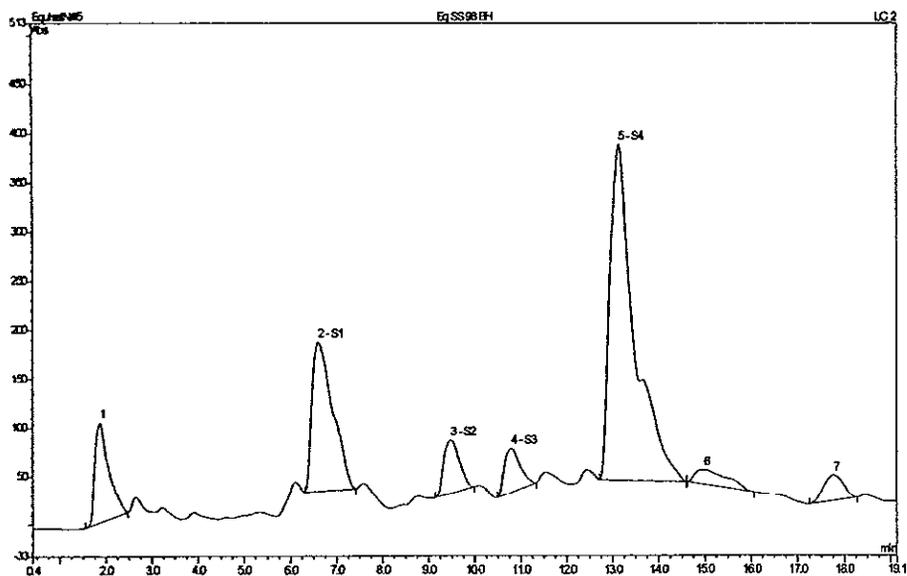


Figura 9, HPLC del extracto Butanólico de Equiseto, donde se nota la presencia de cuatro compuestos; s1, s2, s3 = s2b y s4.

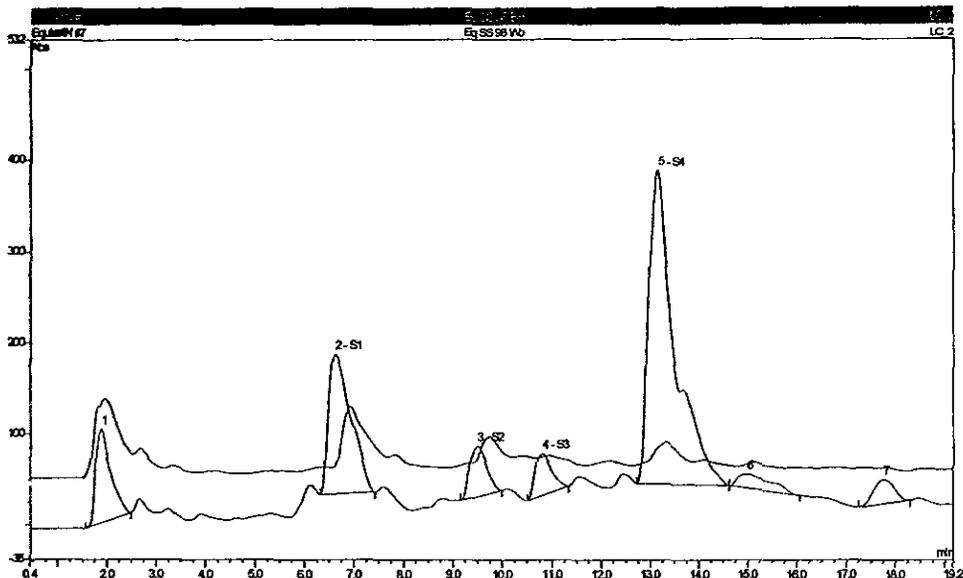


Figura 10, comparación de los cromatogramas de Equiseto donde se ve que los compuestos presentes en el extracto acuoso, están presentes en el extracto butanólico.

Conclusión de HPLC:

El extracto butanólico presenta los cuatro compuestos detectados en la cromatografía en placa fina, estos mismos compuestos se encuentran presentes en el extracto acuoso lo que coincide con la preparación del té medicinal.

Esto hace suponer que probablemente alguno de estos compuestos o todos en su conjunto sean los responsables de la actividad del té medicinal.

Análisis Espectroscópico.

Una vez aislados los compuestos según la metodología indicada fueron enviados a pruebas de espectroscopia de masas, ^1H NMR y ^{13}C NMR. Los datos de Resonancia Magnética Nuclear fueron correlacionados por espectroscopia hetero-nuclear.

Los datos y espectros para cada compuesto se presentan a continuación:

S1: Caempferol-3-β-d-di(1-2)-glucopiranosido-4'-O-glucosido (=Caempferol-3-O-soforosido-4'-O-glucosido).

Las figuras 11 y 12 nos muestran los espectros ¹H-NMR para s1, mientras que la figura 13 nos muestra los espectros ¹³C-NMR. Los datos completos se enlistan en la figura 14.

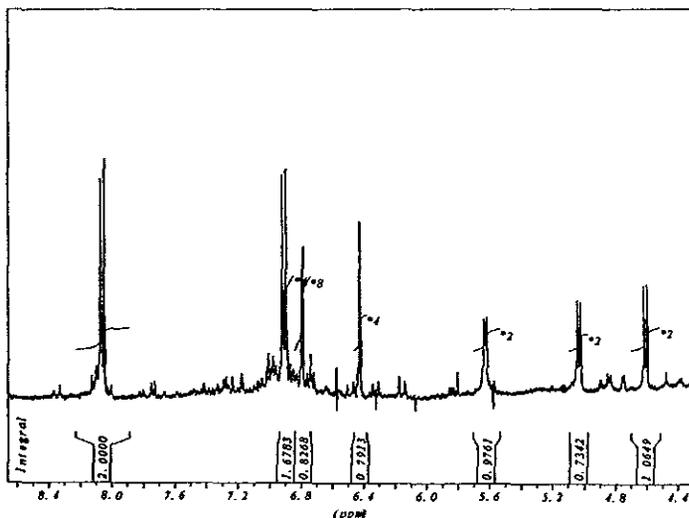


Figura 11: Espectro H-NMR de S1 (rango, campo bajo).

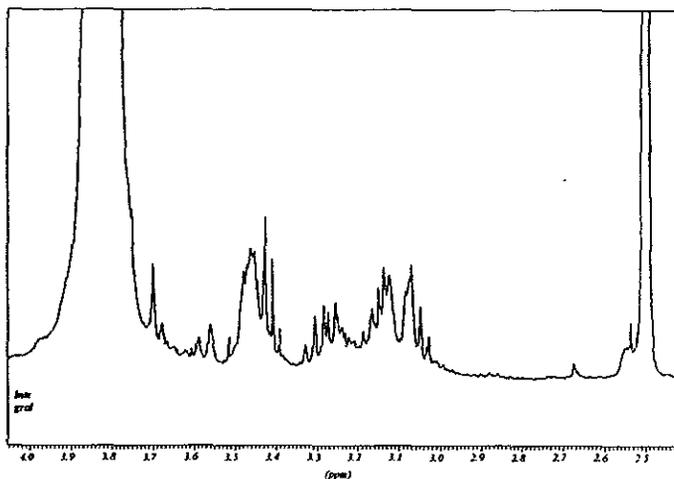


Figura 12: Espectro H-NMR de s1 (rango, campo alto).

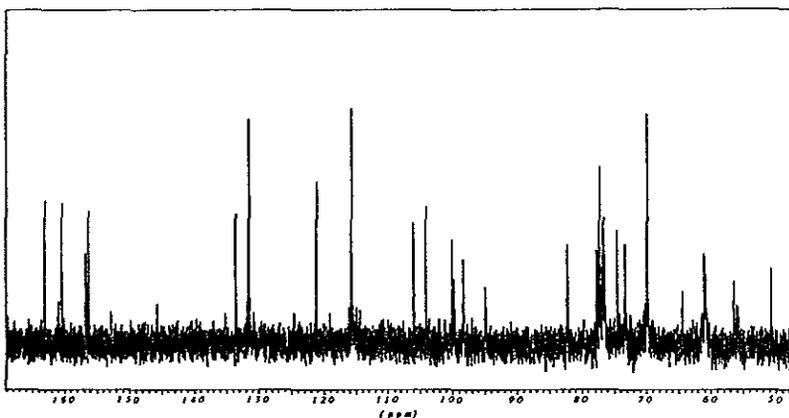


Figura 13; Espectro C-NMR de s1.

C	$\delta = \text{ppm}$	C	$\delta = \text{ppm}$	H en C	$\delta = \text{ppm}; J [\text{Hz}]$
4	178.86	7	163.13	2' / 6'	8.06; 2H, <i>d</i> , $J_{2/16,3/15} = 8.7 \text{ Hz}$
5	160.42	4' / 2	156.85	3' / 5'	6.91; 2H, <i>d</i> , $J_{3/15,2/16} = 8.7 \text{ Hz}$
9	156.43	3	133.65	8	6.79; 1H, <i>d</i> , $J_{8,6} = 1.8 \text{ Hz}$
2' / 6'	131.62	1'	121.23	6	6.43; 1H, <i>d</i> , $J_{6,8} = 1.8 \text{ Hz}$
3' / 5'	115.79	10	106.07	1''	5.63; 1H, <i>d</i> , $J_{1-2''} = 7.2 \text{ Hz}$
1''''	104.17	1''''	100.61	1''''	5.03; 1H, <i>d</i> , $J_{1-2''} = 7.3 \text{ Hz}$
6	99.79	1''	98.43	1''''	4.61; 1H, <i>d</i> , $J_{1-2''} = 7.8 \text{ Hz}$
8	95.01	2''	82.35	6 $_{\alpha}$ '''	3.71; 2H, <i>m</i>
3''	77.77	3''''	77.41	6 $_{\alpha}$ '''	3.58; 1H, <i>d</i> , $J_{6-\alpha,5''} = 10.8 \text{ Hz}$
3''''	77.28	5''	76.87	6 $_{\beta}$ '', 6 $_{\beta}$ '''	3.45; 3H, <i>m</i>
5''''	76.74	5''''	76.51	5'', 5''', 5''''	3.30; 3H, <i>d</i> , $J_{5''/5''',4''/5''''} = 8.9 \text{ Hz}$
2''''	74.21	2''''	73.38	3'', 3''', 3''''	3.25; 3H, <i>d</i> , <i>d</i> , $J = 6.3, J = 5.1 \text{ Hz}$
4'' / 4''''	69.97	4''''	69.84	4'', 4''', 4''''	3.10; 3H, <i>m</i>
6''	61.12	6''''	60.98	OH todos	3.0-4.0
6''''	60.85				

Figura 14, Tabla de datos para s1.

El resultado de las pruebas anteriores nos permitió establecer la siguiente estructura, *no descrita previamente*:

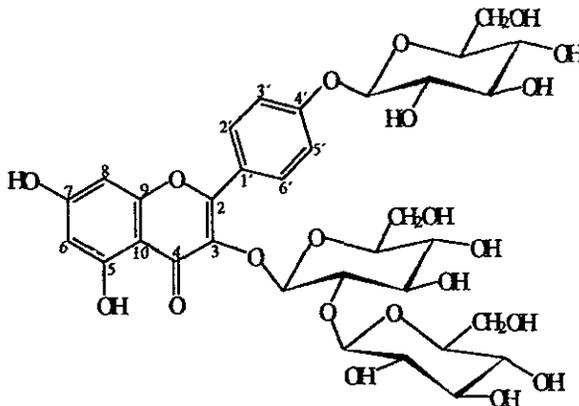


Figura 15: s1, Caempferol-3-β-d-di(1-2)-glucopiranosido-4'-O-glucosido.

S2: Caempferol-3-7-β-d-gluco-piranosido:

La figura 16 nos muestra el espectro $^1\text{H-NMR}$ para s2, la figura 17 nos muestra el espectro $^{13}\text{C-NMR}$, en la figura 18 se muestra el espectro de correlación H,H "COSY". Los datos completos se listan en la figura 19.

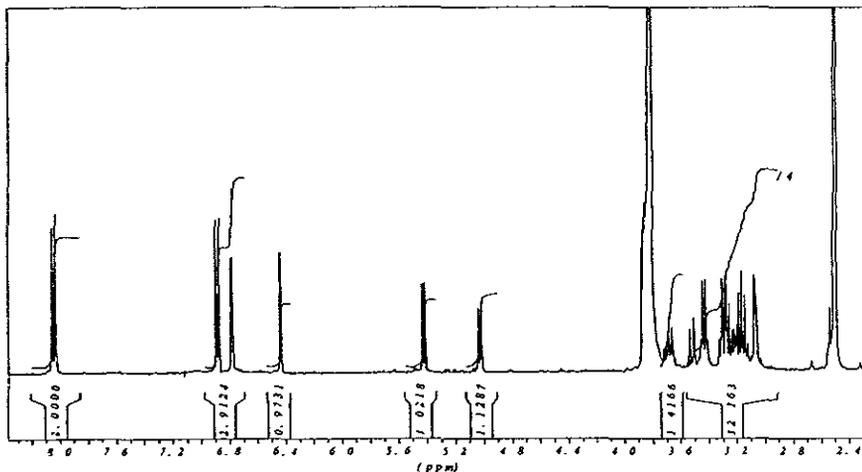


Figura 16: Espectro H-NMR de s2.

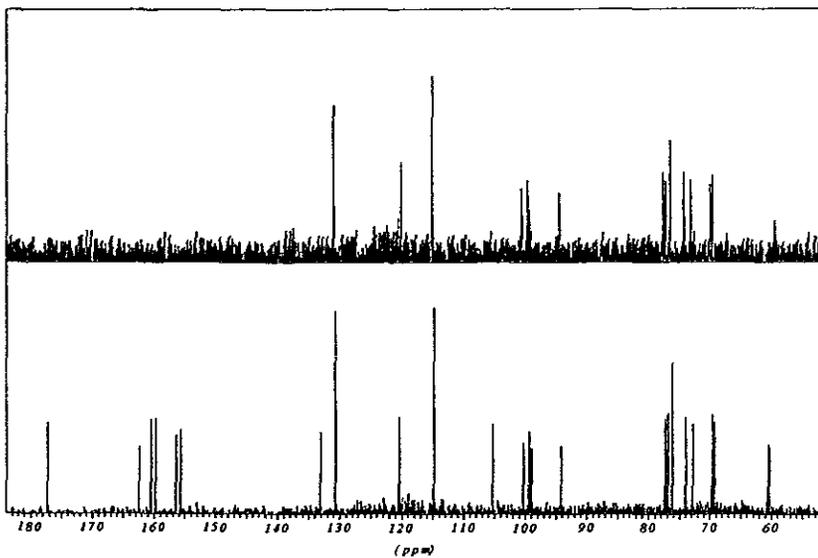


Figura 17: Espectro C-NMR de s2 (Superior: DEPT-135; inferior: espectro).

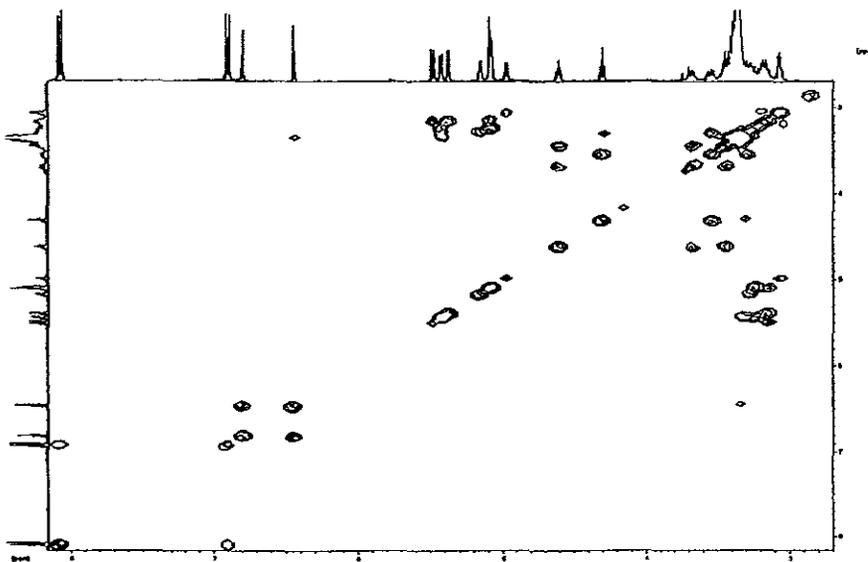


Figura 18: H,H-COSY de s2.

