



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto hipoglucemiante agudo de *Eryngium longifolium*  
Cav. en ratas hiperglucémicas STZ-NA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

Grisel Jeanette Pérez Martignon



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. Adolfo Andrade Cetto  
2016

Cd.Mx.



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.

DATOS DEL ALUMNO

Pérez  
Martignon  
Grisel Jeanette  
56 60 94 82  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307206642

Datos del tutor

Dr.  
Adolfo  
Andrade  
Cetto

Datos del sinodal 1

Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

Datos del sinodal 2

Dr.  
Sol  
Cristians  
Niizawa

Datos del sinodal 3

M. en C.  
Jazmín Selene  
Samarío  
Roman

Datos del sinodal 4

Biól.  
Christian Alan  
Cabello  
Hernández

Datos del trabajo escrito

Efecto hipoglucemiante agudo de *Eryngium longifolium* Cav. en ratas hiperglucémicas STZ-NA  
60p  
2016

Cuando propuse la teoría de la relatividad, muy pocos me entendieron, y lo que te revelaré ahora para que lo transmitas a la humanidad también chocará con la incomprensión y los perjuicios del mundo. Te pido aun así, que la custodies todo el tiempo que sea necesario, años, décadas, hasta que la sociedad haya avanzado lo suficiente para acoger lo que te explico a continuación. Hay una fuerza extremadamente poderosa para la que hasta ahora la ciencia no ha encontrado una explicación formal. Es una fuerza que incluye y gobierna a todas las otras, y que incluso está detrás de cualquier fenómeno que opera en el universo y aún no ha sido identificado por nosotros. Esta fuerza universal es el amor. Cuando los científicos buscaban una teoría unificada del universo olvidaron la más invisible y poderosa de las fuerzas. El Amor es Luz, dado que ilumina a quien lo da y lo recibe. El Amor es gravedad, porque hace que unas personas se sientan atraídas por otras. El Amor es potencia, porque multiplica lo mejor que tenemos, y permite que la humanidad no se extinga en su ciego egoísmo. El amor revela y desvela. Por amor se vive y se muere. El Amor es Dios, y Dios es Amor. Esta fuerza lo explica todo y da sentido en mayúsculas a la vida. Ésta es la variable que hemos obviado durante demasiado tiempo, tal vez porque el amor nos da miedo, ya que es la única energía del universo que el ser humano no ha aprendido a manejar a su antojo. Para dar visibilidad al amor, he hecho una simple sustitución en mi ecuación más célebre. Si en lugar de  $E=mc^2$  aceptamos que la energía para sanar el mundo puede obtenerse a través del amor multiplicado por la velocidad de la luz al cuadrado, llegaremos a la conclusión de que el amor es la fuerza más poderosa que existe, porque no tiene límites. Tras el fracaso de la humanidad en el uso y control de las otras fuerzas del universo, que se han vuelto contra nosotros, es urgente que nos alimentemos de otra clase de energía. Si queremos que nuestra especie sobreviva, si nos proponemos encontrar un sentido a la vida, si queremos salvar el mundo y cada ser sintiente que en él habita, el amor es la única y la última respuesta. Quizás aún no estemos preparados para fabricar una bomba de amor, un artefacto lo bastante potente para destruir todo el odio, el egoísmo y la avaricia que asolan el planeta. Sin embargo, cada individuo lleva en su interior un pequeño pero poderoso generador de amor cuya energía espera ser liberada. Cuando aprendamos a dar y recibir esta energía universal, querida Lieserl, comprobaremos que el amor todo lo vence, todo lo trasciende y todo lo puede, porque el amor es la quinta esencia de la vida. Lamento profundamente no haberte sabido expresar lo que alberga mi corazón, que ha latido silenciosamente por ti toda mi vida. Tal vez sea demasiado tarde para pedir perdón, pero como el tiempo es relativo, necesito decirte que te quiero y que gracias a ti he llegado a la última respuesta.

**Tu padre, Albert Einstein**

### **Agradecimientos académicos**

A la Facultad de Ciencias, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la DGDC que me permitieron fortalecer mi formación académica, ampliar mi panorama científico y acércame al mundo de la divulgación.

Al proyecto DGAPA, PAPIIT IN228216 cuyo apoyo permitió el desarrollo de este proyecto.

Al proyecto DGAPA, PAPIIT IN214413, por la beca de licenciatura que apoyo el proyecto de investigación.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, a quien agradezco su tiempo y paciencia dedicados a este trabajo de investigación, así como las grandes enseñanzas que me impulsaron y motivaron a seguir en el vasto camino de la ciencia y que me ayudaron a crecer como persona, gracias por su amistad.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez y al Dr. Sol Cristians Niizawa por sus valiosas sugerencias y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la M. en C. Jazmín Selene Samario Román y al Biól. Christian Alan Cabello Hernández, por enriquecer mis conocimientos durante mi estancia en el laboratorio y por las aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Sonia Escandón por el tiempo, apoyo y sugerencias que permitieron la realización de este proyecto.

A la Biól. Isabel Mejía y a la M. en C. Ana Soto quienes guiaron mis primeros pasos por el laboratorio.

## **Agradecimientos personales**

A mi mamá por caminar a mi lado con sus consejos llenos de sabiduría y por hacer mis pasos más ligeros, a ella que con sus manos cálidas, nobles, sinceras y limpias lo cura todo.

A mi papá por fortalecerme y acercarme al mundo de la ciencia despertando mi curiosidad.

A mis abuelos quienes me criaron con inconmensurable amor como a una hija y dejan una huella importante en mí.

A mis tíos quienes a pesar de las adversidades siempre me procuraron.

A mis primos que son fuente de amor y enseñanzas, a mi “yo pequeña” que cada día me demuestra un nuevo significado de la palabra compasión y me enseña que el amor lo cura todo y a mi “hermano” quien me ha enseñado que los sueños son tangibles y me recuerda que lo importante es ser feliz.

A mis amigos que han estado en las excelentes, las buenas, las regulares y las peores y a quienes espero siempre con los brazos abiertos.

A mis compañeros del laboratorio por esclarecer mis dudas, plantearme nuevas y por el apoyo académico.

Por las infinitas lecciones de vida, las largas hora de charla, el cariño y tiempo compartidos conmigo en este viaje incansable, gracias, gracias por tomar mi mano y tocar mi corazón.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	VI
Índice de Figuras.....	VI
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Diabetes mellitus.....	4
2.2 Diagnostico y clasificación de la diabetes .....	5
2.2.1 Diagnostico .....	5
2.2.2 Clasificación.....	6
2.3 Diabetes mellitus tipo 2 .....	7
2.3.1 Prevalencia .....	7
2.3.2 Definición .....	7
2.3.3 Resistencia a la insulina .....	8
2.4 Tratamiento para DM2 .....	9
2.4.1 Hipoglucemiantes orales .....	10
2.4.2 Sulfonilureas.....	10
2.5 Modelo STZ-NA .....	12
2.6 Medicina tradicional y complementaria .....	14
2.7 Plantas hipoglucemiantes.....	17
2.8 Etnofarmacología .....	18
2.10 Fitoquímica .....	21
2.11 Cromatografía en capa fina .....	24
2.12 <i>Eryngium longifolium</i> Cav.....	25
2.12.1 Clasificación taxonómica de <i>E. longifolium</i> Cav.....	25
2.12.2 Sinónimos de <i>E. longifolium</i> Cav.....	26
2.12.3 Distribución del género <i>Eryngium</i> .....	26
2.12.4 Descripción del género <i>Eryngium</i> .....	27
2.12.5 Usos y fitoquímica de <i>Eryngium</i> .....	28
3. JUSTIFICACIÓN .....	29
4. OBJETIVOS.....	29

4.1 Objetivo general .....	29
4.2 Objetivos particulares .....	29
5. HIPOTESIS .....	30
6. MÉTODO .....	31
6.1 Colecta de <i>Eryngium longifolium Cav.</i> .....	31
6.2 Elaboración de extractos de <i>Eryngium longifolium Cav.</i> .....	32
6.2.1 Extracto acuoso .....	32
6.2.2 Extracto etanol-agua .....	32
6.3 Cálculo DER .....	32
6.4 Dosis del extracto de <i>Eryngium longifolium Cav.</i> .....	33
6.5 Dosis de glibenclamida .....	33
6.6 Animales experimentales .....	33
6.7 Inducción de hiperglucemia moderada por STZ-NA. ....	34
6.8 Medición de glucosa .....	35
6.9 Diseño experimental .....	36
6.10 Análisis estadístico .....	37
6.11 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina .....	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
7.1 Cálculo DER .....	38
7.2 Pruebas farmacológicas .....	39
7.3 Pruebas fitoquímicas .....	43
8. CONCLUSIONES .....	50
9. PERSPECTIVAS .....	50
10. Literatura citada .....	51



## Índice de Figuras

Figura.1 Síntomas de la diabetes mellitus

Figura.2 Resistencia a la insulina en adipocito, hígado y músculo

Figura.3 Mecanismo de acción de las SU

Figura.4 A) Estructura química de la STZ B) Estructura química de la NA

Figura.5 Distribución de *E. longifolium* Cav.

Figura.6 Foto de ejemplar de Herbario de *E. longifolium* Cav.

Figura.7 Fotografía dentro del mercado de Huejutla

Figura.8 Fotografía de la administración vía intraperitoneal de NA 150 mg/kg

Figura.9 Fotografía de la administración vía intravenosa de STZ 65 mg/kg

Figura.10 Efecto agudo del extracto acuoso y etanol-agua de *E. longifolium* Cav. en los niveles de glucosa plasmática

Figura. 11 Foto de la placa de CCF para detección de compuestos fenólicos

Figura.12 Foto de la placa de CCF para detección de terpenos

Figura.13 Foto de la placa de CCF para detección de glicósidos

Figura.14 Foto de la placa de CCF para detección de alcaloides

## Índice de Tablas

Tabla. 1 Clasificación de los metabolitos secundarios

Tabla. 2 Clasificación taxonómica de *E. longifolium* Cav.

Tabla. 3 Diseño experimental

Tabla. 4 CCF para detección de metabolitos secundarios

Tabla. 5 Rendimiento DER de extracto acuoso y etanol-agua de *Eryngium longifolium Cav*

Tabla. 6 Efecto agudo del extracto acuoso y etanol-agua de *E. longifolium Cav.* en los niveles de glucosa plasmática

Tabla. 7 Metabolitos secundarios detectados por CCF en extracto acuoso y etanol-agua de *Eryngium longifolium Cav.*

Tabla. 8 Comparación de Rf en compuestos fenólicos

## Siglas y abreviaturas

ADA	Asociación American de la Diabetes
ATP	Adenosin trifosfato
CCF	Cromatografía en capa fina
DER	Drug extract ratio
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabete mellitus tipo 2
DMG	Diabetes gestacional
EIC	Enfermedades isquémicas del corazón
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ENT	Enfermedades no transmisibles
Gli	Glibenclamida
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HO	Hipoglucemiantes orales
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IR	Receptor de insulina
K <sub>ATP</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de ATP
kDa	kiloDalton
MS	Metabolitos secundarios
MTC	Medicina tradicional y complementaria

NA	Nicotinamida
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP-1	Poli ADP ribosa polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
Rf	Distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por la fase móvil
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Ser	Serina
STZ	Estreptozotocina
SU	Sulfonilureas
SUR1	Receptor a sulfonilureas 1
Thr	Treonina
VIH/SIDA	Virus de inmunodeficiencia humana/de inmunodeficiencia adquirida



## RESUMEN

En México una de las enfermedades que presenta mayor prevalencia es la diabetes mellitus. De los pacientes diagnosticados con diabetes un 90% de los casos se clasifican como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), para el tratamiento de este padecimiento se requiere de múltiples estrategias como lo son de primera instancia el uso de fármacos, modificaciones en la dieta, ejercitarse o el uso de insulina. Además una gran parte de la población mexicana emplea plantas medicinales como coadyuvantes para el tratamiento de la DM2, por esta razón es necesario realizar investigaciones que respalden su eficacia y efectos.

De acuerdo con trabajos previos del Laboratorio de Etnofarmacología, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en Tlanchinol, Hidalgo, México, se reportó el uso de las hojas y raíz de *Eryngium longifolium* Cav., conocida como piñuela, para tratar la diabetes.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto hipoglucemiante de los extractos acuoso y etanol-agua a dos dosis diferentes de *E. longifolium*, en un estudio agudo, utilizando el modelo animal STZ-NA. Por otro lado, mediante la técnica de cromatografía en capa fina, se buscó identificar de la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos y glicósidos, en los extractos acuoso y etanol-agua. Esto con la finalidad de detectar metabolitos secundarios que estuvieran involucrados con el efecto hipoglucemiante.

Los resultados obtenidos mostraron el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y etanol-agua a dos diferentes dosis de raíz y hojas de *E. longifolium*, ya que en el modelo STZ-NA se observa como los niveles de glucosa plasmática disminuyen significativamente. Así mismo la prueba de cromatografía dio positiva a la detección de compuestos fenólicos, glicosidos y terpenos.

Aún cuando los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación con *E. longifolium*, muestran un efecto hipoglucemiante, es necesario entender su mecanismo de acción, eficacia y efectos a través de nuevos estudios, para poder validar a esta especie como un coadyuvante en el tratamiento de DM2. Además deberán buscarse estrategias que permitan el aprovechamiento y conservación de este recurso.



## 1. INTRODUCCIÓN

México atraviesa una transición demográfica y epidemiológica, esto debido a múltiples factores, uno de estos es la esperanza de vida que ha incrementado, lo que provoca un aumento en la población adulta mayor y con ello los riesgos de padecer enfermedades crónicas (ENSANUT, 2012; Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes, 2013). La transición epidemiológica se define por factores económicos y sociales, entre ellos están; la industrialización, la urbanización, el estilo de vida, la falta de actividad física, la alimentación inadecuada y el consumo de sustancias nocivas. Lo cual modifica la morbilidad y mortalidad, y trae como consecuencia un deterioro en la salud, como el sobrepeso y la obesidad (Arrendondo & De Icaza, 2011; Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes, 2013). Cabe destacar que la obesidad está asociada principalmente con la resistencia a la insulina, la diabetes y la alta mortalidad cardiovascular (Cruz-Domínguez *et al.* 2014).

Se sabe que la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en la población mexicana ha ido en aumento, es por ello que representan una amenaza económica en nuestro sistema de salud, debido a su asociación con las enfermedades no transmisibles (ENT) y por el uso de recursos especializados, los cuales tienen costos elevados (Arrendondo & De Icaza, 2011; Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes, 2013).

Se ha registrado que las ENT causan un 75% del total de las muertes en nuestro país, de estas las que presentan una mayor prevalencia e incidencia son la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades isquémicas del corazón (EIC), accidentes cerebro vasculares y cirrosis hepática (Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes, 2013).



Del total de casos de diabetes mellitus en el mundo, la DM2 representa un 90% (IDF, 2015) esto se debe en gran medida a una serie de factores de riesgo que dan pauta a la aparición de la enfermedad, como lo son un peso corporal excesivo y a la inactividad física (OMS, 2015). Actualmente México se encuentra entre los primeros diez países con mayor número de personas con DM2, afectando a 11.5 millones de personas. Sin embargo, se cree que el total de personas con diabetes podría ser el doble, puesto que hay un 46.5% de diabéticos que desconocen su condición (IDF, 2015).

La DM2 origina complicaciones microvasculares entre ellas la retinopatía y enfermedades cardiovasculares, renales y neuropatías, además de amputaciones. Si el control de la glucemia es adecuado la aparición de estas se retrasa y por ende los gastos que generan se reducen (Watanabe *et al.* 2012; Paz, *et al.* 2014).