C	$\delta = \text{ppm}$	C	$\delta = \text{ppm}$	H en C	$\delta = \text{ppm}; J [\text{Hz}]$
4	177.66	7	162.83	2'/6'	8.04; 2H, <i>d</i> , $J_{2'/6',3'/5'} = 9.0 \text{ Hz}$
5	160.86	4'	160.14	3'/5'	6.88; 2H, <i>d</i> , $J_{3'/5',2'/6'} = 9.0 \text{ Hz}$
2	156.82	9	156.84	8	6.78; 1H, <i>d</i> , $J_{8,6} = 2.2 \text{ Hz}$
3'	133.46	2'/6'	131.83	6	6.44; 1H, <i>d</i> , $J_{6,8} = 2.27 \text{ Hz}$
1'	120.79	3'/5'	115.17	1''	5.43; 1H, <i>d</i> , $J_{1'',2''} = 7.3 \text{ Hz}$
10	105.65	1'''	100.67	1'''	5.03; 1H, <i>d</i> , $J_{1'',2''} = 7.4 \text{ Hz}$
1''	99.69	6	99.35	6 $_{\alpha}$ ''	3.68; 1H, <i>d</i> , $J_{6\alpha'',6\beta''} = 10.0 \text{ Hz}$, $J_{6\alpha'',5''} = 5.0 \text{ Hz}$
8	94.46	3''	77.57	6 $_{\alpha}$ ''	3.52; 1H, <i>d</i> , $J_{6\beta'',6\alpha''} = 11.3 \text{ Hz}$
3'''	77.17	5''/5'''	76.42	6 $_{\alpha}$ '''	3.43; 1H, <i>d</i> , $J_{2'',3''} = 8.8 \text{ Hz}$, $J_{6\alpha'',5''} = 5.2 \text{ Hz}$
2''	74.22	2'''	73.08	2'',6 $_{\beta}$ '''	3.27; 2H, <i>m</i> , $J_{6\beta'',6\alpha''} = 8.4 \text{ Hz}$
4''	69.90	4'''	69.56	2'''	3.21; 1H, <i>d</i> , $J_{2'',3''} = 8.8 \text{ Hz}$
6''	60.81	6'''	60.81	3'',3'''	3.17; 2H, <i>t</i> , $J = 8.0$,
				4'',4'''	3.06; 2H, <i>dd</i> , $J = 6.4 \text{ Hz}$
				5'',5'''	3.87 2H, <i>m</i>

Figura 19, Tabla de datos para s2.

El resultado de las mediciones anteriores nos permitió establecer la siguiente estructura:

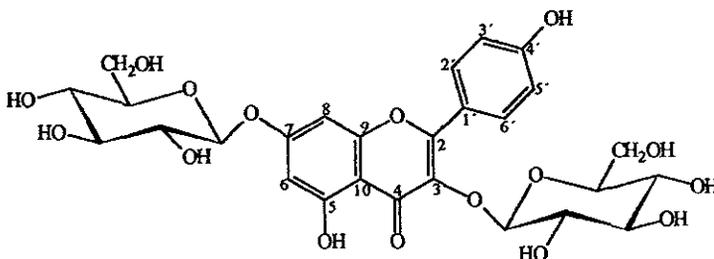


Figura 20: s2, Caempferol-3,7- β -D-glucopiranosido.

S4: Caempferol-3-β-d-di(1-2)-glucopiranosido (= Caempferol-3-O-soforosido):

La figura 21 nos muestra el espectro $^1\text{H-NMR}$ para s4, la figura 22 nos muestra el espectro $^{13}\text{C-NMR}$ y la 23 nos muestra el espectro de correlación H,H. Los datos completos se listan en la figura 24.

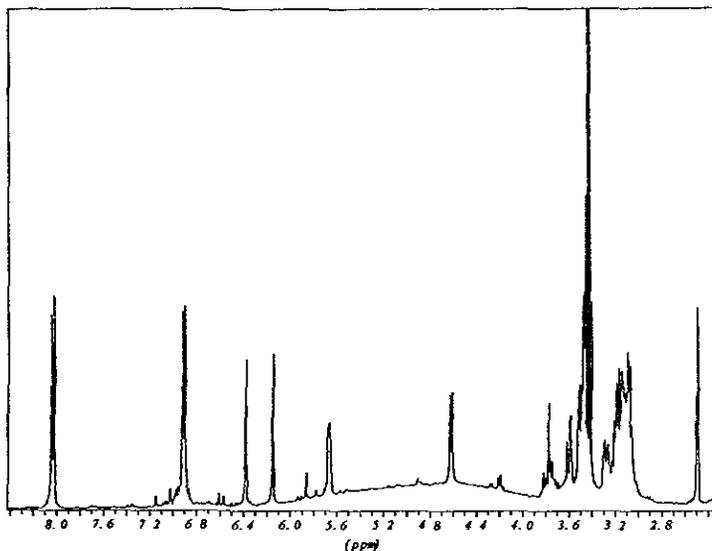


Figura 21, espectro H-NMR de s4.

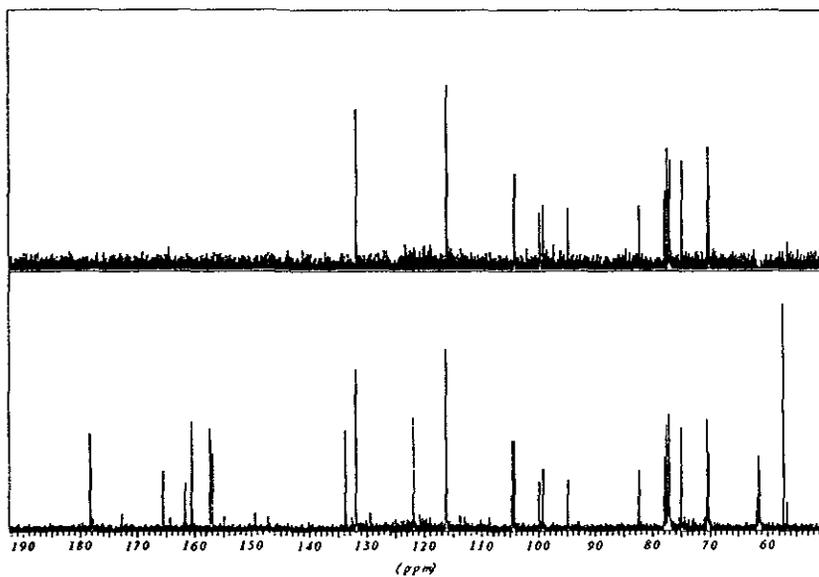


Figura 22; Espectro C-NMR de s4 (arriba, espectro alto; abajo; espectro bajo).

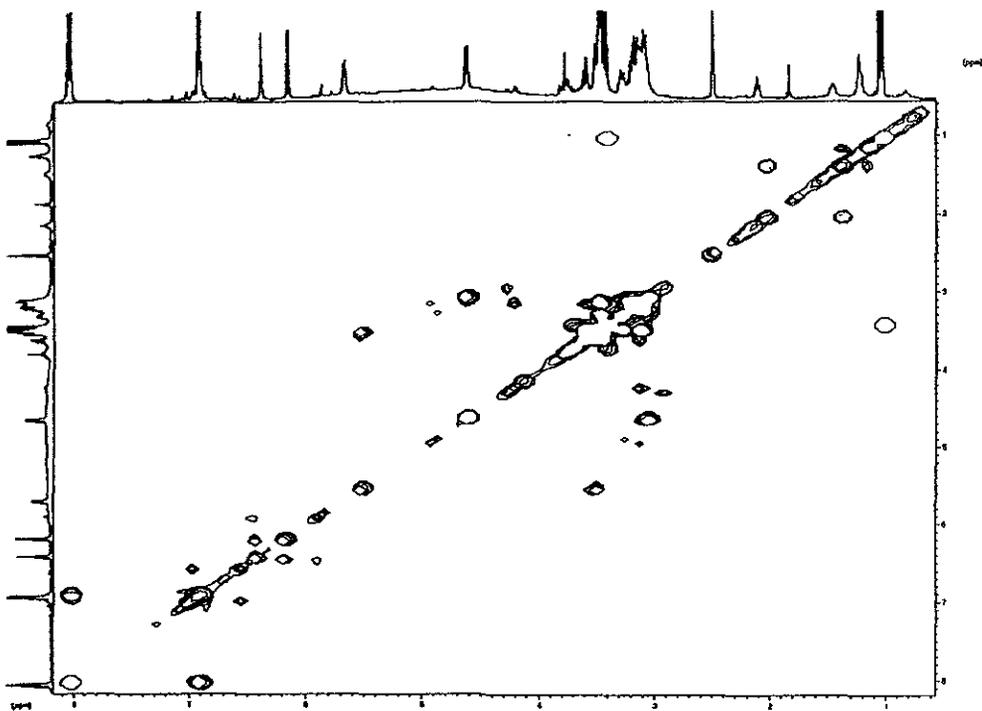


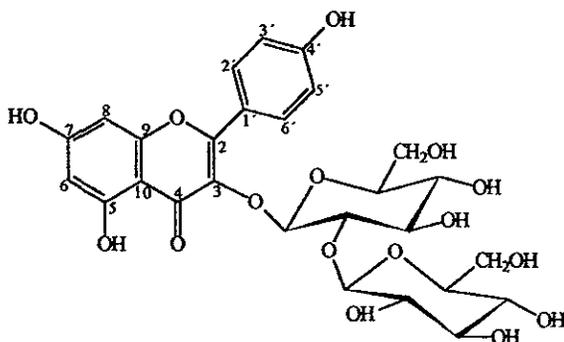
Figura 23; H,H COSY de 54.

C	$\delta = \text{ppm}$	C	$\delta = \text{ppm}$	H at C	$\delta = \text{ppm}; J [\text{Hz}]$
4	178.13	7	165.46	2' / 6'	8.01; 2H, <i>d</i> , $J_{2'16', 3'15'} = 8.8 \text{ Hz}$
5	161.56	4'	160.44	3' / 5'	6.89; 2H, <i>d</i> , $J_{3'15', 2'16'} = 8.8 \text{ Hz}$
9	157.20	2	156.75	8	6.41; 1H, <i>d</i> , $J_{8,6} = 1.7 \text{ Hz}$
3	133.65	2' / 6'	131.76	6	6.17; 1H, <i>d</i> , $J_{6,8} = 1.7 \text{ Hz}$
1'	121.66	3' / 5'	116.05	1''	5.52; 1H, <i>d</i> , $J_{1', 2''} = 6.8 \text{ Hz}$
10	104.42	1'''	104.11	1'''	4.62; 1H, <i>d</i> , $J_{1', 2''} = 7.3 \text{ Hz}$
6	99.68	1	99.09	6 _a ''	3.73; 1H, <i>m</i>
8	94.68	2''	82.16	6 _a '''	3.54; 1H, <i>d</i> , $dJ = 10.6 \text{ Hz}$
3''	77.72	3'''	77.35	5'', 5''' / 6 _B '', 6 _B '''	3.44; 4H, <i>m</i> , $J = 9.8 \text{ Hz}$
5''	76.96	5'''	76.85	2'', 2'''	3.26; 2H, <i>d</i> , $dJ_{2'', 1'''} = 4.5 \text{ Hz}$ $J_{2'', 3'''} = 6.5 \text{ Hz}$

2''''	74.74	4''	70.21	3'', 3'''	3.19; 2H, <i>d,d</i> $J_{3''',2'''} = 6.2$ Hz $J_{3''',4'''} = 8.9$ Hz
4''''	69.97	6''	61.39	4'', 4'''	3.11; 2H, <i>m</i> $J = 8.2$, $J = 6.2$ Hz
6''''	61.08				

Figura 24, Tabla de datos para s4.

Las mediciones obtenidas nos permitieron establecer la siguiente estructura:



Caempferol-3-β-d-di(1-2)-glucopiranosido (= Caempferol-3-O-soforosido)

S3 o S2b: Acido cafeico 4-β-d-metil glucopiranosido.

La figura 25 nos muestra el espectro $^1\text{H-NMR}$ para s2b, mientras que la figura 26 muestra el espectro $^{13}\text{C-NMR}$, la figura 27 muestra el espectro de correlación C, H. Los datos completos se listan en la figura 27.

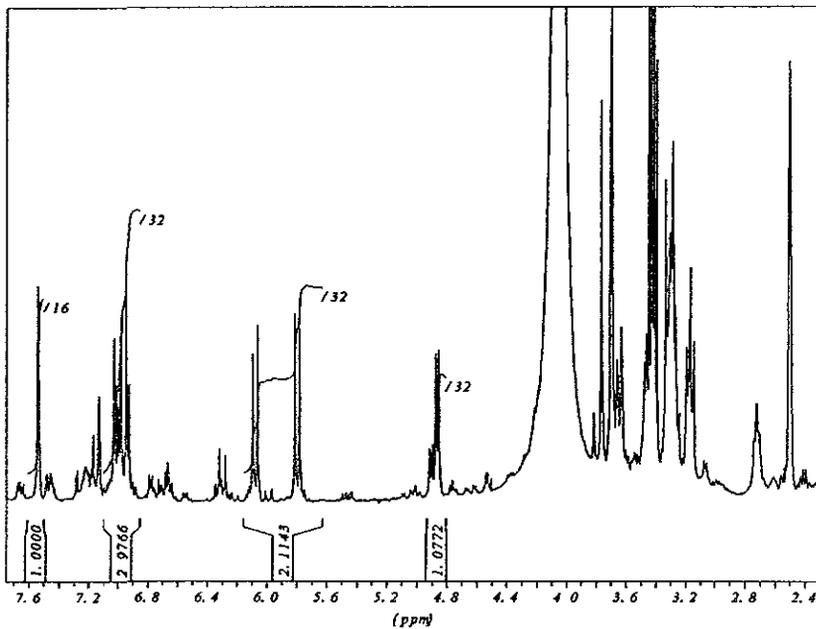


Figura 25; Espectro H-NMR de s2B.

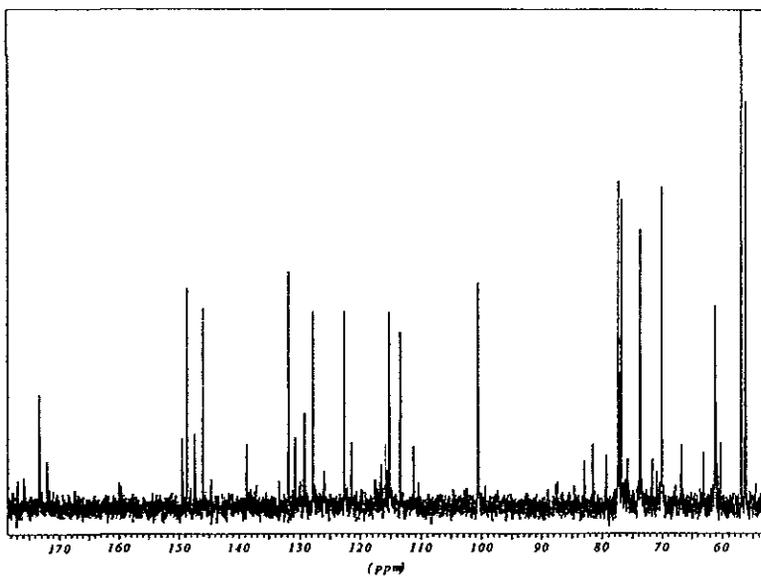


Figura 26; Espectro C-NMR de s2b.

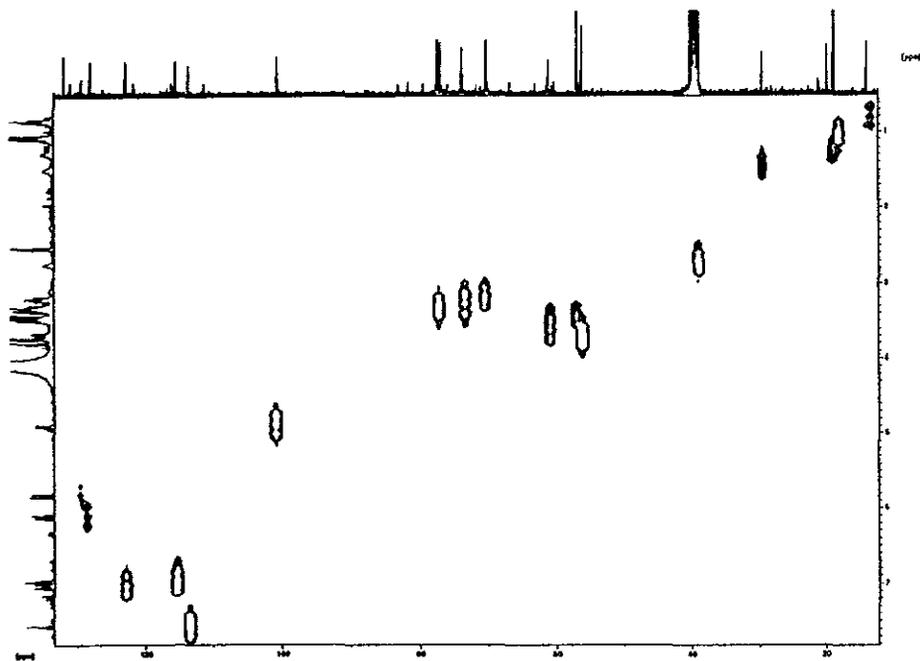
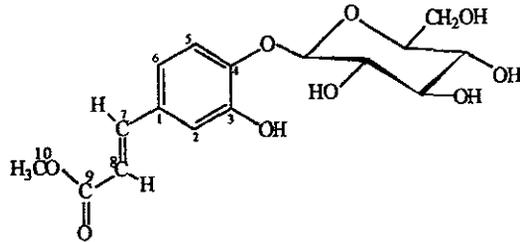


Figura 27; Espectro H,C-COSY de s2b.

C	$\delta = \text{ppm}$	C	$\delta = \text{ppm}$	H en C	$\delta = \text{ppm}; J [\text{Hz}]$
9	173.31	4	148.67	2	7.54; 1H, <i>d</i> , $J = 1.8 \text{ Hz}$
3	146.03	1	131.79	6	6.99; 2H, <i>dd</i> , $J = 8.3; 1.8 \text{ Hz}$
7	129.28	8	127.83	5	6.94; 1H, <i>d</i> , $J = 8.3 \text{ Hz}$
6	122.65	5	115.20	7	6.08; 1H, <i>d</i> , $J = 12.9 \text{ Hz}$
2	113.40	1'	100.55	8	5.74; 1H, <i>d</i> , $J = 12.8 \text{ Hz}$
3'	77.27	5'	76.83	1'	4.87; 1H, <i>d</i> , $J = 7.4 \text{ Hz}$
2'	73.65	4'	70.13	10	3.70; 3H, <i>s</i>
				3'/5'	3.28; 2H, <i>m</i>
				2'	3.22; 1H, <i>m</i> , $J = 3.9 \text{ Hz}$
				4'	3.17; 1H, <i>m</i> , $J = 9 \text{ Hz}$
				6 _a '	3.65; 1H, <i>d</i> , $J = 5.8 \text{ Hz}$
				6 _b '	3.42; 1H, <i>d</i> , $J = 5.8 \text{ Hz}$

Figura 28; Tabla de Datos NMR de s2b.

Los datos anteriores nos permitieron establecer la siguiente estructura:



Acido cafeico 4- β -d-metil glucopiranosido.

Análisis de los resultados:

Como resultado del HPLC preparativo se obtuvieron cuatro compuestos, tres de ellos son glucosidos del caempferol y el cuarto es un éster cafeico.

Resonancia:

El EI-MS mostró para los tres glucósidos de caempferol el mismo espectro con un -ion $[M]^+$ en 286 para la aglicona, indicando la formula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ para los tres compuestos. El arreglo Retro-Diels-Alder (mencionado) fue observado en los iones; m/z 153 ($C_7H_5O_4$) y 121 ($C_7H_5O_2$). Estos datos en combinación con los fragmentos m/z 257 ($C_{14}H_9O_5$) y 229 ($C_{13}H_9O_4$) dan la evidencia de un 3-OH-flavonol (caempferol) con base en el arreglo de moiety.

La confirmación de las estructuras fue realizada sobre la base de los espectros de RMN, los datos de 1H NMR confirmaron la estructura del caempferol, esta confirmación se realizó basándose en los protones aromáticos en 8.00ppm (H-2' y H-6'), y en 6.9ppm (H-3' y H-5'), ambos como dobletes con $J=9$ Hz, así como los protones en 6.6 y 6.4 ppm para H-8 y H-6 respectivamente con $J=2$ Hz.

Para el caempferol-3,7- β -d-glucopiranosido (s2) y el caempferol-3- β -d-di(1-2)-glucopiranosido (s4), dos azúcares moieties fueron encontradas, con señales para H-1 en 5.5, 4.6 para s4 y 5.4, 5.0 ppm, para s2 respectivamente.

Para caempferol-3- β -d-di(1-2)-glucopiranosido-4'-O-glucosido (s1) tres señales H-1 de azúcares pudieron ser detectadas en 5.6, 5.0 y 4.6 ppm. Las constantes de acoplamiento con los protones anoméricos H-2 de 7.0 a 8.0 Hz indican una unión β para todos los azúcares (Agrawal, 1992).

Las pruebas finales para las estructuras fueron realizadas con ^{13}C NMR. Los desplazamientos típicos para los glucósidos del caempferol fueron encontrados, así como para los azúcares. En s4 las señales para H1'' y H1''' se localizaron en 100 ppm lo que confirma la unión de las moléculas de azúcar (β) como D-glucosas (α cerca de 94 ppm). El H-2'' en 82 ppm confirma un O- β -d-[β -d-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) glucopyranosido] (=soforosido). Como el cambio fue encontrado para C-3 en 133 ppm (y no en 136 ppm) el soforosido debe localizarse en esta posición lo cual es además confirmado por los valores del campo bajo para C-7 (165 ppm) lo mismo que para C-4' (160 ppm).

En comparación con s4 los datos de ^{13}C NMR para s2 muestran diferencias en C-2'' (74 ppm) y C-7 (162 ppm). Como las señales para ambas β -d-glucosas de s2 fueron casi idénticas la estructura de s2 tiene que ser Caempferol-3,7-di-O- β -D-glucopiranosido. Todos los datos para s4 y s2 corresponden con los reportados en la literatura para caempferol-3-O-soforosido y caempferol-3,7-di-O-glucosido, respectivamente (Budzianowski, 1990) y Markham (1982).

En s1 las señales para las tres moléculas de glucosa asemejan las señales de una mezcla de s4 y s2 lo que nos lleva a la conclusión de que el azúcar de s3 debe ser una

soforosa así como una β -D-glucosa. La unión de los azúcares se encontró en C-3 y C-4', con base en los valores bajos de C-3 (133 ppm) y los altos en C-7 (163,5 ppm) y del desplazamiento en el campo alto de C-4' de 160 a 156 ppm.

Los desplazamientos correspondientes para el caempferol libre (aislado de s2, hidrolizado) son 135.7 (C-3), 159.2 (C-4') y 163.9 (C-7). Estos datos establecen la estructura de caempferol-3-O-soforosido-4'-O- β -D-glucopiranosido.

Este compuesto ha sido mencionado en la literatura como aislado de *Asplenium septentrionale* y su estructura fue comprobada por FAB-MS y ^1H NMR (Imperato, 1990).

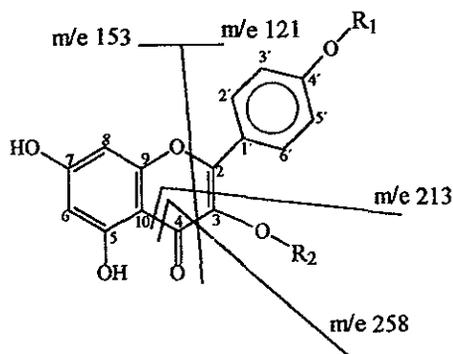
En este estudio se dan por primera vez los datos completos de la resonancia magnética nuclear para s2, los que dan una clara prueba de la unión β de los azúcares en las posiciones 3 y 4' de la aglicona.

Además de los datos ya reportados se encontró que s1 es un caffeoyl-methylato-4- β -D-glucopuranosido. Esto fue confirmado por el MS $[M]^+$ -ion en 177 (M-glucosa) así como los datos de NMR.

Espectroscopia de Masas:

Encontramos que los espectros de masas de los compuestos s1 y s3 son idénticos debidos a que la aglicona es igual (Caempferol), los datos son:

MS de (180 C, 70eV): $[M]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ 286.0484 (100); calc. 286.0477; $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$ 258.0522 (10.99); calc. 258.0528; $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_5$ 257.0459 (8.27); calc. 257.0450; $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_4$ 213.0550 (5.90); calc 213.0552; $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$ 153.0192 (6.64); calc. 153.0188; $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2$ 121.0306 (20.2); calc. 121.0290. El espectro de masa esta caracterizado por el arreglo típico Retro-Diels-Alder y la fragmentación es de acuerdo al siguiente esquema:



Resultados e interpretación de la cromatografía en capa fina:

- Aspersión con reactivo de Dragendorf: dos manchas muy tenues en el extracto de MeOH, las otras placas negativas, no hay presencia de alcaloides e indica la posible reacción de terpenos (ver antecedentes de la planta).
- Aspersión con ácido difenil-bourínico: Positivo para el extracto MeOH, se repite la placa para el extracto BuOH con la mezcla 4 (ver etapa 2), se distinguen dos manchas diferentes una de color amarillo y otra verde, indicando la presencia de **flavonoides**.
- Aspersión con reactivo de Erlich: negativo para todas las placas, indica la ausencia de grupos amino libres y fenoles.
- Aspersión con Vainillina: dos compuestos tenues en el extracto MeOH, las demás placas negativas, posible presencia de terpenos.
- Aspersión con Anisaldehído: negativo, para todas las placas.

Conclusión: El resultado de la placa asperjada con Dragendorf aunado a los compuestos presentes en la placa asperjada con Vainillina indica la presencia de terpenos en pocas cantidades. El extracto butanólico contiene dos flavonoides de interés.

HPLC:

El residuo obtenido de la aplicación del extracto en la columna Polygoprep 60-30 C18, fueron dos fracciones de 10ml, **1:** fr: 16-18 y **2:** 23-26.

Estas fracciones resultantes fueron monitoreadas mediante HPLC en las siguientes condiciones; (ET 250/8/4 Nucleosil 120-5 C₁₈, Macherey & Nagel; 0.04m H₃PO₄/AcCN/MeOH, 0-9 min.: 85/8/7 a 70/15/15, a 20 min.: 70/15/15; 1.5 ml/min.; 220 y 255 nm UV-det). De este monitoreo obtuvimos los siguientes tiempos de retención; R_t of **1:** 5.1 min., **2:** 9.5 min.

HPLC Preparativo HPLC (SP 250/10 Nucleosil 120-7 C₁₈, Macherey & Nagel) fue usado para la purificación final dando como resultado: **1** (12 mg), **2** (8mg).

Los cromatogramas del extracto acuoso y del butanólico se presentan en las figuras 29 y 30 respectivamente.

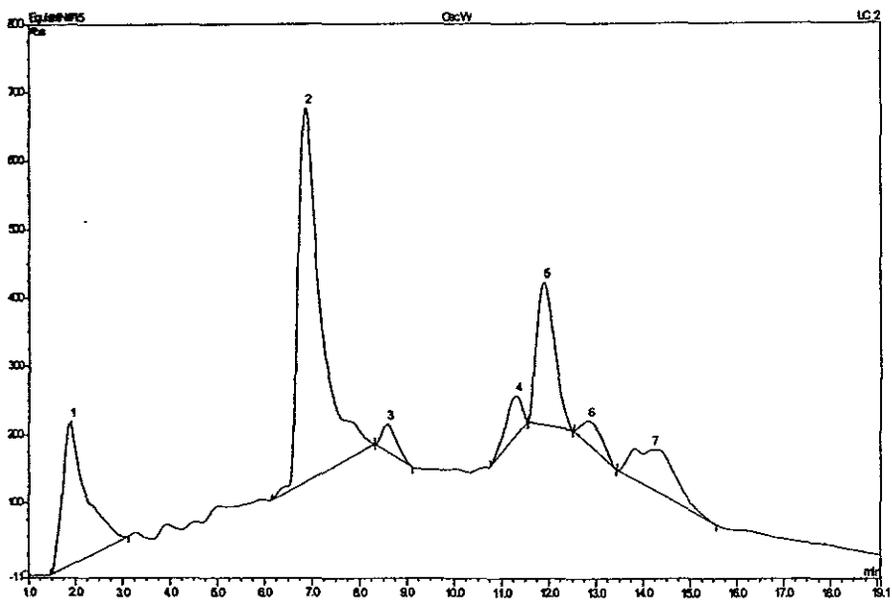


Figura 29, HPLC del extracto acuoso de Cecropia, donde se observan los dos compuestos presentes en la cromatografía en placa, el número 2 corresponde a S1 y 4,5 y 6 a S2.

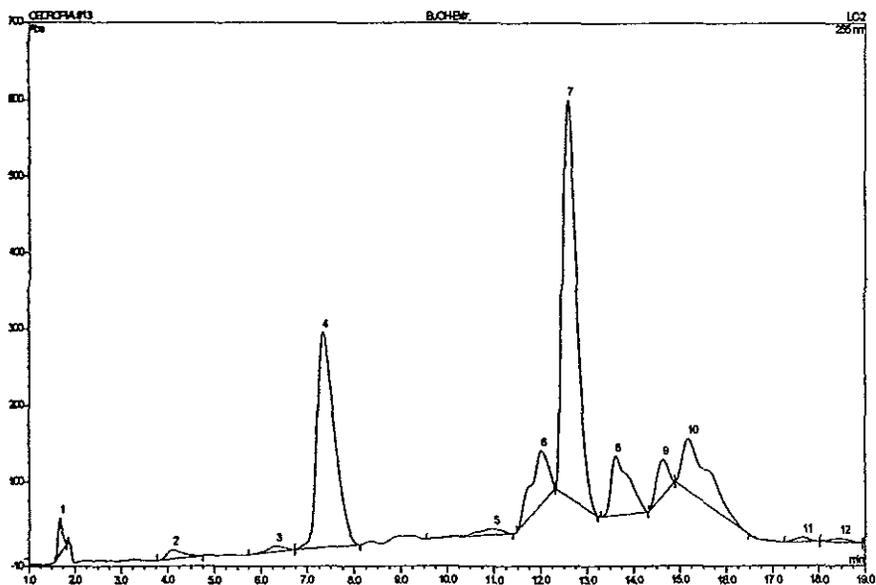


Figura 30, HPLC del extracto butanólico de Cecropia, se aprecia los compuestos presentes en el extracto acuoso, 4 es S1 y 6,7, y 8 S2.

Conclusión de HPLC: El extracto butanólico presenta los dos compuestos detectados en la cromatografía en placa fina, estos mismos compuestos se encuentran presentes en el extracto acuoso lo que coincide con la preparación del té medicinal.

Al igual que en el caso de la planta anterior suponemos que la presencia de los compuestos en el té medicinal puede representar la actividad del mismo.

Análisis Espectroscópico.

Una vez aislados los compuestos según la metodología indicada fueron enviados a pruebas de espectroscopía de masas, ^1H NMR y ^{13}C NMR.

Los datos para cada compuesto se presentan a continuación:

Acido Clorogénico.

Los datos obtenidos son los siguientes, GC-MS m/z (rel. int): = 355.25 $[\text{M}]_{+1}^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_9$ (100) (calc. 355.39), 320.21 (11.5) $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$, 248.15 (73.5) $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_5$, 220.08 (35) $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_7$. Los cuales fueron comparados con los reportados previamente para esta sustancia.