Debido a la prevalencia mundial de la DM2 y a los grandes costos que genera al sector salud, se han buscado diferentes alternativas para mejorar el tratamiento de los pacientes. Hasta ahora una de las principales terapias para tratar a estos pacientes es la farmacológica, con ella se busca mantener una adecuada concentración plasmática de glucosa durante períodos de tiempo prolongados (Nolan *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista etnofarmacológico, es importante tener en cuenta que la DM2 puede llegar a ser tratada con fármacos, medicina tradicional o bien una mezcla de ambos (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Ortiz-Andrade *et al.*, 2009). En 2009 Andrade-Cetto, reportó para el municipio de Tlanchinol Hidalgo, México, algunas especies de plantas valiosas para la medicina tradicional. Este estudio incluye plantas hipoglucemiantes, como *Eryngium longifolium* Cav., de la cual aún no se tienen reportes previos de valor farmacológico y fitoquímico. Es preciso realizar estudios preclínicos que permitan confirmar las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales y así comprobar su efecto. Los resultados de estos estudios preclínicos en un futuro, permitirán la realización de ensayos clínicos o bien el aislamiento de nuevos compuestos, para la generación de fármacos (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Ortiz-Andrade *et al.*, 2009).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Diabetes mellitus

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, 2015 (IDF, por sus siglas en inglés), en el mundo hay 415 millones de personas con diabetes. Se prevé que este número incrementará a 642 millones de casos, para el año 2040.

La diabetes mellitus (DM) se considerada uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido a su gran coste económico y la gran cantidad de muertes prematuras que provoca (Ruiz-Ramos *et al.*, 2006).

La diabetes se ha definido como una alteración en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, la cual se caracteriza por hiperglucemia crónica. La DM se presenta

cuando hay alteraciones en la secreción y/o acción de insulina o ambas. La insulina es una hormona producida por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, en el páncreas (Conget, 2002; ADA, 2005; Harcourt, B. E. *et al.*, 2013; OMS, 2015).

La IDF (2014), reporta que al inicio de la enfermedad algunos pacientes pueden experimentar; frecuentes deseos de orinar (poliuria), sed excesiva (polidipsia), aumento del apetito (polifagia), pérdida de peso, sensación de hormigueo o entumecimiento en las



**Figura.1** Síntomas de la Diabetes mellitus (Tomado de IDF, 2014)





manos o los pies, visión borrosa, infecciones frecuentes, heridas de curación lenta, vómitos y dolor de estómago (Figura.1).

Por otra parte, dentro de las complicaciones crónicas que pueden presentarse debido a la hiperglucemia sostenida son: retinopatía, neuropatía, problemas cardiovasculares, nefropatía y amputación de extremidades (Patel *et al.*, 2012).

## 2.2 Diagnóstico y clasificación de la diabetes

### 2.2.1 Diagnóstico

La diabetes se diagnostica con pruebas de laboratorio que consisten en medir los niveles de glucosa en plasma:

- a) Glucosa plasmática en ayunas  $\geq 126$  mg / dL (7.0 mmol/L): Se realiza una prueba de glucosa en ayuno, este último se define como la no ingesta calórica durante por lo menos 8 h.
- b) Prueba de tolerancia oral a la glucosa  $\geq 200$  mg / dl (11.1 mmol/L): La prueba debe ser realizada según lo descrito por la OMS, utilizando una carga de glucosa equivalente a 75g de glucosa anhidra disuelta en agua, pasadas dos horas de la ingesta debe obtenerse la muestra de sangre
- c) Glucosa plasmática al azar  $\geq 200$  mg / dL (11.1 mmol / L): En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, se le hace una prueba de glucosa plasmática en cualquier momento.
- d) Hemoglobina glicada HbA1c  $\geq 6.5\%$ : La prueba debe realizarse en un laboratorio, en donde se utilice un método conocido como NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program, por sus siglas en inglés) (ADA 2014).



### 2.2.2 Clasificación

Actualmente a esta patología se le clasifica en cuatro clases clínicas:

- La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), comúnmente se debe a una reacción autoinmune, donde el sistema inmunológico destruye las células  $\beta$ , debido a ello la producción de la insulina será deficiente y el paciente requerirá de una administración diaria de dicha hormona. Se sabe que la DM1 puede afectar a personas de cualquier edad y generalmente se desarrolla en niños o adultos jóvenes. Los síntomas como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio, pueden aparecer de manera repentina (IDF, 2015; OMS, 2015).
- La diabetes de tipo 2 (DM2), se caracteriza por dos defectos metabólicos; la resistencia a la insulina y la secreción inadecuada de la misma. Este tipo de diabetes se observaba solo en adultos, no obstante en la actualidad se está manifestando con mayor frecuencia en personas menores de 19 años (IDF, 2015; OMS, 2015).
- Dentro de la categoría de otros tipos específicos de diabetes se incluyen aquellos que se deben a distintas causas; como trastornos genéticos los cuales interfieren en la función adecuada de las células  $\beta$  o que afectan directamente en la acción de la insulina, enfermedades que afectan el páncreas, fármacos o químicos y por trasplante órganos (ADA, 2014; IDF, 2015).
- En la Diabetes gestacional (DMG), la hiperglucemia se detecta o aparecen por vez primera durante el embarazo (OMS, 2015). El riesgo de desarrollar DM2 aumenta en personas que padecieron DMG (IDF, 2015).



## 2.3 Diabetes mellitus tipo 2

### 2.3.1 Prevalencia

Tal como se mencionó anteriormente, este tipo de diabetes es la que presenta mayor prevalencia y se estima que para el 2040 el número de casos de DM2 aumentará a 20.6 millones. Así mismo se ha observado que en países de ingresos bajos y medios, las comunidades rurales presentan una mayor predisposición a esta enfermedad (IFD, 2015; OMS, 2015).

El aumento de casos de personas con DM2 a nivel mundial puede estar asociado con el desarrollo económico, el envejecimiento de la población, la creciente urbanización, a los cambios en el estilo de vida como la dieta y la actividad física reducida (IFD, 2015).

Este trastorno se ha considerado de alto riesgo por el daño que puede ocasionar a diversos órganos y por los grandes costos que genera directa e indirectamente (Nolan *et al.*, 2011; Secretaría de Salud, 2013). El diagnóstico de la DM2 es complicado ya que es un padecimiento de inicio silencioso, puede permanecer sin ser detectado durante muchos años y se manifiesta sólo cuando ha evolucionado y las complicaciones han aparecido (ADA, 2014; IDF, 2015; OMS, 2015).

### 2.3.2 Definición

La DM2 se ha determinado como un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia y alteración en el metabolismo lipídico, debido a que las células- $\beta$  pancreáticas son incapaces de secretar la cantidad necesaria de insulina, esto como respuesta a diversos factores como una nutrición inadecuada, inactividad física, sobrepeso u obesidad y la resistencia a la insulina en tejido adiposo, músculo esquelético y hepatocitos (Pagkalos, 2011; Nolan *et al.*, 2011; DeFronzo *et al.*, 2015). Es importante destacar que la epidemiología de la DM2 es ocasionada por diversos factores, pues es un trastorno heterogéneo con una etiología compleja (Nolan *et al.*, 2011; Surya *et al.*, 2014) y los constituyentes clave que juegan un papel importante en el desarrollo de dicha patología son



la genética, epigenética, biología celular y molecular, esta última incluye la programación fetal y neonatal (Nolan *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Resistencia a la insulina

Como se mencionó, la DM2 se caracteriza por la resistencia a la insulina (RI) la cual conduce a una acumulación de glucosa en la sangre (IFD, 2015).

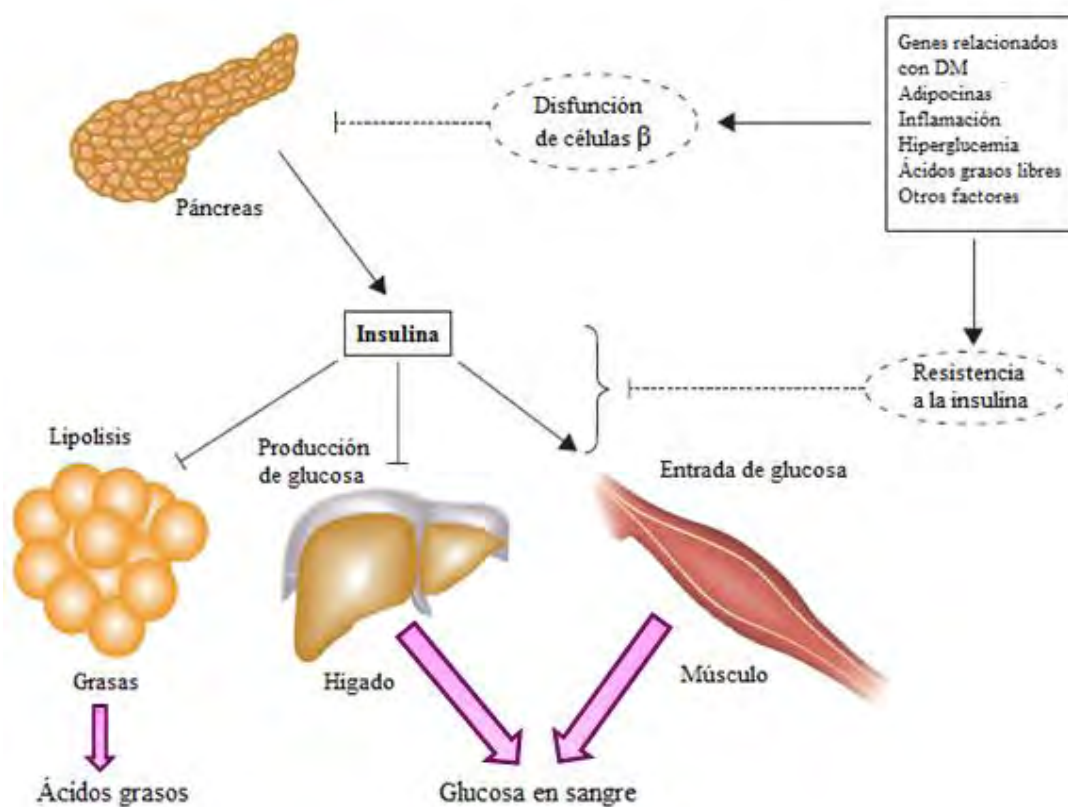
La RI se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, hay un aumento de la producción de glucosa hepática y se dan alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (Figura. 2) (Olivares & Arellano, 2008; Triplitt, 2012).

Se sabe que la RI se presenta en el músculo y el hígado, sin embargo, afecta otros tejidos como; adiposo, riñón, tracto gastrointestinal, vasculatura, tejidos del cerebro y las células  $\beta$  pancreáticas. En el miocito se presentan distintas anomalías que contribuyen a la RI, incluyendo defectos en las vías de señalización de la insulina, reducción en la síntesis de glucógeno muscular, el transporte de glucosa, la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa, la fosforilación de la glucosa, menor cantidad en el número de receptores de insulina y la actividad oxidativa mitocondrial. Entretanto en el hígado, ocasiona un aumento de la gluconeogénesis, que es responsable del incremento en la tasa de la producción basal de glucosa e hiperglucemia en ayunas (Triplitt, 2012; DeFronzo, 2015).

En general la RI se atribuye a múltiples factores uno de ellos indica que se dan defectos en la unión de la insulina a su receptor. Las causas que se toman en consideración son la disminución en el número de receptores y de su actividad de cinasa; el aumento en el estado de fosforilación en residuos de serina/ treonina (ser/ thr) de proteínas en el receptor y su sustrato; la baja actividad de las cinasas Akt y A t ; y fallas en la expresión y función de GLUT4 (Olivares & Arellano, 2008).



Debido a la complejidad de la fisiopatología de la DM2, se requieren de distintas alternativas que permitan un tratamiento adecuado, a continuación se describirán algunos de ellos.



**Figura.2** Resistencia a la insulina en adipocitos, hígado y músculo (Tomada y modificada de Stumvol *et al.*, 2005)

## 2.4 Tratamiento para DM2

Las personas con DM requieren atención médica especializada, así como educación para el autocuidado para prevenir las complicaciones agudas y reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo. La terapia para este padecimiento es compleja y requiere de estrategias que disminuyan los riesgos multifactoriales. Cabe mencionar que el tratamiento para la diabetes depende del tipo y severidad de la misma (Sistema Nacional de Salud, 2000; Pallab &



Amartya, 2012; ADA, 2014; IDF, 2015; OMS, 2015). En el caso de la DM2 para mantener controlados los niveles de glucosa, es necesario recurrir a una terapia farmacológica, como los hipoglucemiantes orales. A la par debe emprenderse una dieta adecuada, ejercicio, reducción de peso y evitar el consumo de sustancias como tabaco y alcohol. Los factores que deben tomarse en cuenta al elegir un fármaco para el tratamiento de la DM2 son la efectividad para disminuir los niveles de glucosa y reducción del riesgo de complicaciones (Roldán-Vences *et al.* 2011). Si estos medicamentos son todavía insuficientes, se deberá considerar un tratamiento con insulina (Pallab & Amartya, 2012).

#### 2.4.1 Hipoglucemiantes orales

Existen cinco clases principales de hipoglucemiantes orales (HO), para el tratamiento de la diabetes. Cada fármaco presenta un mecanismo de acción diferente así como diversos órganos diana, se tienen hipoglucemiantes como las biguanidas, que inhiben el proceso de la gluconeogénesis en el hígado y mejoran la sensibilidad a la insulina; sensibilizadores de insulina como tiazolidinedionas, que disminuyen la RI; inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, estas reducen la absorción intestinal de carbohidratos, mediante la inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas en el borde del cepillo intestinal; las incretinas, hormonas que participan en la regulación de la insulina (GIP y GLP-1); y los secretagogos de insulina, que estimulan la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas como las sulfonilureas y meglitinidas (Ortiz-Andrade *et al.*, 2009; Cheng & Fantus, 2005; Leech *et al.*, 2011).

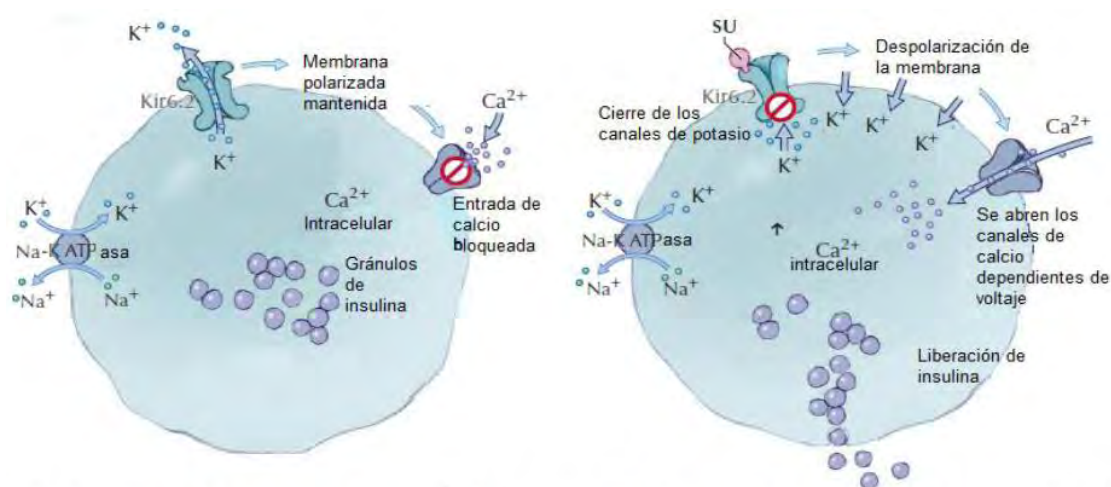
#### 2.4.2 Sulfonilureas

En este estudio se utilizó como fármaco control glibenclamida (Gli), el cual es una sulfonilurea (SU) de segunda generación (Li *et al.*, 2012). La Gli estimula la secreción de la insulina ya que actúa sobre las células  $\beta$  del páncreas, teniendo un efecto hipoglucemiante agudo (Amaya-Chávez *et al.*, 2007).

Las SU actúan sobre las células  $\beta$  pancreáticas, el mecanismo de acción se presenta cuando estas se unen al receptor a sulfonilureas 1 (SUR1) (Simó & Hernandez 2002; Doyle & Egan



2003; Roldán-Vences *et al.*, 2011), acoplado a los canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) (Cheng & Fantus, 2005; DiStefano & Watanabe, 2010). Por lo tanto al darse la unión, hay un cierre de los canales de  $K^+$ , desencadenando así la despolarización de la membrana celular y esta a su vez genera la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, la entrada de  $Ca^{2+}$  y su aumento intracelular, causa la exocitosis de insulina (Figura. 3) (DiStefano & Watanabe, 2010; Cheng & Fantus, 2005).



### A) Canales de iones en una célula $\beta$ en reposo

### B) SU sitio de acción de las sulfonilureas

**Figura. 3** Mecanismo de acción de las SU, funcionan como análogos de la glucosa, inhibiendo los canales de  $K^+$  dependientes de ATP, estimulando la secreción de insulina (Tomada y modificada de Cheng & Fantus, 2005).

Estos fármacos aumentan la actividad periférica de la insulina; sin embargo, son incapaces de disminuir la glucemia en ausencia de islotes pancreáticos (Escalante-Pulido, 2001; Mazzola, 2012). Dentro de los efectos secundarios que pueden presentarse por su ingesta están la hiperinsulinemia, hipoglucemia, molestias gastrointestinales y aumento de peso al



inicio del tratamiento (Alfaro *et al.*, 2000; Simó & Hernandez, 2002; Cheng & Fantus, 2005; Roldán-Vences *et al.*, 2011).

Las SU varían en duración de acción, potencia, metabolismo, efectos adversos entre otras propiedades farmacológicas. Las de segunda generación se consideran con mayor potencia y menor toxicidad (Simó & Hernandez 2002).

## 2.5 Modelo STZ-NA

Dada la heterogeneidad de la DM2, se requieren diferentes modelos animales, que permitan comprender mejor el desarrollo de este padecimiento (Arias-Díaz & Balibrea, 2007; Tahara *et al.*, 2008). Considerando que ninguno de ellos reflejará por completo la complejidad del trastorno, no obstante nos permitirá conocer aspectos de la patogénesis y su progresión, además de facilitar las pruebas con fármacos hipoglucemiantes (Bertram & Hanson, 2001). En los modelos se pueden reproducir uno o más rasgo clínicos de la DM2 humana. El modelo elegido para algún experimento en particular depende de diversos factores (Arias-Díaz & Balibrea, 2007). Para este trabajo se eligió un modelo inducido por administración de fármacos STZ-NA, el cual se describirá a continuación.

El modelo STZ-NA posee grandes ventajas ya que emula ciertas características de la DM2 como lo es la intolerancia a la glucosa, la secreción de insulina estimulada por glucosa o bien por secretagogos de insulina. Mediante este modelo inducido por estreptozotocina (STZ) y nicotinamida (NA), se ha podido establecer una hiperglucemia moderada y estable, asociada con la pérdida de la secreción de insulina postprandial, así como una disminución aproximada del 50% en el contenido de insulina pancreática (Masiello, 2006; Tahara *et al.*, 2008).



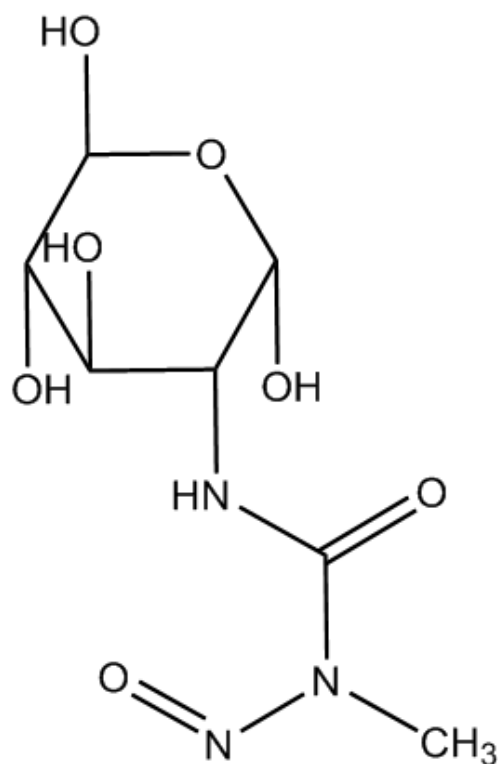


De acuerdo con Masiello (2006), para la inducción se requieren ratas de dos meses de edad, a estas se les inyecta vía intraperitoneal una dosis de 200 a 230 mg/kg de NA y después de 15 minutos se administra vía intravenosa una dosis de 65 mg/kg de STZ.

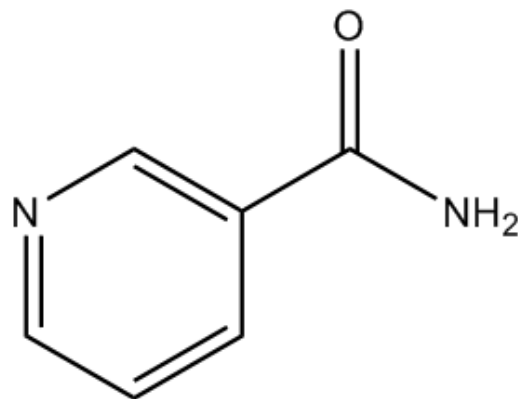
La STZ es un fármaco, aislado de *Streptomyces achromogenes*, su molécula consta esencialmente de una glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea y es un potente alquilante (Figura. 4A) (Tahara *et al.*, 2008; Szkudelski, 2012).

La Z es selectiva sobre las células  $\beta$  pancreáticas, puesto que entra a ellas a través del transportador de glucosa GLUT2. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica, aumentando la producción de radicales libres e induciendo múltiples puntos de ruptura en la doble hélice del DNA, seguido por la activación de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), implicada en la reparación del DNA. Debido a la sobre estimulación de esta enzima, hay un agotamiento del  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) y por consecuencia del ATP (adenosín trifosfato), lo que conlleva a la muerte celular (Tahara *et al.*, 2008; Szkudelski, 2012).

Para que el daño en el modelo utilizado sea moderado se administra una dosis de nicotinamida. La NA es la forma amida de la vitamina B<sub>3</sub> (niacina) (Figura. 4B) y



**A) Estreptozotocina**



**B) Nicotinamida**

**Figura. 4** A) Estructura química de la STZ [2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)-D-glucopiranos] y B) Estructura química de la NA [piridina-3-carboxamida].



es capaz de proteger parcialmente a las células  $\beta$  contra la citotoxicidad de la STZ, por dos mecanismos: es un precursor de  $\text{NAD}^+$  e inhibe a la PARP-1 (Tahara *et al.*, 2008; Szkudelski, 2012).

Es importante aclarar que la sensibilidad a la STZ y la NA varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. La edad de las ratas es un factor significativo, ya que las células  $\beta$  de los animales más jóvenes pueden regenerarse. Además el modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. La principal ventaja de los modelos basados en administración de fármacos, es que el grado de alteración de las células  $\beta$  puede ser regulado de acuerdo con la dosis de toxina administrada (Arias-Díaz *et al.*, 2007; Szkudelski, 2012).

## 2.6 Medicina tradicional y complementaria

La medicina tradicional y complementaria se utiliza en todo el mundo, la mayor parte de la población rural de los países en desarrollo recurren a este tipo de medicina, ya que en la mayoría de los casos representan la principal fuente de atención sanitaria, y/o a veces la única (Saric-Kundalic *et al.*, 2011; OMS, 2014).

La medicina tradicional se define como el conjunto de conocimientos, capacidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, ya sea que se puedan explicar o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales. Además de este término existe el de medicina complementaria o medicina alternativa, el cual hace referencia a un conjunto de prácticas de atención de salud que no forman parte de la tradición ni de la medicina convencional de un país dado, ni están totalmente integradas en el sistema de salud predominante. En ciertos países, estos términos se utilizan indistintamente para referirse a la medicina tradicional. Existe una definición adicional la cual se conoce como medicina tradicional y complementaria (MTC), fusiona los términos medicina tradicional y medicina complementaria, esta abarca productos, prácticas y profesionales (OMS, 2014).



México cuenta con una gran riqueza de conocimientos tradicionales (Juárez-Vázquez *et al.*, 2013) ya que el uso de plantas medicinales ocurrió desde la época prehispánica (Díaz, 1984). El conocimiento tradicional es el resultado de diversas observaciones y experimentos empíricos de generaciones de estudiosos observadores de la naturaleza. Ellos registraban y transmitían sus saberes a las nuevas generaciones, a través de sus estelas, códices (en donde se plasmó el manejo y aprovechamiento prehispánico de la flora mexicana) o por medio de enseñanzas verbales. Los "tlamatine" (aquel que sabe algo), eran sabios nahuas responsables de componer, pintar, conocer y enseñar los cantos y poemas en que preservaron su entendimiento científico (Gispert *et al.*, 1988, Gómez-Pompa, 2004).

Las plantas medicinales en México se han utilizado no sólo para el tratamiento empírico de muchas enfermedades, también se han utilizado en prácticas religiosas (Díaz, 1984; Andrade-Cetto, 2009). La herbolaria mexicana involucra el uso de diversas plantas nativas, así como el uso de plantas introducidas desde diversas partes del mundo (Juárez-Vázquez *et al.*, 2013). Beltran *et al.* (2014) consideran que los componentes que influyen en la selección de las plantas en las comunidades indígenas de México son; los biológicos, ecológicos y los socio-culturales, incluyendo otros factores como; las técnicas de producción y prácticas, la religión, el género y la edad.

Según la MTC mexicana, existen ciertas preferencias por las partes usadas de las plantas, esto va a depender de la enfermedad o afección a tratar, al igual que los modos de empleo van a variar en función de la enfermedad. Se acepta que los efectos beneficiosos de las plantas medicinales, se pueden deber a componentes activos presentes en la planta entera, en determinadas partes de la planta (tallos, hojas, raíces flores o frutos), en materiales vegetales o en combinación de los mismos, ya sea crudos o procesados (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008).

Para el año 1996 Morales, reportó que en todo el mundo se usaban en fitoterapia entre 35,000 y 70,000 especies. De 265,000 especies de plantas con semillas reportadas, sólo de una pequeña fracción se ha investigado su fitoquímica y sólo una submuestra se ha estudiado



adecuadamente, en términos de sus propiedades farmacológicas. Se estima que hasta el momento 5,000 especies de plantas han sido científicamente probadas por su valor médico (Saric-Kundalic *et al.*, 2011).

Andrade- Cetto (2009), calculó que en México aproximadamente 5,000 plantas son de uso medicinal. Estas plantas se comercializan en las principales ciudades y en algunas regiones del país. Aproximadamente 350 especies medicinales (frescas y secas) enteras, partes de ellas o en mezclas diversas, resultan en un producto que se vende en los puestos de herbolaria de los mercados (Huerta, 1997).

Se sabe que más del 50% de todos los medicamentos, de uso clínico a nivel mundial provienen de productos a base de plantas o sus derivados. Las encuestas etnomédicas son una fuente fiable para el descubrimiento de nuevos fármacos (Kadir *et al.*, 2012). El uso potencial de las plantas como fuente de fármacos está todavía pobremente explorado.

Debido a la falta de estudios que permitan comprobar la eficacia de estas plantas, se han buscado distintas estrategias que permitan la resolución a dicha demanda. En 2014 la OMS propone una estrategia sobre medicina tradicional, la cual tiene como objetivos principales prestar apoyo a los Estados Miembros a fin de que: aprovechen la contribución potencial de la MTC a la salud, el bienestar y la atención de salud centrada en las personas, y promuevan la utilización segura y eficaz de la MTC a través de la reglamentación y la investigación, así como mediante la incorporación de productos, profesionales y prácticas en los sistemas de salud (OMS, 2014).

En México se ha sugerido que se inicien programas enfocados en la identificación, preparación, cultivo y la conservación de plantas medicinales utilizadas por la MTC y que con ayuda de la tecnología se evalué la calidad así como su eficacia (Fleurentin & Pelt, 1990).



El interés farmacológico clínico en la eficacia y seguridad de las hierbas medicinales ha crecido durante los últimos años, debido a la constatación de que muchas personas se automedican usando estos agentes. Hay un conocimiento limitado en los trabajadores de la salud (farmacéuticos, médicos, enfermeras y trabajadores sociales) sobre la farmacología y toxicología de los remedios herbales más comúnmente usados por sus pacientes (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008). Por lo tanto se requiere de investigación específica que rescate y respalde el conocimiento tradicional, que caracterice químicamente plantas y extractos, ya que existen pocos estudios que combinan un enfoque fitoquímico y farmacológico detallado (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008).

## 2.7 Plantas hipoglucemiantes

Se ha encontrado que muchas plantas medicinales utilizadas por diversos pueblos indígenas de todo el mundo, son útiles en el tratamiento de la DM por su acción hipoglucemiante (McCune & Johns, 2002). La MTC juega un papel importante en el tratamiento de la DM2, ya que en los países en desarrollo los medicamentos convencionales resultan costosos, por tanto las plantas hipoglucemiantes se estiman como una opción rentable. Una gran ventaja del uso de las plantas medicinales es que son de fácil acceso y se considera que sus efectos secundarios son relativamente bajos. Muchos de los fármacos disponibles en la actualidad, han derivado directa o indirectamente de plantas u hongos y se han utilizado con éxito para el tratamiento de la DM2, como ejemplos están la metformina (derivada de *Galega officinalis*), la acarbosa (derivada de *Actinoplances spp.*) y 4 hidroxí-iso-leucina (derivada de *Trigonella foenum-graecum*) (Kadir *et al.*, 2012; Arumugam *et al.*, 2013).

Cientos de extractos o principios activos de plantas medicinales reportadas para diabetes, han sido seleccionados por su actividad hipoglucemiante, tanto *in vitro* como *in vivo*. En algunos informes etnomédicos se consideraba que entre 800 a 1000 especies de plantas, se investigaron para el tratamiento de la diabetes. De estas especies se obtuvo que aproximadamente el 80% demostró efecto hipoglucemiante. Para la mayoría de los casos, el o los compuestos químicos responsables de la actividad farmacológica se aislaron e



identificaron, la información obtenida permitió dilucidar los mecanismo de acción mediante los cuales actúan dichos compuestos (Oubré *et al.*, 1997; Arumugam *et al.*, 2013). Reportes recientes estiman que la población mexicana utiliza alrededor de 500 especies para tratar la DM2 (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005).

De los compuestos químicos aislados de plantas con efecto hipoglucemiante se tienen documentados alcaloides, glucósidos, goma de galactomanano, polisacáridos, peptidoglicanos, hipoglicanos, guanidina, esteroides, hidratos de carbono, glicopéptidos, terpenoides, aminoácidos e iones inorgánicos (Oubré *et al.*, 1997). Ramírez *et al.* en 2012, han demostrado que algunas preparaciones de plantas, contiene glucosidasa y/o inhibidores de lipasa.

Debe considerarse que no todas las plantas reportadas con actividad biológica son del todo seguras, por lo tanto se requiere identificar aquellas plantas hipoglucemiantes con verdadera eficacia y seguridad terapéutica (Oubré *et al.*, 1997; Arumugam *et al.*, 2013). Es necesario entonces realizar estudios pre-clínicos en algún modelo animal, que permita explorar el riesgo y los beneficios de las plantas, y en un futuro determinar si presentan efecto en ensayos clínicos, es aquí donde comienza el trabajo de la etnofarmacología (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008; Ortiz-Andrade *et al.*, 2009).