La figura 31 nos presenta el espectro H-NMR para s1 y la figura 32 el espectro C-NMR para la misma sustancia y la figura 33 el espectro COSY, los datos completos se presentan en la figura 34.

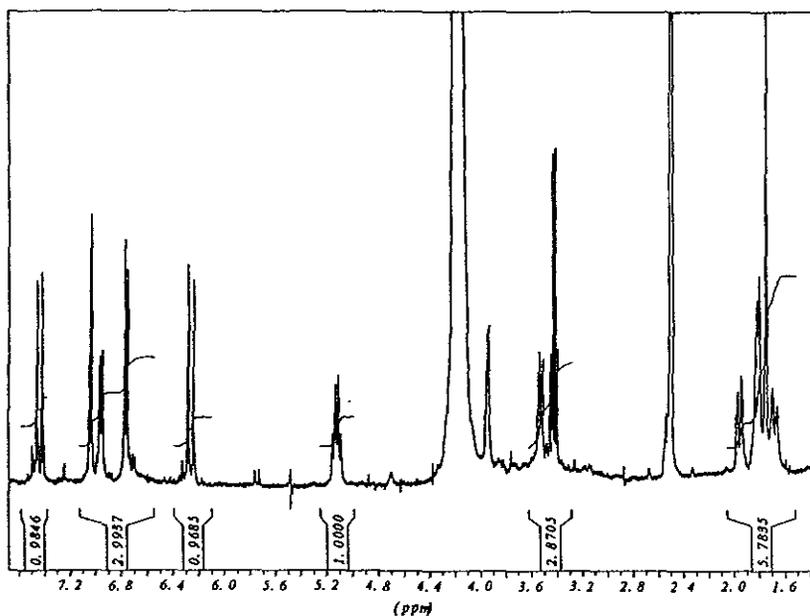


Figura 31: Espectro H-NMR de s1.

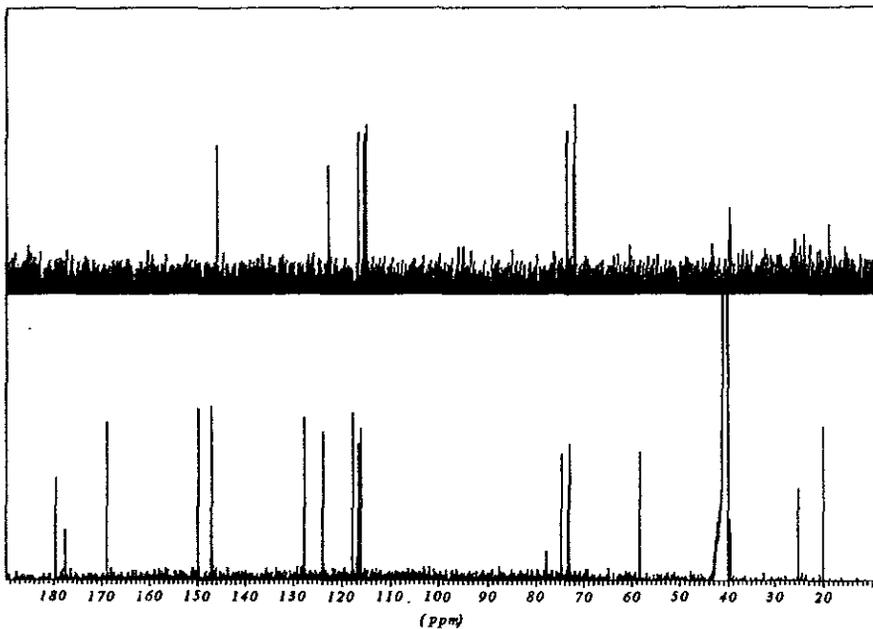


Figura 32: Espectro C-NMR de s1 (Superior, campo alto; Inferior; campo bajo)

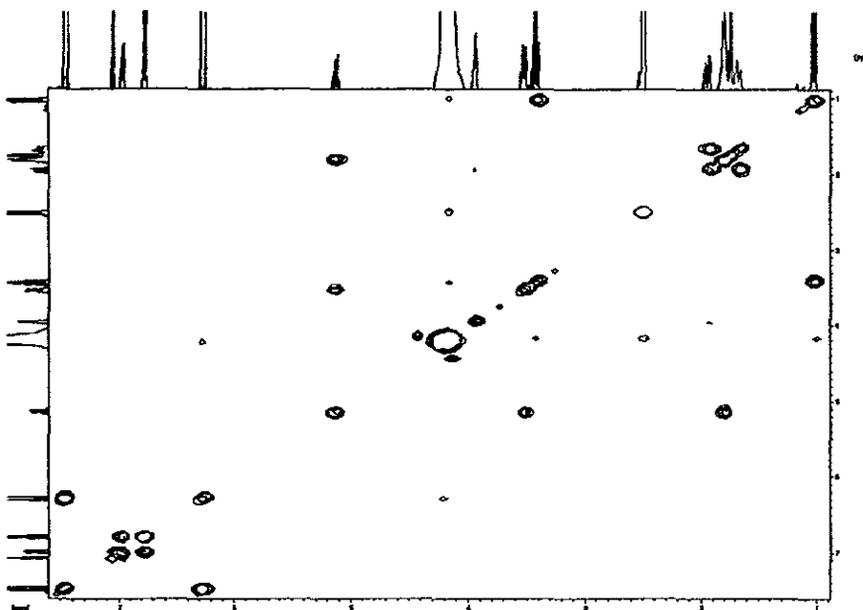
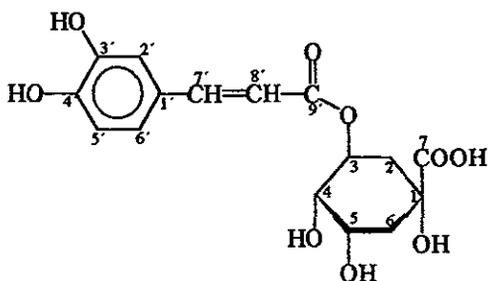


Figura 33: H,H-COSY de s1.

C	$\delta = \text{ppm}$	C	$\delta = \text{ppm}$	H en C	$\delta = \text{ppm}; J [\text{Hz}]$
9'	168.00	4'	148.9	7'	7.44; 1H, <i>d</i> , $J_{7,8} = 15.8 \text{ Hz}$
3'	146.1	7'	146.0	2' H	7.04; 1H, <i>d</i> , $J_{2,6'} = 1.5 \text{ Hz}$
1'	126.7	6'	122.8	6' H	6.95; 1H, <i>dd</i> , $J_{6',5} = 8.2 \text{ Hz}$ $J_{6',2} = 1.5 \text{ Hz}$
5'	116.8	8'	115.5	5' H	6.76; 1H, <i>d</i> , $J_{5,6} = 8.2 \text{ Hz}$
2'	115.1	1	76.7	8' H	6.26; 1H, <i>d</i> , $J_{8,7} = 15.8 \text{ Hz}$
4	73.6	3	72.2	3H	5.12; 1H, <i>d,d</i> , $J_{3,2} = 8.5 \text{ Hz}$ $J_{3,4} = 9.0 \text{ Hz}$
5	72.0	2	40.00	5H	3.94; 1H, <i>ddd</i> , $J_{5,4} = 2.8 \text{ Hz}$ $J_{5,6\alpha} = 2.4 \text{ Hz}$ $J_{5,6\beta} = 1.5 \text{ Hz}$
6	38.4			4H	3.53; 1H, <i>d,d</i> , $J_{4,3} = 9.0 \text{ Hz}$ $J_{4,5} = 2.8 \text{ Hz}$
				6H $_{\alpha}$	1.95; 1H <i>dd</i> , $J_{6\alpha,6\beta} = 11.9 \text{ Hz}$ $J_{6\alpha,5} = 2.4 \text{ Hz}$
				2H $_{\beta}$	1.81; 2H, <i>d</i> , $J_{2,3} = 8.5 \text{ Hz}$
				6H $_{\beta}$	1.67; 1H, <i>dd</i> , $J_{6\beta,6\alpha} = 11.9 \text{ Hz}$ $J_{6\beta,5} = 1.5 \text{ Hz}$

Figura 34, Tabla de datos para s1.

Las mediciones obtenidas nos permitieron establecer la siguiente estructura:



Acido Clorogénico

Isorientina.

La figura 35 nos presenta el espectro H-NMR para s2 y la figura 36 el espectro C-NMR para la misma substancia, los datos completos se presentan en la figura 37.

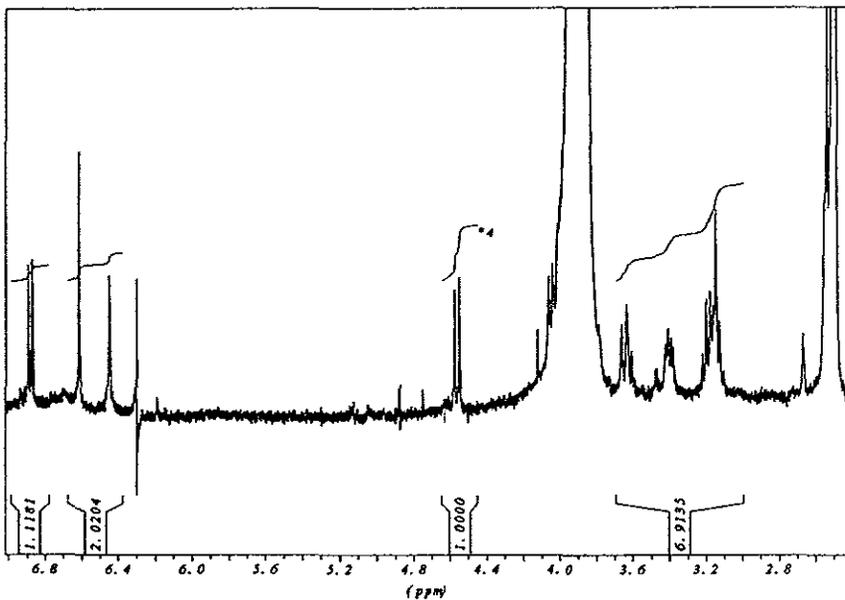


Figura 35: Espectro H-NMR de s2.

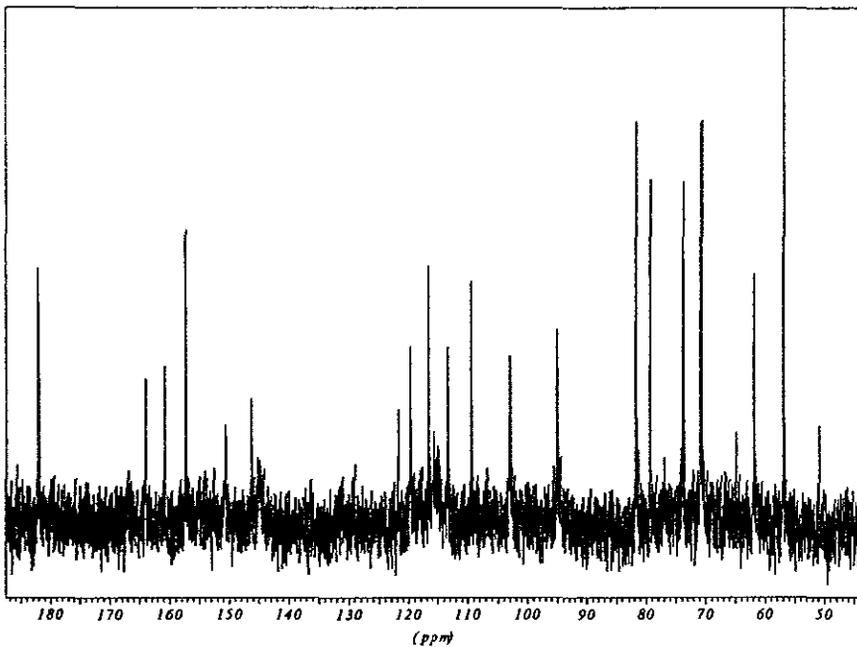
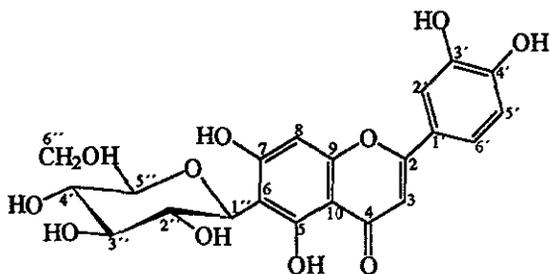


Figura 36: Espectro C-NMR de s2

C	$\delta = \text{ppm}$	C	$\delta = \text{ppm}$	H at C	$\delta = \text{ppm}; J [\text{Hz}]$
4	182.1	2	164.1	6'	7.37; 1H, <i>d,d</i> $J = 8.1 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$.
7	160.9	5 / 9	157.4	8	7.35; 1H
3'	150.6	4'	146.3	5'	6.82; 1H, <i>d</i> , $J = 8.1 \text{ Hz}$
1'	121.9	6'	119.8	3	6.55; 1H
5'	116.8	2'	113.4	2''	6.35; 1H, <i>d</i> , $J = 1.9 \text{ Hz}$
6	109.5	3	103.1	1''	4.55; 1H, <i>d</i> , $J = 9.9 \text{ Hz}$
10	102.9	8	95.1	5''	3.54; 1H, <i>d</i> , $J = 10.7 \text{ Hz}$
5''	81.8	3''	79.4	2''	3.44; 1H, <i>dd</i> , $J = 10.5 \text{ Hz}$ $J = 6.3 \text{ Hz}$
1''	73.9	2''	70.9	3''	3.20; 1H, <i>d</i> , $J = 8.5 \text{ Hz}$
4''	70.7	6''	61.9	4''	3.17; 1H, <i>t</i> , $J = 8.2 \text{ Hz}$
				6''	3.15; 2H, <i>t</i> , $J = 8.0 \text{ Hz}$

Figura 37, Tabla de datos para s2.

Las mediciones obtenidas nos permitieron establecer la siguiente estructura:



Isoorientina.

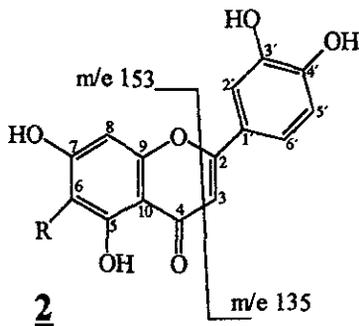
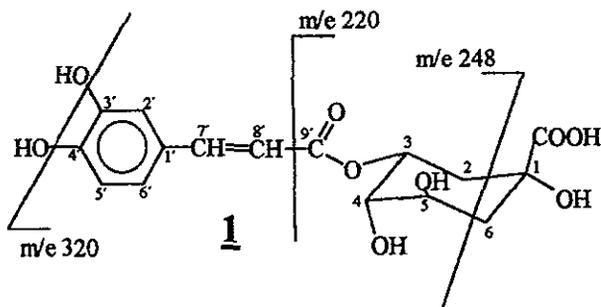
Análisis de los resultados:

Como resultado del HPLC preparativo se obtuvieron dos compuestos, una flavona y el ácido clorogénico.

Espectroscopía de Masas:

El LC-MS de s1 mostró en 335 un $-ion [M]^+ + 1$ indicando la formula molecular $C_{16}H_{19}O_9$. El ion m/z 320 fue observado después de la pérdida de dos grupos hydroxilo. La unión del ácido quínico fue demostrada por el m/z 248 ($M^+ - C_3H_6O_4$). La pérdida del cinnamato fue mostrada por m/z 220 ($C_8H_7O_2$).

El EI-MS para s2 mostró en 286 un $-ion [M]^+$ para la aglicona indicando la formula molecular $C_{15}H_{10}O_6$. El arreglo Retro-Diels-Alder fue observado para los iones m/z 153 ($C_7H_5O_4$) y 135 ($C_8H_7O_2$). Estos datos nos dan la estructura de una flavona. Los arreglos para ambas sustancias se muestran a continuación.



Resonancia:

General: Los espectros de NMR fueron medidos en D₆-DMSO/ D₂O a 400 y 100 MHz, respectivamente con EIMS: 180°C; 70 eV.

LC-MS: Para realizar LC:LI se usó una columna Chrospher RP-18 7 µm, 250x4 mm (Merck, Darmstadt, Germany), con: 15% AcCN + 0.1mol NH₄Ac, B: 50% AcCN + 0.1mol NH₄Ac, 0-15 min. 100% A a 100% B, 1 ml/min.; MS: Iones.: TSP+, 230°C, "nozzler" 230°C, plasma 20 V, "repeller" 163 V, detector 450 V, scanner total de masas 150-600, tiempo de scanner 1.0 sec, 0-18 min.

La confirmación de las estructuras se realizó por RMN. Los datos ¹HNMR para el ácido clorogénico. (s1) probaron la estructura de un éster el, 3,4-dihydroxy-cinnamato en base a los protones aromáticos ABX en 7.04 ppm (H-2'), 6.95 ppm (H-6') y 6.76 ppm (H-5') así como los protones olefénicos vecinos en 7.44 y 6.26 ppm (H-7' y H-8'). Los datos correspondientes al ácido quínico se encontraron a 5.12 ppm (H-3, acoplado a H-4 y H₂-2), 3.94 ppm (H-5, acoplado con H-4 y H₂-6), 3.53 ppm (H-4) y los grupos metilen en H-2 (1.81 ppm) y H-6 (6α a 1.95 y 6β a 1.67 ppm).

En comparación con los datos para el ácido quínico o clorogénico (ácido 1L-1(OH),3,4/5-carboxil-tetrahydroxycyclohexano), (Fa. Roth, Karlsruhe, Germany) y los datos reportados por Ritter, (1990) para el ácido neoclorogénico se encontraron diferencias en H-3 con las constantes de acoplamiento de 8.5 y 9 Hz, en el acoplamiento con H-2 y H-4 respectivamente.

Además las bajas constantes de acoplamiento para H-5 a H-6 (2.4 y 1.5 Hz) y el haber encontrado que ambos protones en C-2 muestran valores de desplazamiento idénticos mientras que aquellos en C-6 muestran un rompimiento AB en 1.81 y 1.67 ppm nos llevan a la conclusión que s1 muestra la estructura del ácido clorogénico.

El modelo estructural (PC-Model, Serena Software, Bloomington, U.S.A.) muestra que esas constantes de acoplamiento solo resultan si el ácido quínico tiene la conformación 1D-1(OH),4,5/3-tetra-hydroxy (IUPAC, 1976), que concuerda con los valores calculados y que la esterificación con el ácido 3,4-dihidroxi-canámico debe ser en la posición 3. Con esto la parte del ácido quínico de s1, es el isómero ⁴C₁ y puede ser encontrado en el clorogénico.

La resonancia ¹³CNMR probó que esta estructura mostró los valores esperados para el ácido clorogénico, Los datos de ¹HNMR para s2 nos dan la estructura para una flavona por los protones aromáticos en 7.37, 7.35, 6.82 y 6.35 ppm (C-6'H, C-2'H, C-5'H, C-8H) y el proton olefénico C-3 en 6.55 ppm. El alto campo de acoplamiento de C-1'H (4.55 ppm) indica la C-glicosidación en C-6. Los datos de ¹H así como los de ¹³CNMR (en un rango de 2 ppm) concuerdan con los reportados para la isoorientina Kato, (1990) y Markham (1982).

Conclusiones

La metodología fitoquímica permitió el aislamiento de cuatro sustancias para Equiseto y dos para Cecropia, es interesante notar que en ambas plantas se encontraron flavonoides, si bien esto no indica que estas sustancias sean las responsables de la actividad de las plantas, posiblemente si contribuyan a ella. Remarcando que ambos flavonoides se encuentran en forma de glucósidos, lo cual les da polaridad y la solubilidad en agua.

En Equiseto las estructuras principales son derivadas del caempferol que es un flavonol, mientras que el ácido cafeico es probablemente, un producto de la descomposición de las estructuras anteriores, podemos decir que los principales componentes del extracto acuoso y butanólico de Equiseto son flavonoles derivados del caempferol.

Por su parte Cecropia presenta un solo componente que pudiera ser activo, la flavona isoorientina, ya que el ácido clorogénico está ampliamente distribuido en varias especies.

Al menos en tres especies se ha reportado la presencia conjunta de derivados del caempferol e isoorientina, pero ninguna de estas especies ha sido reportada como hipoglucemiante.

Farmacología

Con la finalidad de probar la acción de los extractos obtenidos en la metodología fitoquímica se utilizó un modelo animal experimental, este modelo se seleccionó sobre la base de la literatura internacional, tomando en cuenta los animales mas estudiados y el tipo de inducción de diabetes adecuado (véase modelos farmacológicos en la introducción).

Objetivo de la metodología farmacológica:

Objetivos específicos: Probar el efecto hipoglucemiante de los extractos acuoso y butanólico de *Equisetum myriochaetum*.

Probar el efecto hipoglucemiante de los extractos acuoso y del butanólico de *Cecropia obtusifolia*.

Metodología

Animales experimentales:

Se usaron ratas Wistar macho proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, los animales se recibieron de 6 semanas de edad con un peso de 280 ± 20 g.

Los animales se acondicionaron en cajas experimentales dentro de un cuarto especial con temperatura controlada a 25 grados C, un fotoperiodo de 14 horas de obscuridad por 10 horas de luz y humedad controlada, por siete días.

Durante todo el experimento se dejo a los animales con libre acceso a agua y alimento (Nutricubos para Roedores Pequeños, Ralston) excepto en los casos en que se indique lo contrario.

Transcurrido el periodo de adimatación se tomó el peso del animal y la glucosa en sangre, para la toma de los datos de glucosa los animales no fueron dejados en ayuno, excepto cuando se indique lo contrario. Todos los datos de bioterio fueron anotados en una bitácora especialmente para ello diseñada.

Medición de Glucosa:

Las mediciones de glucosa en sangre, durante todo el experimento, se realizaron tomando sangre venosa obtenida de la vena caudal de la cola de la rata, la obtención de la sangre se logró cortando únicamente la parte terminal de la cola, esto con el fin de no hacer sufrir a los animales.

Para la medición de la glucosa en sangre capilar se utilizó un glucómetro, Reflux S de Boehringer Mannheim y tiras reactivas HaemoglucoTest 20-800 R, la precisión del aparato fue confirmada mediante un Reflotron de la misma compañía, tiras reactivas especiales y suero control Precinorm U.

Inducción Experimental de Diabetes:

Después de las mediciones iniciales de glucosa y obtención del peso corporal, los animales se dejaron en un periodo de ayuno por 12 horas, con libre acceso a agua, transcurrido el ayuno se procedió a inyectar estreptozotocina (Streptozotocina Sigma S-0130) en forma intraperitoneal, a dosis de 50 mg por kg de peso corporal.

La sustancia se disolvió previamente en amortiguador de acetato, ajustando el pH a 4.5, una vez preparada la droga se dejó reposar en obscuridad por 2 horas a 5° C, para lograr la estabilización de los anómeros α y β de acuerdo a Nathan, (1963) y Povoski, (1993).

Después de la inyección, los animales se colocaron en sus jaulas y a las 48 horas (2 días) se les tomó el nivel de glucosa, aquellos animales con una lectura entre 260 mg/dl y 360 mg/dl, fueron seleccionados para continuar los experimentos.

Diseño Experimental

Las dosis de administración para los animales se calcularon de acuerdo a las dosis empleadas para las plantas en medicina tradicional, haciendo la proporción entre el peso del animal y un paciente de 60 kg, como se señala en la siguiente tabla:

	Peso G	Agua ml	Planta g	Droga gm	Gliben. mg.
Humano	60,000	500	60	1	3
Rata	300	2.5	0.3	0.005	0.015

El extracto acuoso se preparó en forma similar al té medicinal, la planta seca se extrajo mediante un aparato de Soxhlet y se liofilizó. Al momento de la aplicación al animal fue redisoluelto en solución fisiológica 0.9% para su administración.

La fracción butanólica obtenida según la metodología descrita en el capítulo 3 se disolvió en solución fisiológica 0.9% para su administración.

El grupo control recibió la misma cantidad de solución fisiológica, mientras que el grupo de glibenclamida recibió el fármaco disuelto en solución fisiológica.

Pruebas.

Los extractos se administraron por vía oral con la ayuda de una cánula, para ponerlos directamente en estómago.

Debido a que los animales devolvían la solución con el extracto butanólico, ésta se disolvió en solo 1.5 ml de solución fisiológica para facilitar la administración, el extracto acuoso fue aplicado en 2.5 ml de solución.

Las pruebas se corrieron de manera simultanea es decir el mismo día se corrían tanto controles como testigos, debido a las dificultades del experimento este se realizó en un periodo total de cinco meses. Todos los experimentos iniciaron siempre a las 10:15 ± 15 min.

Las pruebas se efectuaron midiendo el efecto agudo de los extractos, para lo cual se aplicó una sola dosis al tiempo cero, realizando la medición de glucosa y administrando en los 2 minutos siguientes el extracto, la glucosa fue medida a los 30, 60, 120 y 180 minutos después de la aplicación del extracto, al notar que no había variación entre los tiempos 30 y 60 min se decidió no tomar el tiempo 30 min, con el fin de ahorrar tiras reactivas. Durante los 180 minutos que duró cada experimento los animales no tuvieron acceso a agua ni alimento.

Con el fin de optimizar los animales empleados y dado que al inicio de los experimentos se presentaron problemas para la obtención de animales diabéticos, se formaron cuatro grupos experimentales de trece animales con diabetes inducida. Los grupos fueron utilizados en dos ocasiones, dejando un espacio de siete días entre cada prueba con el fin de que el extracto aplicado por vía oral fuera totalmente metabolizado (ver nota adelante).

Al primer grupo se le administró siete días después de la inyección de estreptozotocina el extracto butanólico de Equiseto y siete días después el extracto acuoso, lo mismo se realizó para el segundo grupo con el extracto de Cecropia.

Al grupo control se le administró solución fisiológica de igual forma que a los grupos experimentales a los 7 y 14 días, al grupo de glibenclamida se le administró la sustancia disuelta en solución fisiológica en los mismos periodos, es decir los grupos se utilizaron el día 7 después de la inyección y el día 14, aplicando siempre la misma planta o control al mismo grupo de animales de acuerdo a la siguiente tabla:

Grupo	Tratamiento	
	Día 7	Día 14
1	Eq. BuOH	Eq. Acuoso
2	Ce. BuOH	Ce. Acuoso
3	Glibenclamida	Glibenclamida
4	Sol. Fisiológica	Sol. Fisiológica

Nota: La diferencia de siete días entre una prueba y otra respecto al estado de diabetes se basa en las observaciones realizadas por Islas (Comunicado personal, 1999) el cual muestra gráficamente, que la liberación de insulina después de la inyección de estreptozotocina permanece casi sin variación entre los días 7 y 14, modificándose drásticamente después del día 21.

Para reforzar esto se compararon estadísticamente y por separado las medias de glucosa de las ratas control, de las que recibieron ambas plantas y las que recibieron glibenclamida al tiempo 0, después de 7 días y 14 días de inyectada la estreptozotocina. Debido a que al tiempo 0 no hubo una diferencia estadística en ninguno de los cuatro grupos, podemos decir que una diferencia de 7 días en ratas diabéticas no afecta significativamente los niveles de glucosa en sangre.

Por otro lado el dejar a los animales por un periodo de siete días sin droga alguna nos aseguro no tener residuos de la misma droga en el animal al momento de la siguiente prueba.

Estadística de prueba:

La estadística de prueba consistió en una prueba de hipótesis t de Student, se escogió esta prueba debido a que se compararon las medias de muestras pequeñas de población Bland, (1995), Daniel, (1979), y Goldstein, (1964).

Una vez tomados los grupos entre sí, es decir cada grupo contra su control se realizó una prueba de análisis variancia (ANEVA) por tratamiento, para detectar la variación total de los grupos Bland, (1995).

Se partió del supuesto de que la población esta normalmente distribuida y las variancias son desconocidas pero iguales, bajo las siguientes hipótesis:

$$H_0 : \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_A : \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

Mediante la prueba de t; se realizó la comparación de las medias de concentración de glucosa entre el grupo control (ratas 14 días) y las medias de los extractos acuosos de ambas plantas y glibenclamida, del mismo modo se compararon las medias del grupo control (ratas 7 días) con las de medias de extracto butanólico de ambas plantas y la glibenclamida.

También se empleo la misma estadística de prueba para comparar las diferencias entre las medias de glucosa al tiempo 0, entre ratas de siete y catorce días, para los cuatro grupos; control, Equiseto, Cecropia y glibenclamida.

Como apoyo a la estadística empleada prueba de t se uso la U de Mann-Whitney, esta prueba asume una estadística no paramétrica y es análoga a la prueba de t. Esta prueba estima la probabilidad de que una medida de la primera población sea inferior a una medida de la segunda población (*idem ant*).

Se uso la prueba de U para corroborar los valores obtenidos en la estadística de t bajo un supuesto en el que no se asume una distribución normal (no paramétrica), el resultado se reporta solo en caso de que el alfa difiera de la prueba de t, si no se asume que se obtuvo la misma alfa. La prueba de U se aplicó bajo la siguiente formula:

$$U' = n_1n_2 + (n_1(n_1+1)/2) -R$$

La corroboración de las diferencias entre los grupos se realizó por medio del mencionado análisis de variancia, y la prueba de Tuckey. Con el ANEVA se obtuvo el radio de variación F_{α} , para los grupos por tratamiento, es decir los cuatro grupos correspondientes al extracto acuoso se compararon entre sí y los del extracto butanólico entre sí, posteriormente se analizó la variación por tratamiento mediante la prueba de honestidad para diferencias significativas de Tuckey, para grupos desiguales.

Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con la metodología farmacológica, los datos se presentan en forma de dos tablas donde; El valor dado corresponde a las medias de las concentraciones de glucosa \pm el error estándar. Los datos se presentan por tiempo T0, T60, T120 y T180 donde el número equivale a los minutos transcurridos después de la administración del tratamiento. Los grupos corresponden a; Co control, Eq Equisetum, Ce Cecropia y Gb glibenclamida. El número de individuos usados en cada grupo se señala entre paréntesis al lado del grupo.

Los superíndices corresponden a los resultados obtenidos, p calculadas con la prueba de t , comparando el tratamiento contra el control por lo que las comparaciones son entre una misma columna (tiempo), la prueba coincide con los valores obtenidos con la prueba de U , por lo que el superíndice asignado coincide para ambas pruebas.

Los subíndices corresponden a los valores de p calculados con la prueba de ANEVA, utilizando la Prueba de honestidad de Tuckey, para grupos desiguales, indican la variación presente entre los grupos, la ausencia del subíndice indica que no hubo una variación significativa.

Medias de las concentraciones de glucosa para el extracto acuoso.

Grupo	T0	T60	T120	T180
Co (n=13)	314 \pm 6 _a	315 \pm 6 _a	333 \pm 9 _a	311 \pm 6 _a
Eq (n=11)	312 \pm 6 _a	292 \pm 9 ¹ _a	259 \pm 13 ² _b	250 \pm 13 ² _b
Ce (n=10)	304 \pm 10 _a	283 \pm 9 ¹ _b	283 \pm 8 ² _b	269 \pm 11 ² _b
Gb (n=8)	307 \pm 15 _a	299 \pm 11 _a	265 \pm 10 ² _b	257 \pm 10 ² _b

Superíndices (t), 1 entre $p = 0.05$ y $p = 0.01$, 2 entre $p < 0.01$ y $p = 0.001$.
Subíndices (Tuckey), Diferente letra dentro de la misma columna indica una diferencia significativa al menos con $p < 0.05$.

Medias de las concentraciones de glucosa para el extracto butanólico.