## 2.8 Etnofarmacología

Para que los avances en el área de la MTC puedan realizarse se requiere de grupos interdisciplinarios, tales grupos deben ser capaces de diseñar estrategias coordinadas y secuenciales utilizando sus propios métodos. Una disciplina que enfatiza la necesidad de entender los usos y efectos de las plantas en su contexto cultural, así como considerar aspectos químicos y farmacológicos de las mismas, es la etnofarmacología (Díaz, 1984).



En México contamos con aproximadamente 62 diferentes grupos étnicos, cada uno con su propia cultura, lengua y repertorio de plantas medicinales (Juárez-Vázquez *et al.*, 2013). La comunidad científica, se ha percatado de esta riqueza y del conocimiento que aún conservan estas etnias del país. Gran parte del conocimiento tradicional prehispánico se ha perdido sin embargo, los grupos sobrevivientes a la conquista han conservado y enriquecido el conocimiento tradicional y lo han transmitido a las nuevas generaciones. Esto a pesar de la ideología del México moderno que busca "modernizar" a los grupos étnicos (Gomez-Pompa, 2004).

Debido a la riqueza cultural del país y a su diversidad vegetal se considera un lugar óptimo para realizar estudios etnofarmacológicos (Andrade-Cetto, 2009).

La etnofarmacología se ha visto como una herramienta para el hallazgo de nuevos compuestos derivados de plantas y/o animales utilizados en la MTC, que pueden emplearse para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. También permite saber si existe una amenaza a la integridad de las culturas indígenas, promueve la conservación de los recursos y fomenta la interacción entre los pueblos indígenas y los investigadores. Si bien, los enfoques anteriores son muy diversos, se relacionan por compartir una visión estática del uso de las plantas medicinales locales y tradicionales (Heinrich *et al.*, 2006; Waldstein, 2006).

Waldstein (2006) considera a la etnofarmacología como la intersección de la etnografía médica y estudios biológicos de la acción terapéutica.

Con base en Andrade-Cetto & Heinrich (2011), la etnofarmacología se define como el estudio del uso tradicional de productos naturales biológicamente activos y tiene como objetivo comprender sus acciones terapéuticas.



La etnofarmacología es interdisciplinaria, ya que engloba métodos de diversas disciplinas como la etnoantropología, etnobotánica, fitoquímica, farmacología y toxicología (Waller, 1993).

Uno de los retos para los etnofarmacólogos es recopilar e interpretar de manera adecuada la información que reciben de los informantes sobre los remedios y su relación con las enfermedades (Waller, 1993).

Por otro lado, las propiedades medicinales y farmacológicas empíricamente aprendidas y la selección de las plantas medicinales, dependen de las características cognitivas, factores ecológicos y la historia cultural. El comprender la razón por la cual se usa o no un taxón, es de interés etnofarmacológico, ya que ayuda a explicar si los principios farmacológicamente activos representan la aplicación empírica y si una evaluación farmacológica es razonable (Weckerlea *et al.*, 2011).

La etnofarmacología cuenta con diversas aplicaciones, nos brinda información básica sobre nuestras culturas tradicionales, así como de la composición química y los efectos de las plantas de mayor importancia. Además, el rescate del conocimiento ancestral de las culturas indígenas es de carácter urgente, ya que estos grupos son cada vez más escasos (Díaz, 1984).

Los estudios realizados en campo son de vital importancia, para la realización de un estudio etnofarmacológico ya que, al entrevistar a los informantes de las comunidades, se obtiene de primera mano, la información de plantas que pueden presentar efectos farmacológicos, además de que se obtiene información sobre sus usos, el modo de empleo, dosis y enfermedades para las cuales se utilizan (Samarío, 2013).

La aplicación de la etnofarmacología no debe ser unidireccional para el desarrollo de la investigación y herramientas para la ciencia y nuestra cultura, sino que debe promover la





salud entre las culturas indígenas que generaron la información en un marco de ecodesarrollo (Díaz, 1984).

En la actualidad, se han desarrollado marcos legales internacionales para proteger la propiedad intelectual de las culturas y personas con conocimientos especializados sobre los usos de las plantas, así como material biológico originario de una región política (Salick *et al.*, 2003). Recientemente se dio a conocer el Protocolo de Nagoya el cual promueve el uso de recursos genéticos y de los conocimientos tradicionales, y fortalece las oportunidades para compartir de manera justa y equitativa los beneficios que se deriven de su uso. Uno de los objetivos del Protocolo es generar incentivos para conservar la diversidad biológica y para utilizar de manera sostenible sus componentes, y así mejorar la contribución de la diversidad biológica al desarrollo sostenible y al bienestar del ser humano (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011).

Como se mencionó la etnofarmacología es multidisciplinaria debido a sus diversos enfoques, una de las disciplinas con la cual está estrechamente relacionada es la fitoquímica, puesto que con ella pueden identificarse y determinarse las estructuras químicas que componen el material vegetal en estudio.

## 2.10 Fitoquímica

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos y generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta (Lock de Ugaz, 1994; Morales, 1996).

Los metabolitos secundarios (MS) sintetizados por las plantas, son compuestos de bajo peso molecular. Estos varían entre grupos taxonómicos, incluso pueden estar restringidos a una familia, un género o una especie y se consideran marcadores taxonómicos de familias y géneros (García, 2004; Vilela *et al.*, 2011).



Se ha detectado que una gran variedad de metabolitos secundarios sirven de diversas maneras en diferentes grupos de plantas (Bourgaud *et al.*, 2001). Cumplen distintas funciones a nivel fisiológico y ecológico; un ejemplo de su importancia a nivel fisiológico son los flavonoides, que protegen de la radiación UV. A nivel ecológico, sirven para atraer polinizadores o bien intervienen como defensa ante patógenos (bacterias, virus u hongos) o contra la herbivoría (Sepúlveda- Jiménez *et al.*, 2003; García, 2004; Pérez-Alonso *et al.*, 2011).

Hasta el momento se tiene registro de por lo menos 100,000 MS producidos por plantas. Anualmente se describen al menos 1,600 estructuras químicas nuevas, las cuales son obtenidas de plantas superiores y una gran cantidad tiene actividad biológica (Pérez-Alonso *et al.*, 2011).

En la Tabla. 1 se muestran algunos de los grupos de MS, retomando algunos conceptos de Vilela *et al.*, 2011; Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009.

Los principios activos tienen propiedades medicinales, preventivas o bien incrementan el bienestar. La farmacología se encarga de analizar el efecto que tienen las sustancias de origen natural en el organismo. Por otro lado, la fitoquímica mediante un análisis de extractos, permite detectar y posteriormente identificar los principios activos, responsables de las propiedades atribuidas a las plantas. Tiene entonces como objetivo principal, determinar el o los metabolitos secundarios, presentes en la planta de interés. Para la identificación de los compuestos secundarios, se requiere seguir una serie de técnicas de extracción, purificación y determinación estructural, ejemplo de ello es la cromatografía en capa fina (Lock de Ugaz, 1994; Morales, 1996).



Clasificación de los metabolitos secundarios			
Grupo	Características	Ruta metabólica	Familia botánica
Alcaloides	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tienen stomos de nitrógeno en su molécula y generalmente son heterocíclicos.</li> <li>Son solubles en agua.</li> <li>Existen 15,000 alcaloides en 150 familias de plantas.</li> <li>A dosis elevadas se consideran tóxicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se sintetizan a partir de aminoácidos como la lisina, serina y triptófano. El esqueleto carbonado de algunos alcaloides deriva de la suma de los terpenos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apocynaceae</li> <li>Loganiaceae</li> <li>Rubiaceae</li> </ul>
Compuestos fenólicos o fenilpropanoides	<ul style="list-style-type: none"> <li>Derivados del fenol tienen un anillo aromático con un grupo hidroxilo.</li> <li>Incluyen a los taninos, las cumarinas y los flavonoides.</li> <li>Los flavonoides tienen C<sub>15</sub>; ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de C<sub>3</sub>; se clasifican en el grado de oxidación del puente de tres carbonos, antocianinas (pigmentos), flavonas, flavoles e isoflavonas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ruta del ácido shikímico.</li> <li>Ruta del ácido málico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Myrtaceae</li> <li>Lauraceae</li> <li>Lamiaceae</li> <li>Rutaceae</li> </ul>
Terpenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los monoterpenos tienen dos unidades de C<sub>5</sub>; los sesquiterpenos tienen tres unidades isopreno, los diterpenos y los diterpenos cumarinas con cuatro unidades.</li> <li>Se pueden encontrar en aceites esenciales y resinas.</li> <li>Son insolubles en agua.</li> <li>Existen 40,000 terpenos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ruta del ácido mevalónico.</li> <li>Ruta del mevaleríno (MEP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Myrtaceae</li> <li>Lamiaceae</li> </ul>
Glicósidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tienen un enlace glicosídico el cual se forma con la unión de una molécula de azúcar con otra que contiene un grupo hidroxilo.</li> <li>Se dividen en cuatro grupos: saponinas, glicosidos cardíacos, glicosidos cianogénicos y glicosidoslatos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proviene de una mezcla de dos azúcares denominados glucósidos y se forman a partir de cualquier azúcar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Brassicaceae</li> <li>Dioscoreaceae</li> <li>Liliaceae</li> <li>Escrofaraceae</li> </ul>

Tabla 1 Clasificación de los metabolitos secundarios (Vilela et al. 2011; Avalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).



## 2.11 Cromatografía en capa fina

El método de referencia para la farmacopea es siempre la cromatografía en capa fina (CCF), ya que cuenta con ciertas ventajas; como su simplicidad, puesto que es de operación fácil, así mismo es de separación rápida, además de ser económica, porque requiere pequeñas cantidades de disolvente, es por ello que se utiliza ampliamente en diversos campos para separar o purificar mezclas de compuestos químicos y biológicos. La CCF basada en tecnologías de separación tiene vasta popularidad en varios campos de investigación (Pothier *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

La CCF generalmente se utiliza para analizar muestras en crudo con un nivel mínimo de purificación y es uno de los métodos de separación más adecuados para análisis de alto rendimiento (Cheng *et al.*, 2011).

Esta técnica de separación se basa en las diferentes afinidades de los compuestos o una mezcla de dos fases inmiscibles, una fase móvil y una fase estacionaria. (Reich & Schibli, 2007). La fase móvil, es un conjunto de soluciones orgánicas que abarcan una amplia gama de hidrofobicidades. Mientras que la fase estacionaria es un absorbente sólido, orgánico o inorgánico como sílice, sílice-alquilo (C8 o C18), celulosa o polímero monolítico, los cuales recubren una superficie plana, ya sea de vidrio, aluminio o poliéster (Reich & Schibli, 2007; Cheng *et al.* 2011; CHEM, 2015).

Se coloca la parte inferior de la placa de CCF en una cámara con los eluyentes, los cuales se desplazan hacia arriba de la placa por acción capilar. La separación de los compuestos químicos sobre la fase estacionaria, se cuantifican en términos del valor R<sub>f</sub> (distancia recorrida por el compuesto/ distancia recorrida por la fase móvil), que expresa retención relativa. Además de las fases estacionaria y móvil, también está presente y tiene una gran influencia la fase gaseosa. Dependiendo de la polaridad de los compuestos estos van a desplazarse hacia arriba, ubicándose a distintas distancias de su lugar original. La mayoría de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite observar los



compuestos activos bajo luz ultravioleta. El indicador absorbe la luz UV, emitiendo luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, como resultado se aprecia una mancha en la placa. En el caso de compuestos que no absorben la luz UV, se requiere utilizar un agente revelador, este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados (Reich & Schibli, 2007; Cheng et al. 2011; Zhang et al. 2014; CHEN, 2015).

## 2.12 *Eryngium longifolium* Cav.

En un estudio etnobotánico realizado por Andrade-Cetto en 2009, se reportan para el municipio de Tlanchinol Hidalgo, México, diversas especies de plantas valiosas para la MTC. Este trabajo incluye algunas plantas hipoglucemiantes, entre ellas piñuela (*Eryngium longifolium*), de la cual aún no se tienen reportes previos de valor farmacológico y fitoquímico, por ello se eligió para este trabajo. En la Tabla. 2, observamos su clasificación taxonómica.

### 2.12.1 Clasificación taxonómica de *E. longifolium* Cav.

**Tabla. 2** Clasificación taxonómica de *E. longifolium* Cav (Tropicos, 2015)

---

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Equisetopsida

**Subclase:** Magnoliidae

**Superorden:** Asteranae

**Orden:** Apiales

**Familia:** Apiaceae

**Género:** *Eryngium*

**Especie:** *Eryngium longifolium* Cav.

---



### 2.12.2 Sinónimos de *E. longifolium* Cav.

-*Eryngium langlassei* H. Wolff

Mathias, M. E. & L. Constance. 1941. A synopsis of the North American species of *Eryngium*. Amer. Midl. Naturalist 25(2): 361–387.

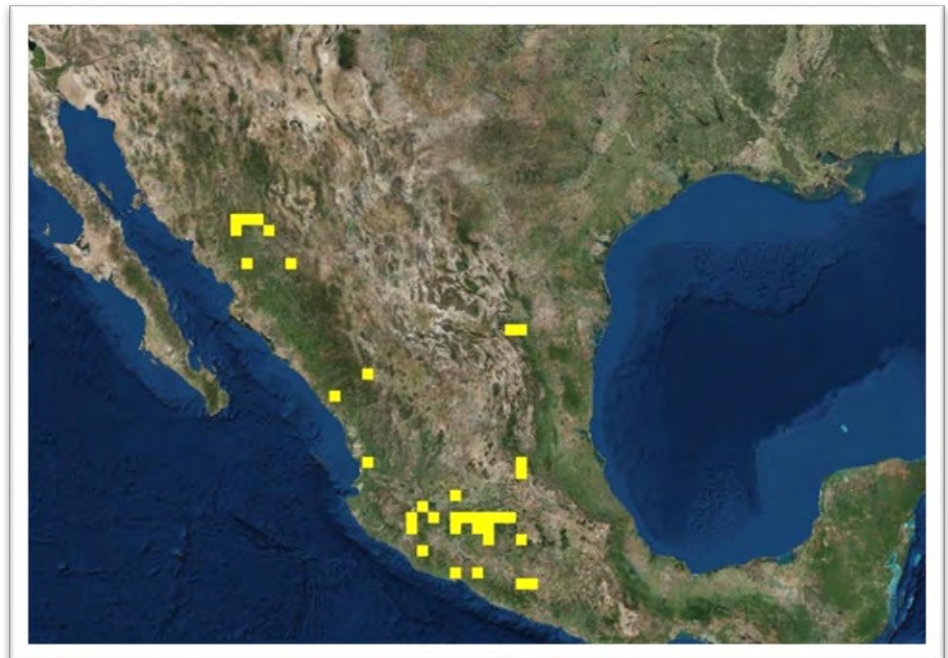
-*Eryngium watsonii* J.M. Coult. & Rose

Mathias, M. E. & L. Constance. 1941. A synopsis of the North American species of *Eryngium*. Amer. Midl. Naturalist 25(2): 361–387.

### 2.12.3 Distribución del género *Eryngium*

El género *Eryngium* L. pertenece a la subfamilia Saniculoideae Drude, de la familia Apiaceae Lindley, también conocida como Umbelliferae Juss. Agrupa alrededor de 250 a 300 especies distribuidas en las regiones templadas y tropicales de nuestro planeta. Estas especies se distribuyen

dentro de los hemisferios oriental y occidental. En cada hemisferio, se reconocen dos centros de diversidad: la zona centro-occidente de México y centro-oriente de Sudamérica, y el oeste de la región del Mediterráneo y el suroeste de Asia. Aproximadamente dos tercios de las especies



**Figura. 5** Distribución de *E. longifolium* Cav., en la República Mexicana, reportada para los estados de; Sonora, Sinaloa, Nuevo León, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Guerrero y Oaxaca (Encyclopedia of Life, 2015).



de *Eryngium* se distribuyen en el norte, centro y sur de América (Calviño *et al.*, 2008, Muckensturm B. *et al.*, 2010; García-Ruiz, 2013).

*Eryngium* se considera cosmopolita, ya que crece en diversos hábitats como; lugares pantanosos, bosques y zonas abiertas con pastizal. Para México se han reportado alrededor de 60 especies (García-Ruiz, 2013). En el caso particular de *Eryngium longifolium* Cav., se reporta para los estados de Sonora, Sinaloa, Nuevo León, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Guerrero y Oaxaca (Tropicos, 2015) (Figura.5).

#### 2.12.4 Descripción del género *Eryngium*

Son herbáceas bianuales o perennes, caulescentes o acaulescentes, usualmente glabras y erectas (García-Ruiz, 2013).

Los miembros de este género se distinguen fácilmente de otros miembros de Apiaceae por sus inflorescencias capitadas y una bráctea por flor. El género, sin embargo, es extremadamente variable morfológicamente. Algunas son postradas y llegan a medir pocos centímetros de altura; mientras que otras son erectas y llegan a medir hasta 3 m (Calviño *et al.*, 2008).

Tienen raíces fuertes o raicillas fibrosas. Las hojas son simples, lobadas o espinoso-dentadas a lineares, de venación variable, desde reticuladas hasta paralelinervias y con aspecto semejante al de algunas monocotiledóneas. Las flores se encuentran dispuestas en cabezuelas bracteadas, el cáliz generalmente está mejor desarrollado que la corola, los pétalos son de color blanco a púrpura y sésiles. El fruto es globoso u ovoide,



**Figura. 6** Foto de ejemplar de Herbario de *E. longifolium* Cav. (Tomado de Tropicos, 2015).



cubierto con escamas o tubérculos (Figura. 6). En general la polinización es entomófila (García-Ruiz, 2013).

### 2.12.5 Usos y fitoquímica de *Eryngium*

En cuanto a sus usos varias especies de *Eryngium* son comestibles o se cultivan como ornato. De otras se aprovechan las raíces en confitería. Además, se han descrito las distintas propiedades medicinales que se han atribuido a sus representantes como tónicos afrodisiacos, alexitérico, antihemorroico, diaforético, digestivo, diurético, emenagogo, emético, expectorante, tónico, para desordenes urinarios y uterinos, y como bebida ceremonial (Palá, 2002; García-Ruiz, 2013).

De acuerdo con Palá, (2002), para la especie *E. longifolium* se ha reportado que sus usos medicinales son como diurético, emenagogo y alexitérico.

Respecto a los estudios fitoquímicos de distintas especies de *Eryngium*, se ha encontrado que este género se puede reconocer por la presencia de poliacetilenos, flavonoides, saponinas, cumarinas y glicosidos monoterpénicos (Muckensturm B. *et al.*, 2010).

De acuerdo a los estudios etnobotánicos realizados por Andrade-Cetto (2009) en Tlanchinol, Hidalgo, México, reportó que algunos pacientes diabéticos utilizaban para controlar esta afección una infusión de *E. longifolium* (nombre vernáculo piñuela), la cual utilizan de manera tradicional en forma de infusión, agregando un puño de esta (20 g) en 500 mL de agua y la consumen como agua de día, los pacientes referían que la planta se conseguía en el mercado municipal de Huejutla o en los senderos del río en esa misma localidad.





### 3. JUSTIFICACIÓN

Al ser la DM2 una de las enfermedades con mayor prevalencia en México la cual afecta a 11.5 millones de personas y debido al incremento de futuros casos que afectarán a la población, se requieren de nuevas y mejores estrategias que ayuden a reducir estas cifras. El uso de plantas que presentan actividad hipoglucemiante pueden funcionar como coadyuvantes en el tratamiento de la DM2, por esta razón es importante realizar estudios farmacológicos que evalúen sus efectos. En 2009 se reportó *E. longifolium*, como una planta utilizada para el tratamiento de diabetes, no obstante sólo posee estudios etnobotánicos. Por ende se considera importante su estudio farmacológico, con la finalidad de obtener resultados que validen si esta cuenta con un efecto hipoglucemiante.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto hipoglucemiante agudo de *Eryngium longifolium* Cav. administrado por vía oral a ratas Wistar con hiperglucemia moderada inducida con STZ-NA. Y determinar los grupos de metabolitos secundarios que presenta dicha planta.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso y etanol-agua de *Eryngium longifolium* Cav. a dos dosis, administrado por vía oral a ratas Wistar con hiperglucemia moderada inducida con STZ-NA.
- Mediante la técnica de cromatografía en capa fina, determinar si los extractos acuoso y etanol-agua de *Eryngium longifolium* Cav. poseen; compuestos fenólicos, glicósidos, alcaloides y terpenos.



## 5. HIPOTESIS

- Ho1: La administración aguda por vía oral del extracto acuoso de *Eryngium longifolium* Cav. a dosis tradicional y dosis tradicional elevada x10, no presenta efecto hipoglucemiante en ratas con hiperglucemia moderada STZ-NA.
  
- Ha1: La administración aguda por vía oral del extracto acuoso de *Eryngium longifolium* Cav. a dosis tradicional y dosis tradicional elevada x10, presenta un efecto hipoglucemiante en ratas con hiperglucemia moderada STZ-NA.
  
- Ho2: La administración aguda por vía oral del extracto etanol-agua de *Eryngium longifolium* Cav. a dosis tradicional y dosis tradicional elevada x10, no presenta efecto hipoglucemiante en ratas con hiperglucemia moderada STZ-NA.
  
- Ha2: La administración aguda por vía oral del extracto etanol-agua de *Eryngium longifolium* Cav. a dosis tradicional y dosis tradicional elevada x10, presenta un efecto hipoglucemiante en ratas con hiperglucemia moderada STZ-NA.



## 6. MÉTODO

### 6.1 Colecta de *Eryngium longifolium* Cav.

Tomando en cuenta que los pacientes que utilizan *E. longifolium* la adquieren en el mercado de Huejutla, el material vegetal se encargó a los vendedores del mercado para asegurar que la planta estuviera completa (Figura. 7). Su compra se llevó a cabo a finales del mes de octubre del 2012, teniendo el número de colecta 225.

Con el material vegetal obtenido, tres de ellos se destinaron como ejemplares de herbario y se encuentran depositados en; el Herbario Nacional de México (MEXU) con el número de registro 1396849, el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM), con el número de registro 16170 y el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME), con el número de registro 148397, este último ejemplar se utilizó para su determinación taxonómica por el M. en C. Ramiro Cruz Durán del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias.



**Figura.7** Fotografía dentro del mercado de Huejutla local No. 87 (Huejutla, Hgo., Noviembre 2014, G. Pérez).



En el Laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM, el material vegetal colectado, se limpió y se seleccionó. Posteriormente las hojas y raíces de *E. longifolium* se molieron en un molino MF 10 basic IKA® y se almacenaron a temperatura ambiente.

## **6.2 Elaboración de extractos de *Eryngium longifolium* Cav.**

### **6.2.1 Extracto acuoso**

Retomando el modo de preparación tradicional, se pesaron 20 g de la planta *E. longifolium*, previamente molidos y se agregaron a 500 mL de agua hirviendo, esto se agitó durante 15 minutos. A continuación, se dejó enfriar para filtrarlo al vacío con diatomita J.T. Baker®, una vez filtrado se colocó por 24 horas en un ultracongelador REVCO®, a una temperatura de -40°C. Por último, se colocó en una liofilizadora LABCONCO® Freezone 2.5, aproximadamente por 24 horas.

### **6.2.2 Extracto etanol-agua**

Se pesaron 20 g de la planta molida y se adicionaron a 500 mL de etanol-agua destilada, en una proporción 50:50. Esta preparación se calentó a una temperatura de 35°C y se mantuvo en agitación, por aproximadamente 4 horas. A continuación, se filtró al vacío con diatomita J.T. Baker®, con el precipitado se repitió el proceso. El extracto se colocó en el rotavapor Büchi® para extraer el etanol. Posteriormente se colocó en un ultracongelador REVCO® por 24 horas, a una temperatura de -40°C. Para finalizar el procedimiento, se liofilizó por 24 horas.

## **6.3 Cálculo DER**

El DER (Drug extract ratio) es necesario para la determinación de una preparación a base de hierbas. Este término se refiere a la relación de la masa del material vegetal inicial (droga herbal) a partir de la masa del extracto resultante (preparación herbal) (Ecuación. 1).



La cantidad, composición y DER de un extracto, se ven influenciadas por lo siguiente: sustancia vegetal, solvente de extracción y procedimiento (Vlietinck *et al.*, 2009).

$$DER = \frac{\text{droga herbal (g)}}{\text{preparación herbal (g)}} = x:1$$

**Ecuación. 1** Fórmula para la obtención del DER

#### **6.4 Dosis del extracto de *Eryngium longifolium* Cav.**

La dosis se estandarizo por el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se considera que una persona con un peso de 70 kg toma al día el extracto acuoso con una cantidad de 20 g de planta. La dosis obtenida del extracto acuoso fue de 0.03 g/kg y la dosis elevada fue de 0.310 g/kg. En cuanto al extracto etanol-agua la dosis fue de 0.032 g/kg y la dosis elevada fue 0.318 g/kg. Dichas dosis se calcularon para el peso de una rata. Ambos extractos se diluyeron en 1.5 ml de solución fisiológica (Tabla. 3).

#### **6.5 Dosis de glibenclamida**

La dosis administrada de Gli fue de 5 mg/kg (Li *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2012).en 1.5 mL de solución fisiológica.

#### **6.6 Animales experimentales.**

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, por cada grupo experimental se utilizaron 11 ratas de ambos sexos, con una edad aproximada de dos meses y un peso de 200g. Las cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en una zona especial asignada al laboratorio de Etnofarmacología.



Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas, a una temperatura de 25°C, con 55% humedad y con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Dentro de dicha área, se cuenta con anaqueles, en los cuales se acomodaron cajas de acrílico con tapas de rejilla de acero inoxidable, en ellas se agruparon a los animales de acuerdo a su sexo y se etiquetaron adecuadamente, además a cada caja se le colocaba diariamente una cama de aserrín, un bebedero y 10 nutricubos Harlan® por rata. El aseo de esta área se realizó por el grupo de trabajo del Laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias.

### 6.7 Inducción de hiperglucemia moderada por STZ-NA.

Para la inducción de una hiperglucemia moderada en ratas, se utilizó el modelo STZ-NA, propuesto por Masiello *et al.* en 1998, con algunas adecuaciones. Un día antes de la inyección se preparó la STZ, se disolvió en un buffer de acetatos (acetato de sodio + ácido acético) con un pH de 4.5 y se dejó reposar por un día. En tanto que la NA, se disolvió el mismo día de la inducción en 2 mL/kg de solución fisiológica. Se utilizaron ratas con un peso aproximado de 200-250 g, antes de llevar a cabo la inducción, se dejaron en ayuno por



**Figura. 8** Fotografía de la administración vía intraperitoneal de NA 150 mg/kg (Laboratorio de Etnofarmacología, Agosto, 2013, G. Pérez)



un periodo de 12 horas. A estas ratas se les administró vía intraperitoneal 150 mg/kg de NA (Figura. 8) y 15 minutos más tarde se les administró 65 mg/kg de STZ vía intravenosa, en la vena caudal (Figura. 9).

Se mantuvieron en observación por un lapso aproximado de una hora y fueron trasladadas nuevamente al bioterio. Pasados dos días de la inducción con los fármacos, se midieron los niveles de glucosa, para llevar un control sobre la respuesta a la inducción. Una semana después de la inyección, los valores eran estables.



**Figura. 9** Fotografía de la administración vía intravenosa de STZ 65 mg/kg (Laboratorio de Etnofarmacología, Agosto, 2013, G. Pérez)

## 6.8 Medición de glucosa

Se realizó un corte en la punta de la cola de la rata y de la vena caudal se extrajo una gota de sangre, la cual se depositó en una tira reactiva Accutrend® Glucose y se colocó en un glucómetro Accutrend® Plus. Cada prueba se realizó por duplicado, cada medición se llevó a cabo en los tiempos 0, 60, 120 y 180 minutos.



## 6.9 Diseño experimental

Se crearon siete grupos a los cuales se les administró oralmente distintos tratamientos. En los grupos CN y CH, la medición de glucosa se tomó en el tiempo 0 min, posteriormente se les administró vía oral 1.5 mL de solución fisiológica, mediante una cánula esofágica y una jeringa. Y como se describió con anterioridad las mediciones de glucosa se tomaron en los tiempos 0, 60, 120 y 180 minutos.

Para el grupo HG se realizó el mismo procedimiento sin embargo, se administró el fármaco a una dosis de 5mg/kg por rata diluido en 1.5 mL de solución fisiológica.

En los grupos HAT, HAE, HEAT y HEAE se midió la glucosa en el tiempo 0, después se les administró vía oral 1.5 mL de solución fisiológica, más la cantidad correspondiente de extracto para cada grupo, como se muestra en la Tabla. 3.

**Tabla. 3** Diseño experimental

<b>Grupo control</b>	<b>Tratamiento</b>
Control No Hiperglucémico (CN)	Solución fisiológica 1.5 mL
Control Hiperglucémico (CH)	Solución fisiológica 1.5 mL
Hiperglucémico más Glibenclamida (HG)	5mg/kg glibenclamida
<b>Grupo experimental</b>	<b>Tratamiento</b>
Hiperglucémico administrado con Extracto Acuoso a una dosis Tradicional (HAT)	30 mg/kg
Hiperglucémico administrado con Extracto Acuoso a una dosis Elevada (HAE)	310 mg/kg
Extracto Etanol-Agua a una dosis Tradicional (HEAT)	32 mg/kg
Extracto Etanol-Agua a una dosis Elevada (HEAE)	318 mg/kg





## 6.10 Análisis estadístico

Con Microsoft Office Excel 2007 y el programa GraphPad Prism versión 6.01, se realizaron los cálculos de media aritmética, varianza, desviación estándar y una prueba de ANOVA de dos vías y *post-hoc* de Tuckey, tomando como nivel de significancia estadística el valor  $p \leq 0.05$ . Se realizó una comparación entre los grupos control y los experimentales, para determinar si existían diferencias significativas.

Se graficaron las medias de la glucosa plasmática en los cuatro tiempos (0, 60, 120 y 180 minutos).

## 6.11 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina

Basados en el método de Wagner & Bladt 2001, con ciertas modificaciones por el equipo de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias UNAM, se realizó CCF con el fin de detectar los metabolitos presentes en *E. longifolium*, para los extractos acuoso y etanol-agua. De los ambos extractos se pesaron 20 mg y se disolvieron en 1 mL de metanol para H L C, en el caso del extracto acuoso se agregaron 00  $\mu$ L de agua y para el etanol-agua se agregaron 200  $\mu$ L. Para la fase estacionaria se usaron placas de TLC sílica gel 60 F<sub>254</sub>, de 6cm de largo por 4cm de ancho. Mientras que la fase móvil se colocó en cámaras de vidrio para CCF y los disolventes utilizados variaban de polaridad de acuerdo a lo requerido (Tabla. 4).