Grupo	T0	T60	T120	T180
Co (n=13)	323 ± 5 _a	326 ± 5 _a	312 ± 4 _a	317 ± 4 _a
Eq (n=11)	316 ± 7 _a	292 ± 5 ² _b	283 ± 9 ¹	256 ± 11 ² _b
Ce (n=10)	310 ± 7 _a	292 ± 8 ² _b	267 ± 7 ² _b	254 ± 17 ² _b
Gb (n=8)	315 ± 5 _a	293 ± 8 ² _b	272 ± 11 ² _b	242 ± 15 ² _b

Superíndices (t), 1 entre $p = 0.05$ y $p = 0.01$, 2 entre $p < 0.01$ y $p = 0.001$.
 Subíndices (Tuckey), Diferente letra dentro de la misma columna indica una diferencia significativa al menos con $p < 0.01$.

Como resultado de la metodología fitoquímica se logró aislar una pequeña cantidad de la sustancia s4 pura, ésta se usó para la determinación de la estructura del compuesto. La parte restante del compuesto fue administrada a 3 ratas de 7 días (ya que no se disponía de mayor cantidad de droga), si bien no puede realizarse una prueba estadística, debido al bajo número de animales y a que la prueba no formó parte del experimento general, se muestran a continuación los datos obtenidos ya que presentaron un efecto hipoglucemiante importante.

Tiempo Min.	0	60	120	180
Media ± ES	313 ± 4	281 ± 21	263 ± 30	225 ± 41
Diferencia de T0	0	32	50.4	87.7

Se presenta un resumen de los datos de manera gráfica, las gráficas comparan las medias de los extractos con las de los controles y las de glibenclamida, el objeto de las gráficas es el de apoyar a la estadística y el de proporcionar una idea visual del efecto hipoglucemiante de las plantas, las barras indican el error standard.

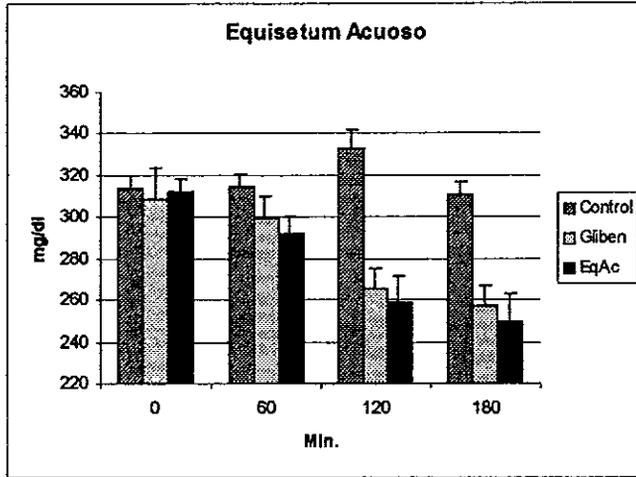


Figura 38, Comparación gráfica del efecto del extracto acuoso de Equisetum en comparación con el control y glibenclamida.

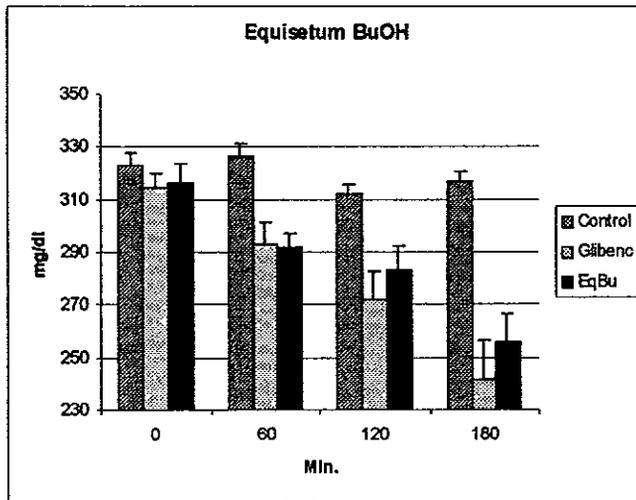


Figura 39, Comparación gráfica del efecto del extracto butanólico de Equisetum en comparación con el control y glibenclamida.

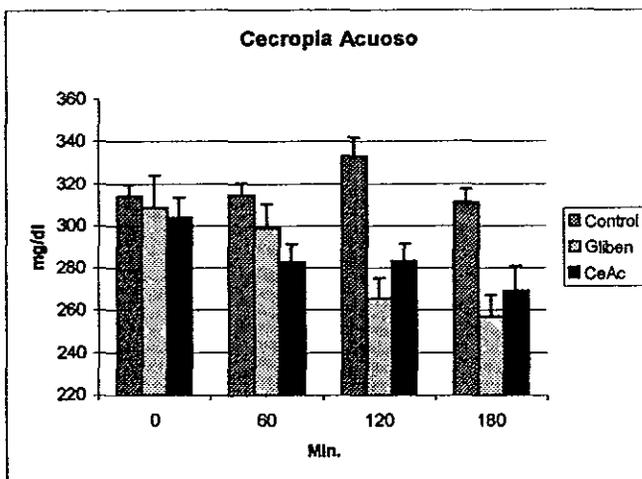


Figura 40, Comparación gráfica del efecto del extracto butanólico de Cecropia en comparación con el control y Glibenclamida.

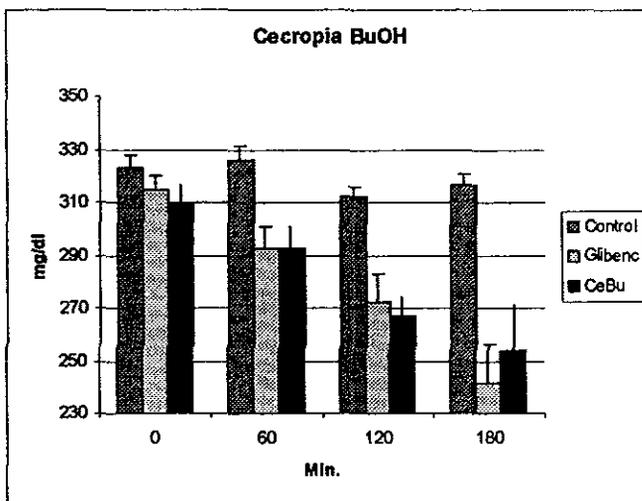


Figura 41, Comparación gráfica del efecto del extracto butanólico de Cecropia en comparación con el control y Glibenclamida.

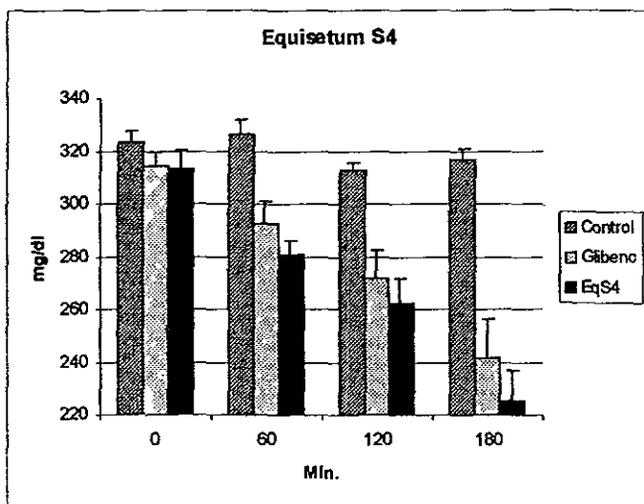


Figura 42, Gráfica del efecto de Equiseto s4 en comparación con el control y Glibenclámda.

Análisis de los Resultados

Como pudo comprobarse ambas plantas presentan un efecto hipoglucemiante significativo, lo que se observa en las gráficas presentadas (figuras 39 a 42).

Equisetum

En las pruebas realizadas con el extracto butanólico de Equiseto, observamos un efecto hipoglucemiante menor en el tiempo 120 (min) respecto a los otros tiempos, pero aun así significativo ($\alpha=0.05$), esto puede atribuirse a que el grupo control para este mismo tiempo presentó una disminución en las medias de 24 unidades respecto a la media del tiempo anterior, sin embargo el grupo tratado con glibenclámda presentó mayor nivel de significancia para el mismo tiempo ($\alpha=0.005$). Por otro lado en los tiempos 60 y 180 minutos la reducción en la concentración de glucosa fue altamente significativa. El α de las dos pruebas difiere ($t=0.001$ y $U=0.005$) ya que la estadística paramétrica resulta más significativa que la no paramétrica. Al comparar el grupo experimental con el grupo que recibió la glibenclámda, vemos que el efecto es similar en incluso el α es el mismo para el tiempo 180.

Las restas de las medias de los tiempos respecto a T0, muestran una reducción en el nivel de glucosa hasta de 62.4 mg/dl en T180 comparadas con los

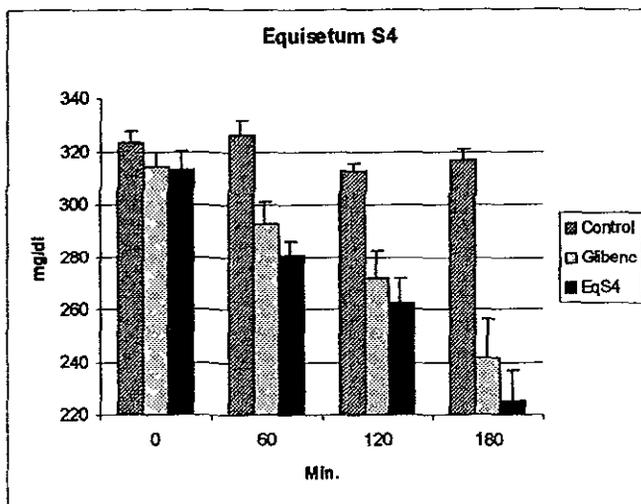


Figura 42, Gráfica del efecto de Equiseto s4 en comparación con el control y Glibencnamida.

Análisis de los Resultados

Como pudo comprobarse ambas plantas presentan un efecto hipoglucemiante significativo, lo que se observa en las gráficas presentadas (figuras 39 a 42).

Equisetum

En las pruebas realizadas con el extracto butanólico de Equiseto, observamos un efecto hipoglucemiante menor en el tiempo 120 (min) respecto a los otros tiempos, pero aun así significativo ($\alpha=0.05$), esto puede atribuirse a que el grupo control para este mismo tiempo presentó una disminución en las medias de 24 unidades respecto a la media del tiempo anterior, sin embargo el grupo tratado con glibencnamida presentó mayor nivel de significancia para el mismo tiempo ($\alpha=0.005$). Por otro lado en los tiempos 60 y 180 minutos la reducción en la concentración de glucosa fue altamente significativa. El α de las dos pruebas difiere ($t=0.001$ y $U=0.005$) ya que la estadística paramétrica resulta más significativa que la no paramétrica. Al comparar el grupo experimental con el grupo que recibió la glibencnamida, vemos que el efecto es similar en incluso el α es el mismo para el tiempo 180.

Las restas de las medias de los tiempos respecto a T0, muestran una reducción en el nivel de glucosa hasta de 62.4 mg/dl en T180 comparadas con los

6.7 mg/dl del control y los 73 mg/dl de la glibenclamida, aunado a esto tenemos que la curva de Equiseto se comporta de manera similar a la de la glibenclamida, por debajo del control (figura 39).

Con los resultados obtenidos y basados en la estadística de prueba se puede concluir: **El extracto butanólico de Equisetum reduce significativamente el nivel de glucosa sanguínea en las tres horas siguientes a su administración oral.**

La reducción de la concentración de glucosa producida por el extracto acuoso es significativa en los tres tiempos pero, la reducción se incrementa al transcurrir del tiempo, lo que podría indicar que después de una hora de administrado el extracto, éste ejerce mayor efecto, pero hay que tomar en cuenta que en este caso el grupo control a los 120 minutos incremento los niveles de glucosa en 16 puntos.

Por otro lado al comparar el grupo experimental con el grupo que recibió glibenclamida, se observa que el efecto hipoglucemiante es muy similar e igualmente significativo. El α de las dos estadísticas de prueba es en este caso igual para todos los tiempos.

Las restas de las medias nos dan la mayor diferencia en T180 de 62.4 mg/dl comparadas con el grupo control de 4 mg/dl y el grupo de glibenclamida 51.6 mg/dl. En la figura 38 observamos que la curva de Equiseto se encuentra incluso por debajo de la correspondiente al grupo de glibenclamida.

Con los datos aportados por la estadística de prueba podemos concluir que: **La administración oral del extracto acuoso de Equisetum redujo significativamente los niveles de glucosa sanguínea, esta reducción se incremento al paso de una hora.**

Cecropia

El extracto butanólico de Cecropia es altamente significativo desde la primera hora posterior a su administración oral, con un α de 0.005, y su acción es similar a la de la glibenclamida. El α de las dos estadísticas de prueba es el mismo para todos los casos.

Las restas de las medias de los tiempos respecto a T0, muestran una reducción en el nivel de glucosa hasta de 55.5 mg/dl comparadas con los 6.7 mg/dl del control y los 73 mg/dl de la glibenclamida. La figura 41 nos muestra que el comportamiento de la curva para Cecropia y glibenclamida es similar.

Basados en la estadística de prueba se puede concluir que: **El extracto butanólico de Cecropia administrado por vía oral produce una reducción significativa en los niveles de glucosa sanguínea desde la primera hora de su administración.**

Finalmente el extracto acuoso de *Cecropia* es también significativo para los tres tiempos estudiados, sin embargo en este caso para los primeros 60 minutos la estadística no paramétrica nos presenta mas significancia que la paramétrica. En este caso el efecto de la glibenclamida parece ser ligeramente mayor al del extracto en los tiempos T120 y T180 sin embargo los datos no muestran diferencia entre sí (la prueba estadística no se muestra).

Tomando en cuenta las restas obtenidas tenemos que *Cecropia* presenta la mayor diferencia en T180 con 34.5 mg/dl mientras que en el grupo control es de 4 mg/dl y en el grupo de glibenclamida 51.6 mg/dl. En la figura 40 se observa que la curva de *Cecropia* se comporta incluso de manera similar al grupo de glibenclamida.

Podemos concluir que: **La aplicación del extracto acuoso de *Cecropia* en la dosis empleada reduce los niveles de glucosa sanguínea de forma significativa desde la primera hora de su administración por vía oral.**

Controles

En los grupos control se observa que no hay diferencia estadística significativa en los niveles de glucosa que se mantiene igual en el transcurso del experimento (180 min).

Lo que nos permite concluir que; una diferencia de siete días en los animales diabéticos, ratas inyectadas según nuestra metodología, no es significativa por lo que se dispone de un espacio de tiempo para trabajar a los animales, lo cual es recomendable para reducir el número de animales empleados evitando posteriormente el sacrificio inútil de los mismos.

Análisis de variancia

Para corroborar lo obtenido en la comparación de los grupos individuales respecto al control se realizó el mencionado análisis, en el se analizan los cuatro grupos por extracto y tiempo.

Para el extracto acuoso se observa que al tiempo cero no hay variación entre los grupos, sin embargo a los tiempos 60, 120 y 180 min si se observa una variación. El tiempo 60 min nos da una p de 0.04 en el radio de la variancia, mientras que el grupo significativo es el de *Cecropia*, el cual difiere del control pero no de los otros grupos, en el tiempo 120 min la p es de 0.000009 y hay variación entre los tres grupos experimentales respecto al control, pero no entre ellos, finalmente al tiempo 180 sucede algo similar con una p de .003 y variación entre los grupos respecto al control pero no entre ellos.

Respecto al extracto butanólico se tiene que al igual que el extracto anterior al inicio los grupos no presentan variación entre sí, pero sí lo hacen a los tiempos 60, 120 y 180 min. Al tiempo 60 min, la p del radio de variación es de 0.002 y la

variación se da entre los tres grupos respecto al control y no entre ellos, al tiempo 120 la p es de .001 y en este caso equiseto no resulta significativo respecto al control, pero tampoco hay diferencia con los otros dos grupos, cabe resaltar que en este tiempo el grupo control mostró el nivel de glucosa mas bajo, finalmente al tiempo 180 la p fue de 0.001 y en este tiempo la variación se da entre los grupos respecto al control.

El análisis de estos resultados nos permite corroborar lo ya expuesto anteriormente: ambas plantas presentan un efecto hipoglucemiante significativo respecto al control. El efecto hipoglucemiante de Cecropia se inicia antes, en comparación a Equiseto y glibenclamida, de acuerdo a los resultados de t=60.