Para determinar la presencia de los metabolitos de interés (compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides) se determinó el R<sub>f</sub> (frente de referencia) de los compuestos observados mediante la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia (cm) recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia (cm) recorrida por la fase móvil}}$$

**Ecuación. 2** Fórmula para obtener R<sub>f</sub>

**Tabla.4** CCF para detección de metabolitos secundarios

CCF	Control	Extracto	Fase móvil	Revelador
Compuestos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rutina 1 mg/mL de metanol.</li> <li>Quercetina 0.5 mg/mL de metanol.</li> <li>Ácido clorogénico 1mg/1mL de metanol.</li> <li>e le aplicó 1 µL de cada control.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>e aplicaron 5 µL de cada extracto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Acetato de etilo:Ácido fórmico:Ácido acético:Agua (10: 1.1: 1.1: 2.6 v/v)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido difenilbourínico (Bourín en una disolución de 1 000 mg/100 mL metanol).</li> <li>e observó con lámpara de luz UV CAMAG® a -365nm</li> </ul>
Terpenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>limonol 1 mg/mL de metanol.</li> <li>e aplicó 1 µL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>e aplicaron 2.5 µL de cada extracto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hexano:Acetato de etilo (8.5: 1.5 v/v)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vainillina 1 000 mg/100 mL de ácido sulfúrico al 100%.</li> <li>e le aplicó calor con una parrilla, por aproximadamente 3 minutos.</li> </ul>
Glicósidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucosa 1 mg/mL de metanol.</li> <li>acarosa 1 mg/mL de metanol.</li> <li>e aplicó 2 µL de cada control.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>e aplicaron 5 µL de cada extracto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ropanol:Acetato de etilo:Agua:Ácido acético (4:3:2:1 v/v)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sulfato cérico (22 mL de ácido sulfúrico, 350 g de hielo y 16 g de sulfato cérico).</li> <li>e le aplicó calor con una parrilla, por aproximadamente 3 minutos.</li> </ul>
Alcaloides	<ul style="list-style-type: none"> <li>Quinina 5 mg/mL de metanol.</li> <li>e aplicó 1 µL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>e aplicaron 2.5 µL de cada extracto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diclorometano:Metanol Hidróxido de amonio al 25% (8.5:1.4:0.1 v/v)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>solución Drangendorff 1 (0.85 g de nitrato de bismuto básico en 40 mL de agua destilada y 10 ml de ácido acético al 99%).</li> <li>solución Drangendorff 2 (8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua).</li> </ul>

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Cálculo DER

Se realizó el cálculo para ambos extractos, acuoso y etanol-agua de *E. longifolium*, el rendimiento se muestra en la (Tabla.5). De ambos extractos se necesitaron 9 partes de la planta molida, para así poder obtener una parte de la preparación herbal. Lo cual se considera con un rendimiento óptimo al no ser necesarias más partes.

**Tabla.5** Rendimiento DER de extracto acuoso y etanol-agua de *E. longifolium*

Extracto	Droga herbal (g)	Preparación herbal (g)	Rendimiento (DER)
Acuoso	20	2.18	9:1
Etanol-agua	20	2.228	9:1



Enseguida se muestran los resultados obtenidos de las pruebas farmacológicas. De primera instancia tenemos que las pruebas realizadas directamente sobre el modelo STZ-NA, permitieron la obtención de grupos con hiperglucemia crónica moderada, ya que en ninguno de los grupos hiperglucémicos, al comparar sus tiempos cero (T0), se obtiene diferencia significativa.

## 7.2 Pruebas farmacológicas

Las medias obtenidas de los grupos control; CN, CH, HG y los grupos experimentales; HAT, HAE, HEAT, HEAE se observan en la Tabla. 6 igualmente se indican aquellos valores que son estadísticamente significativos respecto a; su tiempo cero (T0) y al grupo Control Hiperglucémico (CH), a una  $p \leq 0.05$ .

**Tabla.6** Efecto agudo del extracto acuoso y etanol-agua de *E. longifolium* Cav. en los niveles de glucosa plasmática (mg/dL) en los tiempos 0, 60, 120 y 180. n=11 ratas por grupo. Cada valor muestra la media  $\pm$  EE. <sup>(a)</sup> Diferencia significativa respecto a su T0, <sup>(b)</sup> diferencia significativa contra CH.  $p \leq 0.05$  (AN VA).

Grupo	T0	T60	T120	T180
CN	119 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	121 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	121 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	122 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
CH	201 $\pm$ 7	194 $\pm$ 6	189 $\pm$ 7	189 $\pm$ 7
HG	203 $\pm$ 8	150 $\pm$ 12 <sup>a b</sup>	116 $\pm$ 5 <sup>a b</sup>	112 $\pm$ 6 <sup>a b</sup>
HAT	202 $\pm$ 8	174 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	154 $\pm$ 5 <sup>a b</sup>	150 $\pm$ 4 <sup>a b</sup>
HAE	203 $\pm$ 8	164 $\pm$ 8 <sup>a b</sup>	138 $\pm$ 4 <sup>a b</sup>	141 $\pm$ 7 <sup>a b</sup>
HEAT	186 $\pm$ 5	157 $\pm$ 5 <sup>a b</sup>	142 $\pm$ 3 <sup>a b</sup>	125 $\pm$ 4 <sup>a b</sup>
HEAE	192 $\pm$ 2	152 $\pm$ 3 <sup>a b</sup>	138 $\pm$ 2 <sup>a b</sup>	132 $\pm$ 3 <sup>a b</sup>

- Grupo Control No Hiperglucémico (CN): Tiene una diferencia significativa respecto al grupo Control Hiperglucémico (CH) a partir del T0, también en la Figura. 10 observamos que ambos grupos poseen un comportamiento casi lineal, a lo largo de sus tiempos (T0, T60, T120 y T180), con lo cual se refleja que efectivamente las ratas del grupo CH, cuentan con una glucemia elevada y esta se mantiene a lo largo del tiempo.



- Grupo Hiperglucémico más Glibenclamida (HG): Presenta diferencias significativas en relación al grupo CH, a partir de su T60 y se mantiene hasta el T180 (Tabla. 6 y Figura. 10). Además se percibe que a partir del T60 muestra diferencia significativa al compararse con su propio T0 y se mantiene hasta su T180. Esto nos indica que el efecto del fármaco en cuestión cumple con el objetivo, disminuyendo la glucosa plasmática en sangre en el modelo STZ-NA, que de acuerdo con Massiello *et al.* (1998) se obtiene una respuesta similar al de la tolbutamida, debido a que ambos fármacos son SU, secretagogos de insulina. Las SU se consideran fármacos de primera elección para el tratamiento de la DM2. En un estudio del modelo STZ-NA realizado por Amaya-Chávez *et al.* (2007) se menciona que la Gli aumenta la secreción de insulina y también se señala que tiene una absorción rápida. Por tales razones es que se seleccionó la Gli, como fármaco para el grupo control.
- Grupo Hiperglucémico con extracto acuoso dosis tradicional (HAT): Posee una diferencia significativa al compararlo con su propio T0 contra los tiempos (60, 120 y 180). Asimismo, al compararlo contra el grupo CH, indica que hay diferencia significativa a partir del T120 y se mantiene hasta el T180 (Tabla. 6).
- Grupo Hiperglucémico con extracto Acuoso dosis Elevada (HAE): Hay una diferencia significativa respecto a su T0 en todos los tiempos y contra el grupo CH a partir del T60 y se mantiene hasta el T180 (Tabla. 6).

No existen diferencias significativas al comparar los grupos (HAT y HAE): En ninguno de sus tiempos por lo tanto, el efecto no depende de la dosis administrada.

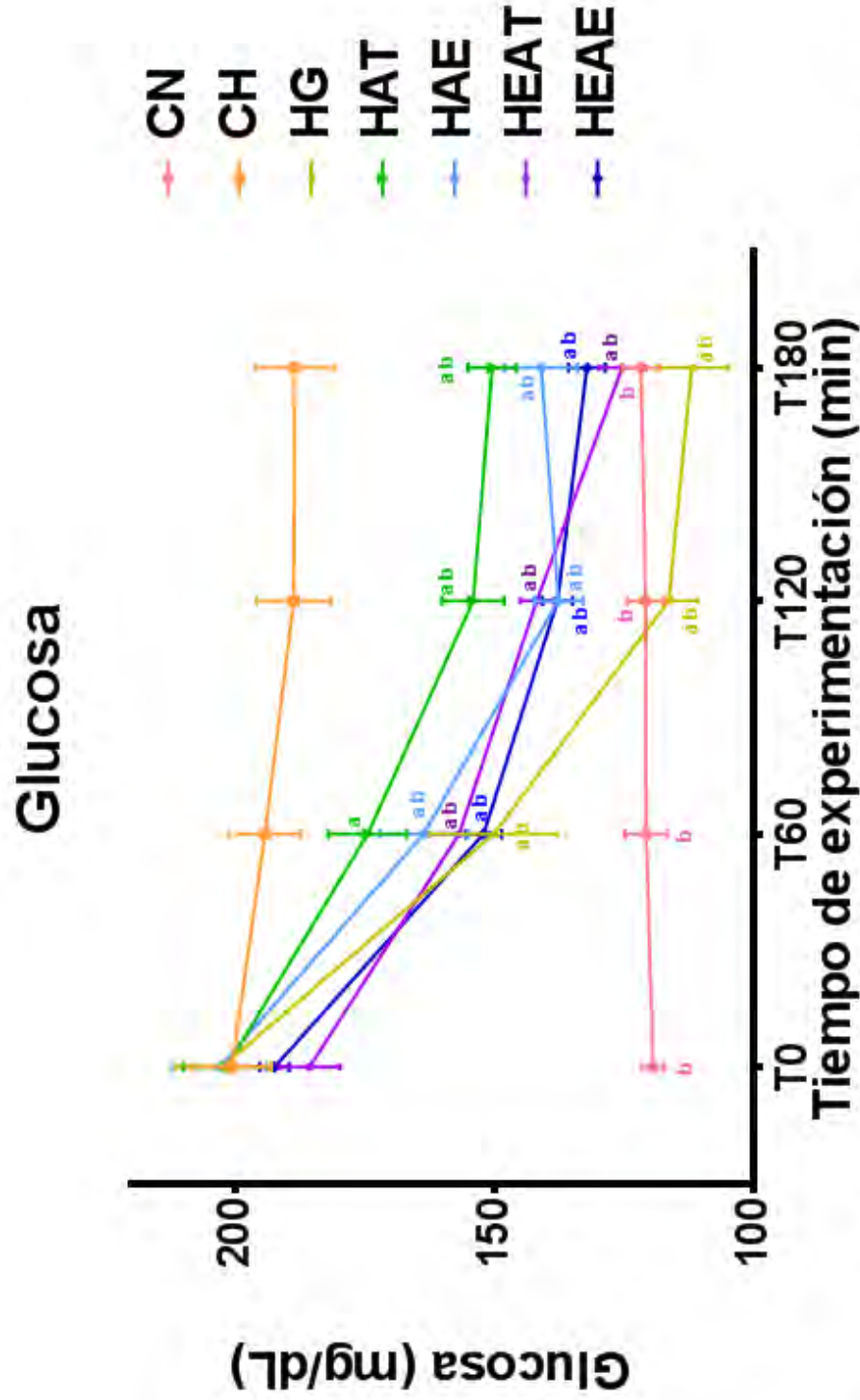


Figura.10 Efecto agudo del extracto acuoso y etanol-agua de *E. longifolium* Cav. en los niveles de glucosa plasmática (mg/dL) en los tiempos (0, 60, 120 y 180). n=11 ratas por grupo. Cada valor muestra la media  $\pm$  EE. (<sup>a</sup>) Diferencia significativa respecto a su T0, (<sup>b</sup>) diferencia significativa contra CH.  $p \leq 0.05$  (ANOVA).



- Grupo Hiperglucémico con extracto Etanol agua dosis tradicional (HEA) : presenta diferencias significativas a partir del T60 y se mantiene hasta el T180, al ser comparado con su T0. Al mismo tiempo hay diferencia significativa con el grupo CH, en los T60, T120 y T180.
- Grupo Hiperglucémico con extracto Etanol agua dosis Elevada (HEAE): Al contrastarlo contra su T0, expone diferencias significativas desde el T60 y hasta T180. De la misma forma, cuando se compara con el grupo CH, presenta diferencias a partir del T60 y se mantienen hasta el T180 (Figura.10).

Al comparar ambos grupos HEAT y HEAE no se obtienen diferencias significativas en ninguno de sus tiempos, nuevamente comprobamos que no hay un efecto dosis dependiente.

Se observa entonces que en los grupos experimentales STZ-NA, administrados de manera aguda con los extractos de *E. longifolium*, se presenta un efecto hipoglucemiante, ya que al comparar sus respectivos tiempos cero contra los T60, T120, y T180, se obtienen diferencias significativas al igual que contra el grupo CH y apreciamos que el tiempo de acción de los grupos HAE, HEAT, HEAE inicia en el T60, mientras que en el grupo HAT inicia en el T120.

En la actualidad ha surgido la necesidad de verificar la eficacia de las plantas medicinales, esto debido a la alta demanda del sector salud por encontrar nuevos fármacos o bien buscar tratamientos paliativos, que mitiguen los daños ocasionados por algunas enfermedades de alto riesgo. La etnofarmacología es una disciplina que ha generado diversos avances y que ha permitido comprobar las acciones terapéuticas de las plantas medicinales. Como bien se mencionó, nuestro país cuenta con un gran conocimiento sobre remedios y plantas utilizados por los indígenas mexicanos. En el caso específico de las plantas utilizadas para el tratamiento de la diabetes encontramos que al analizar el efecto hipoglucemiante agudo de *E. longifolium* sobre el modelo STZ-NA, se obtienen resultados favorables. También es



importante mencionar el rol del modelo animal en este proyecto, ya que es indispensable para realizar las pruebas terapéuticas y para las fases iniciales de una investigación. Por ello debe tomarse en cuenta la bioética, que asegura el bienestar de los animales, así se obtienen resultados más fiables y a su vez se disminuye la cantidad de experimentos a realizar (Rodríguez-Yunta, 2007).

Con la finalidad de poder determinar aquellos metabolitos secundarios, que podrían estar implicados en el efecto hipoglucemiante de *E. longifolium*, en el modelo STZ-NA, se realizaron una serie de pruebas de CCF, las cuales se describirán a continuación.

### 7.3 Pruebas fitoquímicas

Los resultados obtenidos de las cromatografías en capa fina se encuentran en la Tabla. 7 y se muestran las fotografías de cada prueba realizada, en donde se aprecia la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios (Figura.11 a la Figura. 14).

*E. longifolium*, no cuenta con ningún estudio fitoquímico previo sin embargo, existen estudios fitoquímicos realizados sobre el genero *Eryngium*, los cuales señalan que este se conoce por contener compuestos fenólicos como los flavonoides principalmente en forma de flavonoles y flavonas (Abdulmanea *et al.*, 2012), flavonoides glicosilados (quercetina) (Hosein *et al.*, 2013) y las cumarinas; esteroides; acetilenos (poliacetilenos); terpenos como triterpenoides, sesquiterpenos y glicósidos monoterpénicos; glicósidos triterpénicos como saponinas triterpénicas (Muckensturm *et al.*, 2010; Küpeli *et al.*, 2012; Morales-Marin, 2012; Wang, 2012; Aslan *et al.*, 2015). A nivel de familia (Apiaceae) y de género existen diversos estudios en modelos con murinos, que respaldan la actividad hipoglucemiante de algunas especies, las cuales actúan reduciendo significativamente la concentración de glucosa en la sangre, al ser administradas por vía oral (Wang, 2012). Otras tienen una actividad hepatoprotectora debido a su actividad antioxidante (Hosein *et al.*, 2013).

**Tabla. 7** Metabolitos secundarios detectados por CCF en extracto acuoso y etanol-agua de *E.longifolium*

Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto etanol-agua
Compuestos fenólicos	+	+
Terpenos	+	+
Glicosidos	+	+
Alcaloides	-	-

(+) metabolitos detectados (-) metabolitos no detectados

**CCF para detección de compuestos fenólicos**

En la Figura. 11 se observa en el extracto acuoso franjas de tonalidades azul-verde, asimismo en el extracto etanol-agua hay bandas azul-verdes y otra de tonos amarillo-naranjas. Wagner & Blad en 2001, reportan que estas coloraciones indican presencia de flavonoides y flavonoides glicosilados. En ambos extractos se observa una banda similar a la que presenta el control del ácido clorogénico (Tabla.8).

En investigaciones anteriores, se comprobó que estos compuestos tienen un efecto hipoglucemiante como la rutina, la isoquercitrina (Navarro, 2004), la quercetina y la estructura básica de las flavonas (Torres- Piedra *et al.*, 2010). También existen estudios en los cuales se reporta que los glucósidos de flavona, tienen propiedades antioxidantes y efecto hipolipidémico (Mc Cune, 2002; Merina *et al.*, 2010). Por otra parte, en estudios realizados en un modelo con ratas se encontró que el ácido clorogénico es un inhibidor específico de la glucosa-6-fosfatasa, por ende inhibe la producción de glucosa hepática (Hemmerle *et al.*, 1997; Reyes, 2014).

De acuerdo con el resultado obtenido, este indica la presencia de ácido clorogénico en el extracto acuoso (A) y etanol-agua (Et-A), el cual puede estar implicado en el efecto hipoglucemiante. Sin embargo, se requiere analizar los distintos compuestos fenólicos y

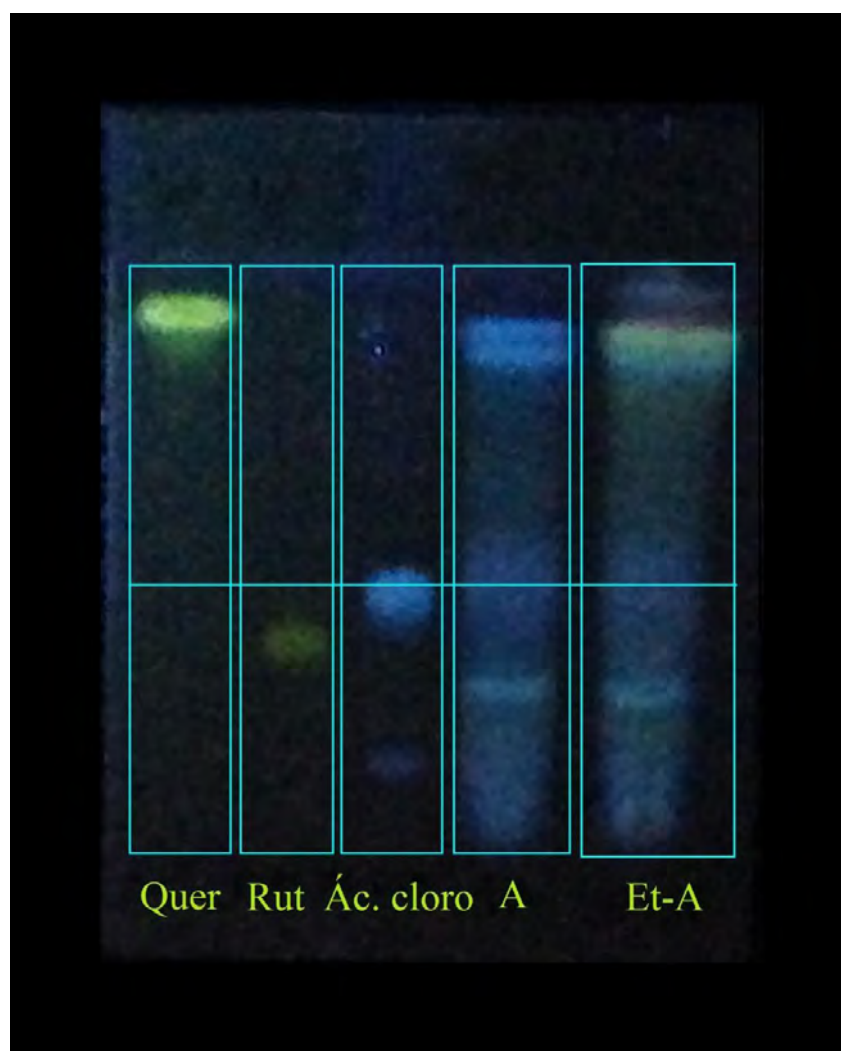




flavonoides observados en la CCF, para determinar si estos también están implicados en el efecto hipoglucemiante de *E. longifolium*.

**Tabla. 8** Comparación de Rf en compuestos fenólicos

Control/Extracto	Ác. cloro	A	Et-A
Rf	0.36	0.37	0.38



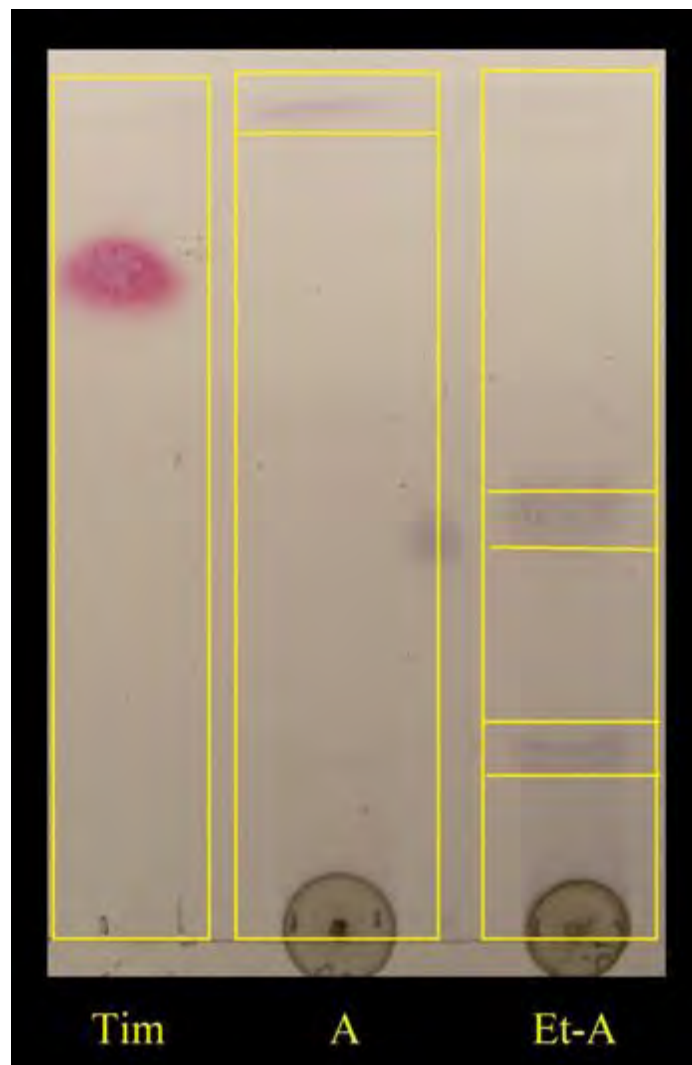
**Fig.11** Foto de la placa de CCF para detección de compuestos fenólicos: Quercetina (Quer 1  $\mu$ L, rutina (Rut 1  $\mu$ L, ácido clorogénico (Ác. Cloro 1  $\mu$ L, e t racto acuoso (A 5  $\mu$ L y e t racto etanol-agua (Et-A) 5  $\mu$ L. Fase móvil acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (10: 1.1: 1.1: 2.6 v/v). Observado bajo de luz UV -365nm. En ambos extractos se observa la presencia de un compuesto fenólico similar al ácido clorogénico (Rf= 0.36).



### Placa de CCF para detección de terpenos

En la CCF para detección de terpenos en *E. longifolium*, observamos que el extracto acuoso sólo presenta una banda de color rosa, en tanto que el extracto etanol-agua presenta dos bandas de una coloración violeta (Figura. 12). La aparición de coloraciones verde-azul a rojo-violeta para esta prueba, dan positivo a la presencia de dichos metabolitos en la muestra (Sorza *et al.*, 2009, Mora *et al.*, 2012).

La presencia de terpenos indica que pueden estar involucrados en el efecto hipoglucemiante de *E. longifolium*. Lamba *et al.*, en 2000, reportaron que los terpenos disminuyen los niveles de glucosa. Además, se han reportado compuestos de peso molecular bajo, como los monoterpenos que cuentan con fuertes propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes (Mishra *et al.*, 2011). Se tiene registro de que diversos triterpenos como; glucósidos sesquiterpénicos, triterpenoides polihidroxilados, triterpenos glucosilados, también tiene un potencial hipoglucemiante, hipolipidémico y antioxidante elevado (Khan *et al.*, 2012).

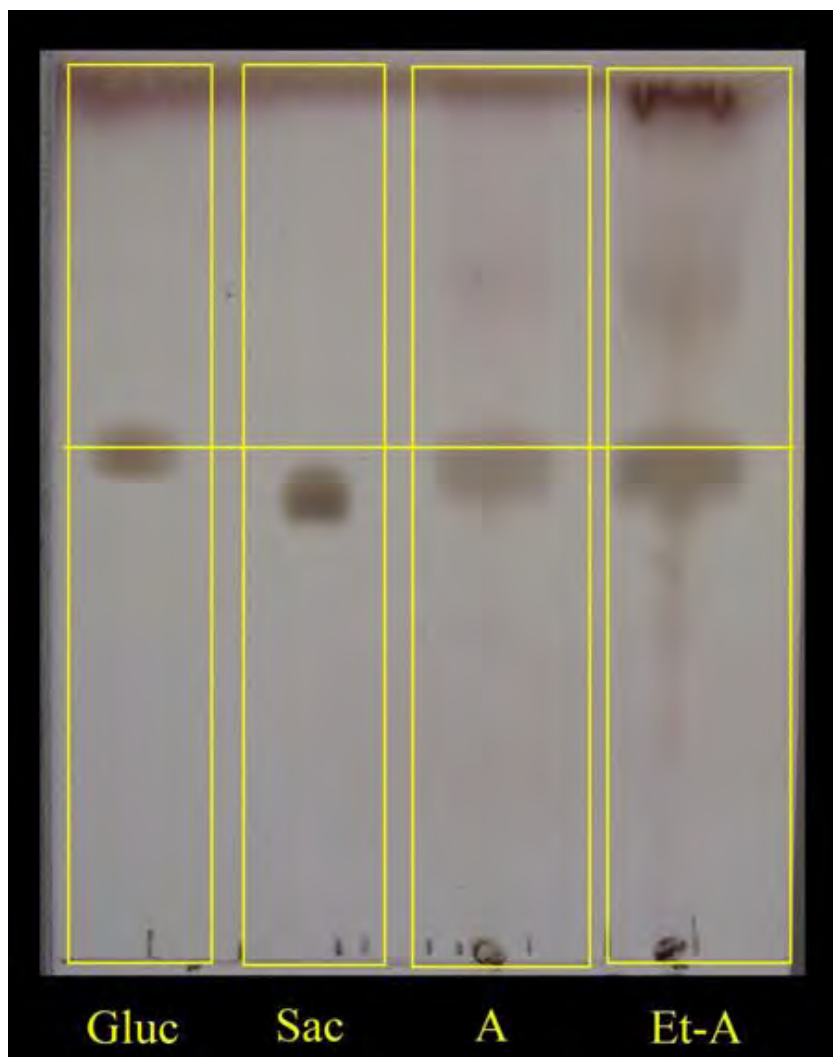


**Figura.12** Foto de la placa de CCF para detección de terpenos: Timol (Tim) 1  $\mu$ L, e t racto acuoso (A y e t racto etanol-agua (Et-A) 2.5  $\mu$ L. Fase móvil he a no: acetato de etilo (8.5: 1.5 v/v). Se observan bandas de terpenos en A y Et-A.



### Placa de CCF para detección de glicósidos

Se denota la presencia de glicósidos (Figura. 13), en el extracto acuoso y el extracto etanol-agua se visualizan bandas muy similares a las de los controles utilizados (glucosa y sacarosa). Pérez *et al.*, en 1998 reportaron glicósidos con actividad hipoglucemiante a una dosis de 1-5 mg/kg. En otros estudios se mencionan compuestos de glicósidos esteroides como;  $\beta$ -sitosterol-D-glucósido y 5,25-estigmastadieno-3- $\beta$ -ol-D-glucósido, que tienen una actividad hipoglucemiante, indicaron que mejora significativamente la toma de glucosa en el tejido muscular y la acumulación de glucógeno en el músculo y el tejido hepático. Se sabe que ciertos



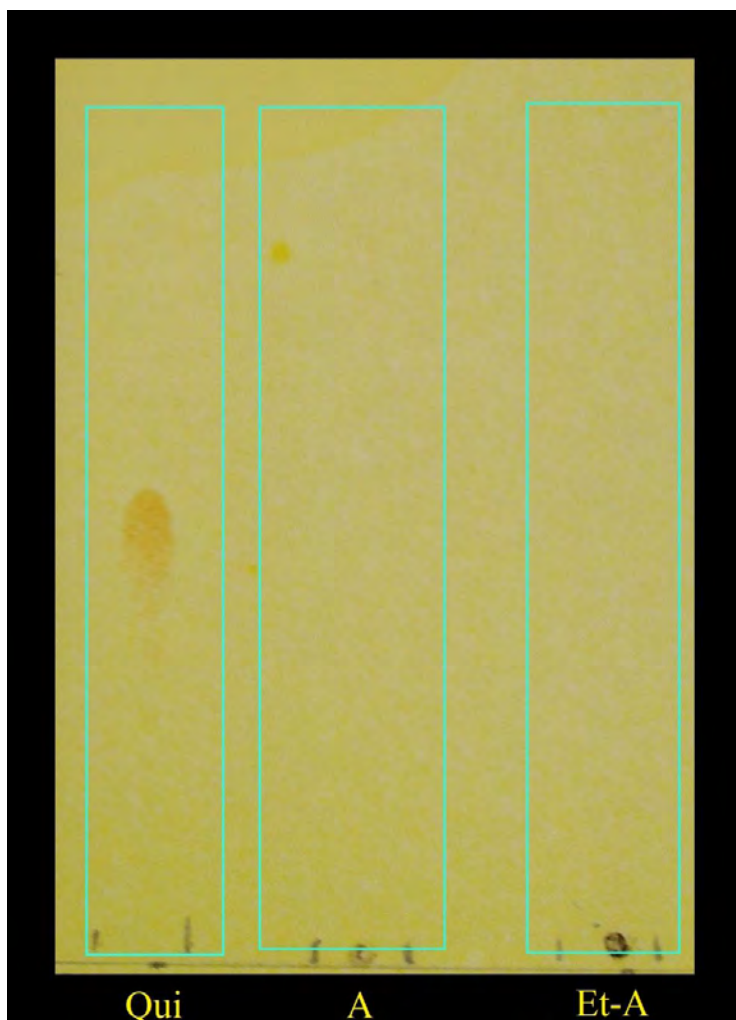
**Fig. 13** Foto de la placa de CCF para detección de glicósidos: Glucosa (Gluc) y sacarosa (Sac) 2  $\mu$ L, Extracto A y Et-A 5  $\mu$ L. Fase móvil propanol: acetato de etilo: agua: ácido acético (4:3:2:1 v/v). Se aprecia la presencia de glicósidos en ambos extractos.

constituyentes glicosídicos, inhiben las  $\alpha$ -glucosidasas. Algunos glicósidos de esteroles, inhiben la lipólisis y suprimen la lipogénesis estimulada por insulina, mientras que otros estimulan la liberación de insulina de los islotes (Marles & Farnsworth, 1995). Kadir *et al.* 2012, de igual manera atribuyen efectos hipoglucemiantes a este tipo de metabolitos.