De igual forma nos permite afirmar que ambas plantas presentan una acción semejante a la de la glibenclamida.

Finalmente respecto al experimento realizado con la sustancia s4 (Caempferol 3-O- soforósido) esta muestra un claro efecto hipoglucemiante del compuesto figura 42, a esto podemos agregar que en el tiempo 180 presento la mayor reducción de la glucosa, incluso mayor que la glibenclamida.

Debido a que el experimento con s4 no se llevó a cabo con el mismo número de animales y a la par con respecto al resto del trabajo, se remarca el efecto hipoglucemiante de la sustancia y se deja en un futuro la posibilidad de estudiar cada compuesto por separado, con la posibilidad de que realmente ejerzan un efecto hipoglucemiante, según nos lo muestra la apreciación visual de la gráfica 42.

Cumpliendo con los objetivos específicos planteados, se establece el efecto hipoglucemiante de las plantas respecto al control y como se mencionó, su similitud de acción con la glibenclamida, no se realizan conjeturas comparando a mayor profundidad ambas plantas entre sí.

Discusión y Conclusiones

Discusión

Uso de estreptozotocina, como ha sido discutido por diversos autores (Boquist, 1992), la estreptozotocina aplicada en dosis no letales y subdiabetogénicas puede producir un componente autoinmune, estableciendo un tipo de diabetes similar al tipo 2 en humanos. En este estudio se observa que inyectando dosis de 50 mg/Kg de peso (200 mg/Kg = dosis letal), existe un efecto hipoglucemiante producido por la glibenclámda, debido a que la droga necesita para actuar de células β activas, se puede suponer que a la dosis empleada se produjo en los animales experimentales un tipo de diabetes similar al tipo 2 en humanos.

Plantas; En apoyo a la información etnobotánica obtenida en diversas fuentes directas, tanto *Equisetum myriochaetum* como *Cecropia obtusifolia* presentan un efecto hipoglucemiante importante.

Equisetum myriochaetum,

Los compuestos principales aislados de ambos extractos son glucósidos del caempferol, compuesto con previos reportes de actividad hipoglucemiante. Los compuestos pinoembrina y chrisina reportados por Camacho, 1992 no fueron encontrados en el presente estudio, la β -D-glucosa si fue encontrada unida al caempferol.

No hay antecedentes de estudios farmacológicos de la planta con relación a su actividad hipoglucemiante, en el presente trabajo la planta presenta efectos hipoglucemiantes tanto en el extracto acuoso como en el butanólico, la manera de actuar de los dos extractos es similar al efecto observado con glibenclámda.

Debido a que el comportamiento de los dos extractos, respecto a la reducción de la concentración de glucosa es similar, es probable que él o los compuestos activos se encuentren presentes en ambos extractos, destacando el importante efecto hipoglucemiante que ejerció s4.

Cecropia obtusifolia

El principal componente del extracto butanólico de esta planta es la flavona iso-orientina, ningún trabajo realizado para esta planta fue enfocado a aislar los componentes del extracto butanólico por lo que el reporte de la flavona es dado aquí por primera vez para esta planta.

Los extractos reducen de manera similar y significativa la concentración de glucosa, en este caso el extracto butanólico presenta un efecto mayor en la citada reducción en comparación a el extracto acuoso. Ambos extractos presentan también un comportamiento semejante al de la glibenclámda.

Apoyados en que el extracto butanólico de *Cecropia* presenta un mayor efecto hipoglucemiante, puede suponerse, que el o los compuestos activos se encuentran en citado el extracto.

En el modelo estudiado por Roman Ramos, 1991 en conejos hiperglicemicos, se reporta la mayor actividad del té medicinal a los 60 min, con una reducción del 18.9% ($p < 0.005$) en las medias de la concentración de glucosa, la actividad baja a los 120 y 180 min a una $p < 0.05$ y después de esto la planta no presenta actividad.

Este efecto ya observado y reportado en un modelo animal diferente del nuestro se corrobora en el presente trabajo, ya que los extractos presentan actividad a los 60 min, sin embargo en nuestro estudio la actividad se mantiene durante el transcurso del experimento, esto puede deberse a que los autores emplean 132 gm de planta en 1 litro de agua, lo cual no corresponde a la preparación tradicional, ya que el nivel final de planta que se aplicó es inferior al usado en medicina tradicional y en este estudio.

La intensidad del efecto de ambas plantas es parecida y se asemeja al de la glibenclamida. El efecto de estas plantas podría ser la estimulación de la célula β , posiblemente las moléculas de azúcar presentes en los flavonoides puedan estimular la secreción de insulina.

A pesar de la gran difusión en el uso de estas plantas, parece no haber un control exitoso de los pacientes, para entender que sucede con los compuestos en los extractos acuosos se realizó HPLC del extracto acuso (té) de Equiseto y *Cecropia* preparando el extracto y dejándolo en refrigeración, de manera similar al agua de uso. Según los cromatogramas obtenidos (datos no presentados) los glucosidos se separan de los flavonoides en dos días si el té esta en refrigeración, y en menos de 12 horas si el té esta a temperatura ambiente.

Esto podría ser una explicación del poco éxito de las plantas en el control de los pacientes, ya que la mayoría preparan un té que consumen durante el día, lo cual los lleva a consumir glucosa mas que el compuesto activo.

Conclusiones

Los principales constituyentes del extracto acuoso de *Equisetum myriochaetum*, son glucósidos del caempferol, los compuestos presentes en el extracto acuoso se encuentran también en el extracto butanólico. El té medicinal, equivalente en nuestro estudio al extracto acuoso, ejerce un efecto hipoglucemiante significativo, en el modelo animal empleado. Del mismo modo el extracto butanólico ejerce un efecto significativo.

Cecropia obtusifolia presenta como principal constituyente a la iso-orientina, la cual se encuentra tanto en el extracto acuoso como en el butanólico. El efecto del extracto acuoso equivalente al té medicinal es significativo en el modelo animal empleado, lo cual nos muestra el efecto hipoglucemiante atribuido a la planta.

Recomendaciones:

En estudios posteriores deberán aislarse los compuestos aquí reportados, deberán ser probados de manera individual en otros modelos de estudio incluyendo estudios clínicos.

Como se desprende del presente estudio, la medicina tradicional ha aportado dos plantas con efecto Hipoglucemiante real, las cuales pueden ser usadas por la población, se recomienda para ello el control médico.

A diferencia de la tradición, no se recomienda tomar el té preparado con antelación, sino que se recomienda tomarlo inmediatamente después de preparado, esto es con el fin de evitar que los azúcares pasen al agua por descomposición de los compuestos originales.

Se recomienda a los especialistas tradicionales y pacientes diabéticos el empleo de *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia*, en el control de diabetes tipo 2, los pacientes deben ser de diagnostico reciente y deben poder ser controlados con dieta y ejercicio, para lo cual la toma del té medicinal podría contribuir a mantener los niveles de glucemia adecuados.

Apéndice 1, Plantas Mexicanas Hipoglucemiantes.

De acuerdo a Andrade (1995), existen mas de 400 plantas reportadas en nuestro país para este fin, pero son muy pocas las especies con estudios integrales, a continuación se presentan las cuatro plantas que han jugado un papel preponderante en el tratamiento de la diabetes en nuestro país, podemos mencionar que a estas plantas hay que añadir *Cecropia obtusifolia*..

Para seleccionar estas plantas se tomo en cuenta que la planta tuviera uno o más estudios etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos. También se observó la amplia distribución en el uso de la planta, su "reputación" en diversos mercados de la república y que sea reconocida por diversos autores de la materia.

A continuación se presentan los principales datos para las mencionadas plantas:

Psacalim decompositum (Gray) Robbins & Brett.

Etnobotánica: El nombre común de la planta es "matarique" se conoce también como;" mataricue" o "matariqui".

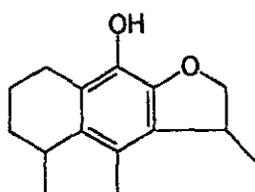
La planta se reporta para padecimientos reumáticos, diabetes, cólicos de riñón, contra resfrios y como purgativo (Argueta, 1996).

En el año 1986 (Bye, 1986) realizó un estudio en la sierra tarahumara comparando el uso de plantas en mercados urbanos y en la zona de estudio, de acuerdo a su reporte la raíz de la planta es usada tanto por los tarahumaras como por la población urbana en el tratamiento de dolores del cuerpo, reumatismo y desordenes gastrointestinales. Reporta que la población urbana toma el té como cura para la diabetes, pero entre los tarahumaras no existe la conceptualización de diabetes por lo que no reportan la planta para este uso.

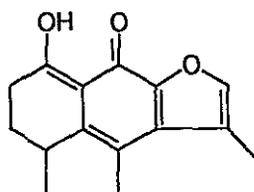
Uso: Raíz hervida en infusión como hipoglucemiante.

Fitoquímica: los siguientes compuestos se han aislado de la raíz de matarique:

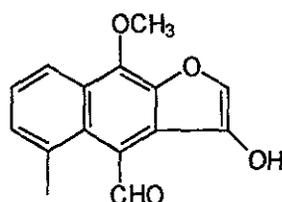
Sesquiterpenos; cacalol cacalona, maturina, maturinina, maturona, maturinona y dimaturona (Romo, 1985).



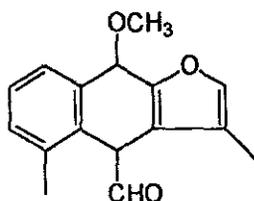
Cacalol



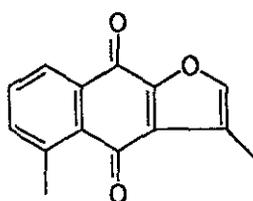
Cacalona



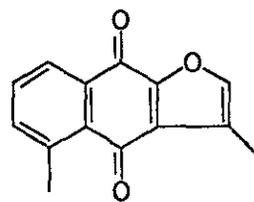
Maturina



Maturinina

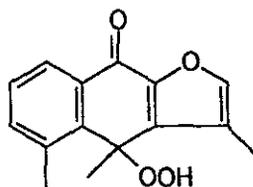


Maturona



Maturinona

Adicionalmente a estos compuestos Jiménez y cols. aislaron Hidroperoxicacalona (Jiménez, 1997):



Hidroperoxicacalona

En (Sullivan, 1980) se reporta la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en *Pscacium decompositum*, identifica siete alcaloides por cromatografía en placa delgada, pero no da las estructuras.

El grupo de (Alarcón, 1997) confirma para *P. decompositum* la presencia de cacalol, cacalona y maturina, reportan también la presencia de alcaloides pirrolizidínicos y aunado a esto detectan que el componente mayoritario en el extracto acuoso el cacalol.

Farmacología: En (Pérez, 1984) se reporta que después de la administración de la planta (no especifican dosis) se observó una reducción de la glucosa sanguínea de 189.3 a 90 mg/ml, comparada con la de tolbutamida que redujo la glucemia a 90.3 gm/ml, por lo que concluye que el efecto de la planta es similar al de la tolbutamida.

En (Román Ramos, 1991) se reporta un estudio para *Psacalium peltatum*, se administró una dosis de 4ml/kg de la planta a conejos con carga subcutánea de glucosa en dosis de 2g/kg. Los autores reportan una disminución en la glucosa sanguínea significativa en los tiempos 60, 120 y 180 min, la planta bajo la glucosa sanguínea en un 29% respecto al control.

Alarcón y cols. (Alarcón, 1997), trabajaron con tres plantas de la familia asteraceae, realizaron pruebas con ratones en estado de ayuno y conejos con hiperglicemia temporal, en ambos casos se administro de forma intraperitoneal una decoción de la raíz a dosis de 4ml/kg para *Psacalium decompositum* reportan una reducción de la glicemia, significativa para los tiempos 120 y 240 min. En la prueba con conejos hiperglucemicos reportan mayor significación en la prueba a los 60 y 120 min, pero observaron efecto hasta los 240 min.

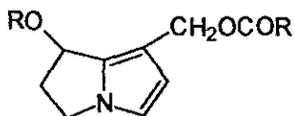
Los autores concluyen que la acción de la planta depende de la presencia de insulina, sin embargo no reportan datos sobre las concentraciones de la misma.

Conclusión: El extracto acuoso (Té) de la raíz de *Psacalium decompositum* conocido por su actividad como hipoglucemiante, se ha reportado la presencia de sesquiterpenos y alcaloides pirrolizidínicos identificando al cacalol como el principal constituyente del té, las pruebas con animales de laboratorio demuestran claramente el efecto hipoglucemiante de la planta asociado a la presencia de insulina.

Toxicidad: los alcaloides pirrolizidínicos son reportados como hepatotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos [26].

La toxicidad se reportó primero en el ganado y después en algunos grupos sociales como en Jamaica donde se consumen infusiones de plantas con estos compuestos (senecios). La intoxicación puede ser rápida originando una muerte por lesiones de todos los órganos vitales o puede haber intoxicación crónica cuya evolución es lenta, causando necrosis hepática (Mann, 1987).

La toxicidad de los alcaloides se ha atribuido a esteres pirrólicos del tipo:



Los cuales son agentes alquilantes muy potentes (Bruneton, 1995), estos ésteres son producto del metabolismo de los alcaloides pirrolizidínicos en el hígado de los mamíferos. Las transformaciones se producen al nivel de los microsomas hepáticos, las estructuras pirrónicas actúan como agentes alquilantes por lo que presentan afinidad por los ácidos nucleicos.

Un gran número de alcaloides pirrolizidínicos es capaz de inducir la formación de tumores en hígado (Mann, 1987).

Los agentes alquilantes son sumamente reactivos y adicionan un grupo (etilo o metilo) en varias posiciones del DNA, alterando la propiedad de apareamiento de las bases involucradas. Los agentes reaccionan con el átomo más nucleofílico (N7 de la guanina y N3 de la adenina). Un ejemplo de agente alquilante de uso en estudios genéticos es la N-nitrosodimetilamina.

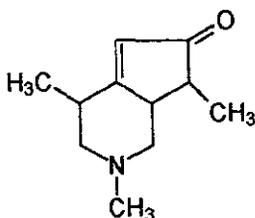
Al finalizar el trabajo se encontró que de esta planta ya existe una patente en los Estados Unidos e Internacional sobre los sesquiterpenos con actividad hipoglucemiante y es propiedad de Shaman Pharmaceuticals, en USA 5,747,527, internacional WO 96/39401.

Tecoma stans (L.) Juss ex Kunth

La "tronadora", como es conocida esta planta en el ámbito popular, goza de una gran tradición entre la población mexicana como hipoglucemiante. En la recopilación de (Argueta 1996) se cita que la tronadora es usada fundamentalmente para diabetes en forma de infusión pero también se reporta para padecimientos del sistema digestivo como; disentería, bilis, gastritis y mala digestión. Las partes útiles de la planta son el tallo y las hojas. Cabe destacar que hay menciones del uso de la planta desde el siglo XVI, donde se señala su uso para enfermedades de los riñones y la vejiga (¿).

Uso: tallo y hojas de la planta en infusión como hipoglucemiante.

Fitoquímica: Los siguientes compuestos han sido aislados de las hojas y tallos *Tecoma stans*: alcaloides monoterpénicos; actidina, boschniakina, tecomanina, tecostatina y tecostidina otros alcaloides como; eskatol y triptamina. Los monoterpénos, acubina, stancede y stansiocido.



Tecomanina

Farmacología: El estudio de la planta se inicia a fines del siglo pasado por el Instituto Médico Nacional, se administro el extracto de la planta a conejos y ratas sin observar resultados positivos [34]. En (Hammouda, 1966) se demostró que los alcaloides tecostanina y tecomaina administrados por vía intravenosa producen un marcado efecto hipoglucemiante en conejos normales.

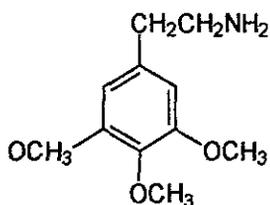
En 1985 (Lozoya, 1985) inicia un estudio de la planta en perros sanos a los que se les administra una dosis de 1ml del extracto acuoso por kg de peso corporal, los autores observan un incremento inicial de la glucosa sanguínea a los 60 min, junto con una hipersecreción de insulina, los niveles vuelven al estado basal de 120 a 180 min, presentándose hipoglucemia a los 180 min. Los autores atribuyen este efecto al metabolismo hepático de la glucosa, fundamentalmente a la activación de la glucogenólisis.

La tronadora es una planta con marcada acción hipoglucemiante en la que hacen falta sobre todo estudios de toxicidad, para validar su efecto.

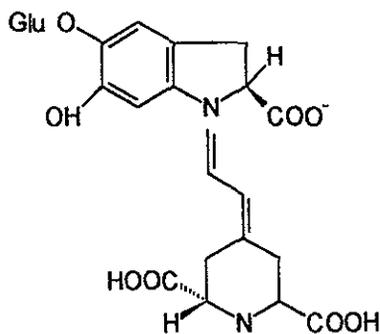
Opuntia streptacantha Lemaire y *Opuntia* spp.

El "nopal" nombre popular de esta planta, era usado por los antiguos mexicanos, es mencionado en el código Florentino y en la obra de F. Hernández; para apagar la sed y humedecer las entrañas secas. En la actualidad el uso popular es para la diabetes y para padecimientos digestivos (Argueta, 1996), [21].

Fitoquímica: Se ha aislado del tallo del nopal el alcaloide indólico betanina, los alcaloides mecalina y tiramina además de indicaxantina, opuntiaxantina. En el peciolo se han aislado los flavonoides campferol, luteolín, quercitina y rutina [12, [21], [31].



Mescalina



Betanina

Farmacología: en una serie de estudios con pacientes sanos y diabéticos tipo 2, el grupo de (Frati-Munari, 1988, 1989) llega a las siguientes conclusiones:

- a) El nopal produce un efecto hipoglucemiante a una dosis máxima de 500 gr, durante las siguientes seis horas de su ingestión, la hipoglucemia es paulatina y deja de observarse a las 6 hrs.
- b) El nopal tiene un efecto hipoglucemiante, pero éste se debe a que actúa como fibra dietética.

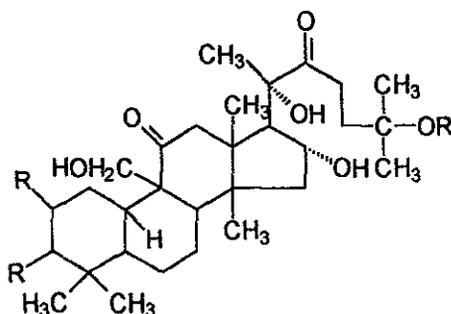
Otro estudio [39] reveló que el extracto acuoso de la planta presenta actividad antiviral importante contra el herpes simple y herpes en equinos, los autores administraron el extracto a cepas de ratón, caballos y humanos no encontrando toxicidad y si un efecto antiviral, el cual atribuyen a proteínas que se encuentran en las paredes celulares de la planta.

Debido a las diversas interpretaciones del posible efecto del nopal sería de suma importancia el evaluar farmacológicamente la toxicidad de la planta, así como llevar a cabo investigaciones fitoquímicas mas profundas, para validar totalmente el efecto y descartar posibles efectos tóxicos.

Hintonia latiflora (Sessé & Mocc. ex DC.) Bullock.

El "Copalquin" o "Cáscara sagrada", era también utilizado por los antiguos mexicanos principalmente como diurético, en la actualidad la corteza tiene varios usos entre los que destacan, tratamiento de la bilis y purgaciones sexuales, en varias regiones de la república se recomienda para la diabetes [37].

Fitoquímica: de la corteza de la planta se ha aislado la cumarina, 5-beta-galactoil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-cumarina, con tres derivados y el triterpeno: 3-beta-glucosil-23,24-dihidroxi-cucurbitacina [40], los compuestos han sido aislados principalmente por el grupo de Mata [41], [42].



Cucurbitacina
92

Farmacología: (Pérez, 1984) administró extractos acuosos de la planta de forma oral e intraperitoneal a ratones diabéticos por medio de aloxan, los autores observaron que la administración oral produce un 80% de hipoglucemia respecto al control, mientras que la intraperitoneal produce un 86% de hipoglucemia respecto al control, a las cinco horas.

No se han realizado otro tipo de estudios respecto a la actividad hipoglucemiante de la planta, por lo que sería de sumo interés el estudio de la misma.

Bibliografía

1. Agrawal, P.K. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3307
2. Aguilar A. ed. 1994. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México, IMSS.* 253 p.
3. Ahmad d y R. Skinner. 1996. Antiviral properties of an extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Res.* **30**, 75-85.
4. Alarcón Aguilar, R. Román Ramos, M. Jiménez, R. Reyes-Chilpa, B. González y J. L. Flores. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Journal of Ethnopharmacology.* **55**, 171-177.
5. Alder V. D. Yi Yu, E. Su y J. Cringle. 1992. Comparison of hematologic parameters in Normal and Streptozotocin induced Diabetic Rats. *Laboratory Animal Science.* **42** (2), 170-173.
6. Andrade Cetto A. 1996. Estudio etnobotánico y fitoquímico de plantas útiles en la región de Xochipala Gro. Para el control de la diabetes tipo NID. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias UNAM. 93 p.
7. Andrade Cetto A., Wiedenfeld H. y M. C. Pérez Amador B. Constituents of *Equisetum Myriochaetum* Schlecht & Cham. Enviado para publicación a BSE.
8. Argueta A. ed. 1996. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Instituto nacional Indigenista, México.* Tomo I, 583 p.
9. Argueta A. ed. 1996. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Instituto nacional Indigenista, México.* Tomo II, 1193 p.
10. Argueta A. ed. 1996. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Instituto nacional Indigenista, México.* Tomo III, 1786 p.
11. Atta Ur. 1989. Medical Plants with Hypoglycaemic Activity. *Journal of Ethnopharmacology.* **26**, 1-55.
12. Bonner W., D. Trent, R. Honey y G. Weir. 1981. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. *Diabetes* **30**, 64-69.
13. Boquist, L. 1993. Aspects of the diabetogenicity of alloxan and streptozotocin. **En:** Shafrin E. ed. *Lessons from animal diabetes IV.* Smith Gordon USA 3-27 p..
14. Bruneton J. 1986. *Elementos de fitoquímica y farmacognosia.* Acribia España, 393-395 p.

15. Bruneton J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Paris, 915 p.
16. Budzianowski, J. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3643-3647
17. Bye R. 1986. Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany* **40** (1), 103-124 p.
18. Camacho, M. R. D. Chavez, R. Mata y M. Palacios Ríos. 1992. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XXII. Constituents of *Equisetum myriochaetum*. *Fitoterapia* **63** (5), 471-472.
19. Chattopadhyay, R.R., Sarkar, S.K., Ganguly, S., Banerjee, R.N., and Basu, T.K. 1991. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of leaves of *Vinca rosea* linn. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **35**, 145-151.
20. Eizirk, D., G. Pippelers, L. Zhidong, L. Welsh, y C. Hellerstrom. 1994. Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic b-cell injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 9253-9256 p.
21. Elias D., H. Prigozin, N. Polak, M. Rapoport, A. Lohse y R. Cohen. 1994. Autoimmune Diabetes induced by the β Cell Toxin STZ. *Diabetes* **43**, 992-998 p.
22. Frati, Munari A. C., L. M. Del Valle Martínez, C. R. Aralsa, S. Islas Andrade y A. Chavez. 1989. Acción hipoglucemiante de diferentes dosis de nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) en pacientes con diabetes mellitus tipo II. *Arch. Invest. Med. (Méx).* **20**, 197-201.
23. Frati, Munari A., J. L. Quiroz, P. Altamirano, M. Bañales, S. Islas y R. Ariza. 1988. Efecto de diferentes dosis de nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) en la prueba de tolerancia a la glucosa en individuos sanos. *Arch. Invest. Med.* **19**, 143.
24. Gauthier, R., Goural, M., and Bellakhdar, J. The essential oil of *Myrtus communis* L. var. *italica* harvested in Morocco. I. Yields and composition during an annual vegetative cycle. *Biruniya (1988)* 4:97-116 CODEN: BIRUEE; 1995.
25. Hammouda Y., y M. Amer. 1966. Antidiabetic effect of Tecomline and Tecostanine. *Journal of Pharmaceutil Science.* **55**, 1452-1454.
26. Heinrich Michael. 1999. *Ethnopharmakologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, en prensa.
27. Hernández, Xolocotzi E. 1976. El concepto de etnobotánica en: Barrera A. ed. 1983. *La etnobotánica tres puntos de vista y una perspectiva.* INIREB. Jalapa, Ver México. 13-18 p.
28. Hikino, H. and Mizuno, T. 1989. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* **55**, 385.

29. Hikino, H., Konno, C., Takahashi, M., Murakami, M., Kato, Y., Karikura, M., and Hayashi, T. Isolation and hypoglycemic activity of dioscorans A, B, C, D, E, and F; glycans of *Dioscorea japonica* rhizophors. *Planta Med.* 168-171, 1986.
30. Hikino, H., Takahashi, M., Otake, K., and Konno, C. Isolation and hypoglycemic activity of eleutherans A, B, C, D, E, F, and G: glycans of *Eleutherococcus senticosus* roots. *J.Nat.Prod.* **49**, 293-297, 1986.
31. Holmsted, B. 1991. Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacology*, **32**(1): 7-24.
32. Imperato, F. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3374-3375
33. IMSS, 1998. Instituto Mexicano del Seguro Social, página de red: <http://www.imss.gob.mx/>
34. Islas S. Y Miranda P. 1993 Diabetes Mellitus Concepto y Clasificación. **En:** Diabetes Mellitus. 1993. Islas S. y A. Lifshitz ed. Interamericana México. 303-328 p.
35. IUPAC: Nomenclature of Cyclitols, *Biochem. J.*, 1976, **153**, 23
36. J. Mann. 1987. *Secondary metabolism*. Oxford Scientific Publications Great Britain. 374 p.
37. Jiménez E., A. Navarro, E. Villanueva, B. Paredes, R. Reyes-Chilpa, R. Román Ramos y F. Alarcón. 1997. Hydroperoxycacalone: A new furanoeremophilane from *Psacalium decompositum*. *Planta med.* **63**, 387-388.
38. Kato, T., Morita, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, **38**, 2277
39. Lifshitz G. A. y S. Islas. 1993 Patogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes tipo II. **En:** Diabetes Mellitus. 1993. Islas S. y A. Lifshitz ed. Interamericana México. 303-328 p.
40. Lozoya M. Y V. Mellado. 1985. Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy. *Journal of Ethnopharmacology*. **14**, 1-9.
41. Luo, J., Fort, D.M., Carlson, T.J., Noamesi, B.K., nii Amon Kotei, D., King, S.R., Tsai, J., Quan, J., Hobensack, C., Lapresca, P., Waldeck, N., Mendez, C.D., Jolad, S.D., Bierer, D.E., and Reaven, G.M. *Cryptolepis sanguinolenta*: an ethnobotanical approach to drug discovery and the isolation of a potentially useful new antihyperglycaemic agent. *Diabet.Med.* **15**(5): 367-374, 1998.
42. Mabberly. J. D. 1990 *The Plant Book*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
43. Mann J. *Secondary metabolism*. 1987. Oxford Chemistry series New York. 207 p.
44. Marble Alexander. 1971. Current concepts of diabetes. **En:** Marble A. de Diabetes Mellitus. Lea and Fieger. Philadelphia USA. 1-9p.

45. Markham, K.R., Chari, V.M. and Mabry, T.J. (1982) in *The Flavonoids: Advances in Research*, Harborne, J.B. and Mabry, T.J. (Eds.), pp. 48,74, Chapman & Hall, London
46. Mata, R., Camacho, M.d., Cervera, E., Bye, y Linares, E. 1990. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. Part XI. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**, 2037-40.
47. Méndez J. Y Ramos H. 1994. Animal models in Diabetes Research. *Archives of Medical Research*. **25**(4) 367-375 p.
48. Méndez J. Y Ramos H. Modelos Experimentales. **En: Diabetes Mellius**. 1993. Islas S. y A. Lifshitz ed. Interamericana México. 303-328 p.
49. Nathan R., L. Morris y V. Moreshwar. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy reports*. **29**, 91-98.
50. NIDDKD, 1998. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. **En: Instituto Nacional de diabetes enfermedades digestivas y renales**, página de red: <http://www.niddk.nih.gov/Diabetes>.
51. Noble, R.L. 1990. The discovery of the vinca alkaloids - chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem.Cell Biol.* **68**,1344-51.
52. Nobuyuki T., T. Komiya, T. Asawa, Y. Nagasawa, y T. Yamada. 1991. Streptozocin and Alloxan induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in Pancreatic Islets. *Diabetes* **40**, 1141-45.
53. Pérez G., A. Ocegueda, J. L. Muñoz, J. Avila, y W. Morrow. 1984. A study of the hypoglycemic effect of some mexican plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **12**, 253-262.
54. Povoski S. J. Mc Cullough, W. Zhou y R. Bell. 1993. Induction of Diabetes Mellitus in syrian golden hamster using stored equilibrium solutions of streptozotocin. 1993. *Laboratory Animal Science*. **43**(4) 310-314.
55. Raman, A. and Lau, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine* **2**(4): 349-362, 1996.
56. Reguero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E., y Delgado, G. 1987. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. Part II: cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. *J.Nat.Prod.* **50**, 315-16.
57. Ritter, G., Hagenauer-Hener, U., Dietrich,H., Dtsch. Lebensm.-Rundsch., 1994, **90**, 175.
58. Román Ramos R., J. Flores, G. Partida, A. Lara y F. Alarcón.1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* **22** (1) 87-93.

59. Romo de Vivar A. 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa México. 220 p.
60. Sauvaire, Y., Petit, P., Broca, C., Manteghetti, M., Baissac, Y., Fernandez Alvarez, J., Gross, R., Roye, M., Leconte, A., Gomis, R., and Ribes, G. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes*. **47**(2): 206-210, 1998.
61. Soto C., P. Muriel y J. L. Reyes. 1994. Pancreatic lipid peroxidation in Alloxan induced diabetes mellitus. *Archives of Medical Research*. **25** (3) 377-380.
62. SSA, 1998. Secretaria de salud, pagina de Red: <http://cenids.ssa.gob.mx/>.
63. Stary Z. 1990. Poisonous plants. Magna Books Prague. 98 p.
64. Stecher Paul. ed. The Merck Index. 1976. Merck & Co., Inc. Rahway N. J. USA. 1714 p.
65. Sullivan G. 1981. Detection of Pyrrolizidine type alkaloids en Matarique (Cacalia decomposita). *Vet Hum Toxicol* **23** (1) 445-446 p.
66. Tashmukhamedova, M.A., Mukhina, O.A., Syrov, V.N., Khushbaktova, Z.A., Katkova, S.P., and Kosovskij, M.I. Hypoglycemic activity of bicyclic diterpenoids of the clerodane series as compared to adefit and maninil]. *Probl.Endokrinol.Mosk.* **38**,48-50, 1992.
67. Trejo G. M. 1983. Estudio fitoquímico del Guarumbo (cecropia obtusifolia) como agente hipoglucemiante. Tesis de Licenciatura, ENCB, IPN. 55 p.
68. Who, 1998. World Diabetes. A newsletter from the World Health Organization. En: Organización Mundial de la Salud página de Red: http://www.who.ch/ncd/dia/ni_no3.htm.
69. Yoshikawa, M., Harada, E., Murakami, T., Matsuda, H., Wariishi, N., Yamahara, J., Murakami, N., and Kitagawa, I. Escins-Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa, bioactive triterpene oligoglycosides from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.: their inhibitory effects on ethanol absorption and hypoglycemic activity on glucose tolerance test. *Chem.Pharm.Bull.Tokyo*. **42**, 1357-1359, 1994.
70. Yoshikawa, M., Shimada, H., Nishida, N., Li, Y., Toguchida, I., Yamahara, J., and Matsuda, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. *Chem.Pharm.Bull.Tokyo*. **46**(1): 113-119, 1998.