### Placa de CCF para detección de alcaloides

Por último, la prueba de CCF para alcaloides, fue negativa en ambos extractos (Figura. 14).



**Figura.14** Foto de la placa de CCF para detección de alcaloides: Quinina (Qui) 1  $\mu$ L y 2.5  $\mu$ L de cada extracto. Fase móvil diclorometano: metanol: hidróxido de amonio al 25% (8.5:1.4:0.1 v/v). No se aprecian alcaloides para ninguno de los extractos.



Los metabolitos que frecuentemente están implicados en el efecto hipoglucemiante, son glucósidos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, carotenoides, entre otros (Patel *et al.*, 2012). Aunque los mecanismos de acción específicos mediante los cuales actúan ciertos compuestos de las plantas hipoglucemiantes empleados para el tratamiento de la DM2 aún se desconocen, en distintos estudios se han reportado que algunos extractos se caracterizan por incrementar los niveles de insulina circulatoria y aumentar la utilización periférica de glucosa (Jaghabir, 1991; Kadir *et al.*, 2012), mientras que otros actúan disminuyendo la absorción intestinal (Afifi, 1997).

En este trabajo realizado con piñuela, se puede inferir que el efecto hipoglucemiante de los extractos acuoso y etanol-agua, se debe a la presencia de compuestos fenólicos, terpenos y glicósidos. Puede ser que el efecto se deba a uno de ellos o bien a que actúan en conjunto. Fleurentin & Pelt, en 1990, mencionan que no siempre se puede atribuir a solo uno de los principios activos de una planta medicinal el efecto, ya que generalmente este es el resultado de sinergias complejas que aparecen por asociación de diversas sustancias, que por sí solas no tienen ninguna actividad. Así pues se requieren más pruebas fitoquímicas que determinen con exactitud los metabolitos secundarios presentes en los extractos de la planta en cuestión y de la misma manera determinar si son estos los responsables del efecto observado en el modelo STZ-NA. Se necesita, profundizar más en los mecanismos de acción implicados en el efecto hipoglucemiante dado por dichos compuestos.

Ensayos futuros con esta u otras plantas reportadas con actividad hipoglucemiante pueden ser una fuente importante para la creación de nuevos compuestos farmacológicos para el tratamiento de la DM2 o bien para validar su uso como coadyuvantes. Además estos estudios permiten comprobar de manera científica la efectividad y seguridad del uso de plantas hipoglucemiantes por pacientes con M 2 (Castañeda *et al.*, 2008).



## 8. CONCLUSIONES

- El presente trabajo contribuye con los primeros reportes de farmacología y fitoquímica de *Eryngium longifolium* Cav.
- La administración aguda por vía oral del extracto acuoso y extracto etanol-agua de *Eryngium longifolium* Cav. a dosis tradicional y elevada presentaron efecto hipoglucemiante en ratas hiperglicémicas STZ-NA. Por ende esta planta se considera hipoglucemiante y el efecto no depende de la dosis administrada.
- El comportamiento de los extractos de *E. longifolium* Cav. a lo largo del tiempo tienen similitud con el fármaco control (glibenclamida) no obstante, es necesario realizar más pruebas de manera crónica y realizar más estudios para comprobar sus efectos y mecanismos de acción.
- Por medio de una prueba de CCF en ambos extractos se determinó la presencia de compuestos fenólicos, terpenos y glicósidos.

## 9. PERSPECTIVAS

- Caracterizar los compuestos químicos involucrados en el efecto de *E. longifolium* y realizar estudios que permitan dilucidar los mecanismos de acción por los cuales actúan, mediante modelos *in vivo* e *in vitro*.
- Realizar un experimento crónico del extracto acuoso y extracto etanol-agua, para evaluar el efecto hipoglucemiante.
- Realizar estudios de toxicidad crónica con los dos extractos, para poder determinar parámetros de seguridad.
- Implementar estrategias que permitan el aprovechamiento y conservación de *E. longifolium*.



## 10. Literatura citada

- Abdulmanea, K. Prokudina, E. *et al.* (2012). Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45: 237-243.
- Afifi, F. *et al.* (1997). Effect of *Varthemia iphionoides* on blood glucose level of normal rats and rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Current therapeutic research*, 58(11): 888-892.
- Alfaro, J. Simal, A. Botella, F. (2000). Tratamiento de la diabetes mellitus. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 24 (2): 33-43.
- Amaya-Chávez A. *et al.* (2007). Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicémica de la glibenclamida. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(3): 5-11.
- American Diabetes Association (ADA). (2005). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*, 28: 37-42.
- American Diabetes Association (ADA). (2014). Executive summary: standards of medical care in diabetes-2014. *Rev Diabetes care*, 37, Supplement 1: 14-80.
- Andrade-Cetto, A. & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 325-348.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 163-171.
- Andrade-Cetto, A. Heinrich, M. (2011). From the field into the lab: useful approaches to selecting species based on local knowledge. *Frontiers in Pharmacology*, 2: 1-5.
- Arias-Díaz, J. Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp*, 22(2):160-68.
- Arredondo, A. & De Icaza, E. (2011). Costos de la Diabetes en América Latina: Evidencias del Caso Mexicano. *Value in health*, 14: 85-88.
- Arumugam, G. Manjula, P. Paari, N. (2013). A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease*: 196-200.
- Aslan, S. Mitaine-Offer, A. *et al.*, (2015). Triterpene saponins from *Eryngium kotschyi*. *Phytochemistry*, 110: 160-165.



- Ávalos- García, A. Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3): 119-145.
- Beltran, L. Ortiz, A. Mariano, N. Maldonado, B. Reyes, V. (2014). Factors affecting ethnobotanical knowledge in a mestizo community of the Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10:14.
- Bertram, C.E. Hanson, M.A. (2001). Animal models and programming of the metabolic syndrome. *British Medical Bulletin*, 60: 103-121.
- Bourgaud, F., Gravot, A. Milesi, . Gontier, E. (2001). Reduction of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5): 839-851.
- Calviño, C.I. Martínez, S.G. Downie, S.R. (2008). The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 1129-1150.
- Castañeda, B. Castro de la Mata, R. *et al.* (200). Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglucemiante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(1): 6-34.
- Castro, C. Villa, N. *et al.* (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1):101-120.
- CHEM, Department of Chemistry:  
Fecha de consulta: Agosto 2015  
URL:[www.chem.wisc.edu/courses/342/Fall2004/TLC.pdf](http://www.chem.wisc.edu/courses/342/Fall2004/TLC.pdf) &  
<http://www.chem.umass.edu/~samal/269/tlc.pdf>
- Cheng, A.Y.Y & Fantus, I. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, 172 (2): 213-226.
- Cheng, S.C. Huang, M.Z. Shiea, J. (2011). Thin layer chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218: 2700-2711.
- Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Barcelona. Rev Esp Cardiol*, 55(5):528-35.
- Cruz-Domínguez, M.P. Montes Cortés, D.H. Zarate, A. *et al.*, (2014). Relationship of ghrelin, acid uric and proinflammatory adipocytokines in different degrees of obesity or diabetes. *Int J Clin Exp Med*, 7(5):1435-1441.
- DeFronzo, R. Ferrannini, E. *et al.*, (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews*, 1: 1-22.





- az, J.L. (1947). Plantas mágicas y sagradas de la medicina indígena de México. Etnofarmacología y psiquiatría experimental. Historia general de la medicina en México. Tomo I México Antiguo: 231-250.
- DiStefano, J.K. Watanabe, R.M. (2010). Pharmacogenetics of Anti-Diabetes Drugs. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(8): 2610-2646.
- Doyle, M.E. Egan, J.M. (2003). Pharmacological Agents That Directly Modulate Insulin Secretion. *Pharmacol Rev*, 55 (1): 105-131.
- Encyclopedia of Life  
Dirección Internet: <http://eol.org/>  
Fecha de consulta: Febrero, 2015.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). (2012). Resultados Nacionales. Cuernavaca, México, Instituto Nacional de Salud Pública (MX): 42-50.
- Escalante-Pulido, J.M. (2001). Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Actualidades Investigación en Salud, 3 (99): 57-61.
- Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes. (2013). Secretaría de Salud, IEPSA, Entidad paraestatal del Gobierno Federal.
- Fleurentin, J. Pelt, J.M. (1990). Las plantas medicinales. *Rev. Mundo Científico*, 185 (10): 927-934.
- Fröde, R. Medeiros, Y. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 173-183.
- García, E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27 (1): 1-12.
- García-Ruiz, I. (2013). Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*, 103: 65-118.
- Gispert, M. Gomez, A. Nuñez, A. (1988). La etnobotánica. *Ciencias Revista de difusión*: 59-63.
- Gómez-Pompa, A. (2004). Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Acta Biologica Panamensis*, 1: 87-100.
- Harcourt, B. E. et al. (2013). Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. *Nat. Rev. Endocrinol*, 9: 113-123.



- Heinrich, M. Ufer, J. Leonti, M. Ardo-de Santayana, M. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology - Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 157-160.
- Hemmerle, H. Burger, HJ. Below, . *et al.* (1997). Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: Novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J Med Chem*, 40(2):137-43.
- Hosein, M. Abbasabadi, Z. *et al.* (2013). Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *J Tradit Chin Med*, 33(6): 815-826.
- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. *C N AB Biodiversitas*, 12:1-7.
- International Diabetes Federation  
Dirección Internet: <http://www.idf.org/node/26452?language=es>  
Fecha de consulta: Octubre, 2014.
- International Diabetes Federation  
Dirección Internet: <http://www.idf.org/node/26452?language=es>  
Fecha de consulta: Octubre, 2015.
- International Diabetes Federation. (2015). IDF Diabetes Atlas Sixth edition: Dirección Internet: [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)
- Jaghabir, M. (1991). Hypoglycemic effects of *Eryngium creticum*. *Arch. Parma. Res*, 14(4): 295-297.
- Joshi, S. Parikh, R. Das, A. (2007). Insulin-History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *Supplement of JAPI*, 55: 19-25.
- Juárez-Vázquez, M. Carranza-Álvarez, C. *et al.* (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 148: 521-527.
- Adir, M. Ayeed, M. *et al.* (2012). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bangladeshi traditional health practitioners in the management of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 144: 605-611.
- Khan, Vasim. Alam Najmi, Abul. Akhtar, Mohd. *et al.* (2012). A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *Jornal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 4(1): 27-42.



- Üpeli, E. Kartal, M. *et al.* (2006). Comparative evaluation of the anti inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 32-37.
- Lamba, S. Buch, K. *et al.* (2000). Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21: 457-496.
- Leech, C. Dzhura, I. *et al.* (2011). Molecular physiology of glucagon-like peptide-1 insulin secretagogue action in pancreatic  $\beta$  cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107: 236-247.
- Li, Y. Wei, Y. *et al.* (2012). Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(2):198-204.
- Loc de Ugaz, . (1994). Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Pontificia Universidad Católica del Perú. Cap IV Manual de Fitoterapia: 41-63.
- Marles, R. & Farnsworth, N. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2 (2):37-189.
- Masiello, P. Broca, C. Gross, R. *et al.* (1998). Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered Streptozotocin and Nicotinamide. *Diabetes*, 47 (2): 224-229.
- Masiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic  $\beta$  cell mass. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 873-893.
- Mazzola, N. (2012). Review of Current and Emerging Therapies in Type 2 Diabetes Mellitus. *The American Journal of Managed Care*, 18(1): 17-26.
- Merina, A. Sivanesan, D. *et al.* (2010). Antioxidant and Hypolipidemic Effect of *Plumeria Rubra* L. in Alloxan Induced Hyperglycemic Rats. *E-Journal of Chemistry*, 7(1):1-5
- Mishra, . Verma, A. *et al.* (2011). Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med.*, 4(9):689-93.
- Muckensturm, B. Boulanger, A. *et al.* (2010). Secondary metabolites from *Eryngium* species. *Natural Product Research*, 24(5), 20: 391-397.



- McCune, L.M. Johns, T. (2002) Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 197-205.
- Morales-Marin, M.L. (2012). Interés terapéutico del eryngium (cardo corredor en oncología. *Rev Med Homeopat*, 5(1):18-21.
- Morales, R. (1996). Farmacología y farmacognosia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica. *Monograf. Jar. Bot. Córdoba*, 3:93-98.
- Navarro, M. Coussio, J. et al. (2004). Efecto Hipoglucemiante del Extracto Acuoso de *Phyllanthus sellowianus* ("sarand blanco" en Ratonés C57BL/ s. *Acta Farm. Bonaerense*, 23 (4): 520-3.
- Nolan, C. Damm, P. Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, 378: 169-81.
- Olivares, J. Arellano, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27 (1): 9-18.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud; (Documento de referencia <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js21201es/>).
- Organización Mundial de la Salud (OMS).2013.  
URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>  
Fecha de consulta: Junio, 2014.
- Organización Mundial de la Salud (OMS).2014.  
URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>  
Fecha de consulta: Octubre, 2014.
- Ortiz-Domínguez, M. Garrido-Latorre, F. et al. (2011). Sistema de Protección Social en Salud y calidad de la atención de hipertensión arterial y diabetes mellitus en centros de salud. *Salud Publica Mex*, 53: 436-444.
- Ortiz-Andrade, R. Torres-Piedra, M. et al. (2009). Acute and sub-chronic effects of *Cochlospermum vitifolium* in blood glucose levels in normoglycemic and STZ-Nicotinamide induced diabetic rats. *Rev.Latinoamer. Quím.*, 37(2): 122-132.
- Oubré, A. Carlson, T. et al. (1997). From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40: 614-617.



- Pagkalos, E. (2011) Combinations of insulin and oral hypoglycemic agents in diabetes mellitus type 2. *Diabetes research and clinical practice*, 93: 100-101.
- Palá, J. (2002). Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “*Eryngium*” L., en la península ibérica. Facultad de biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Pallab, D.G. & Amartya, D. (2012). Diabetes Mellitus and its Herbal Treatment *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3 (2): 706-721.
- Patel, D. Kumar, R. *et al.* (2012). Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(5): 411-420.
- Paz, S. González, D. *et al.* (2014). Principales factores asociados al coste de la diabetes mellitus tipo 2: revisión de la literatura. *Av Diabetol*, 30(2): 34-44.
- Pérez-Alonso, N. Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4): 195-211.
- Perez, R. Zavala, M. *et al.* (1998). Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicine*, 5(1): 55-75.
- Pothier, J. Galand, N. *et al.* (2001). Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco*, 56: 505-511.
- Ramírez, G. Zavala, M. *et al.* (2012). *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-6.
- Rai, A. Eapen, C. Prasanth, V. (2012). Interaction of Herbs and Glibenclamide: A Review. ISRN. *Pharmacology*: 1-5.
- Reich, E. Schibli, A. (2007). High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. *Ed. Thieme, New York*: 1-21.
- Reyes, G. (2014). Propuesta de un suplemento alimenticio a partir de ácidos clorogénicos como auxiliar en el control de peso y diabetes. Facultad de Química, UNAM.



- Rodríguez, R. Reynales, L. *et al.* (2010). Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo. *Rev Panam Salud Pública*, 28(6): 412-420.
- Rodríguez-Fragoso, L. Reyes-Esparza, J. *et al.* (2008). Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol*, 15, 227(1):125-135.
- Rodríguez-Yunta, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica*, 13 (1): 25-39.
- Roldán-Vences, A. Ojeda-Cruz, G. *et al.* (2011). Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54 (1): 28-40.
- Rorsman, P. Braun, M. *et al.* (2012). Regulation of calcium in pancreatic and cells in health and disease. *Cell Calcium*, 51: 300-308.
- Ruiz-Ramos, M. Escolar-Pujolar, A. *et al.* (2006). La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desiguales. *Gac Sanit*, 20 (Supl 1): 15-24.
- Samario, J. (2013). Efecto de la administración aguda de los extractos de *Cecropia obtusifolia* Bertol en la concentración plasmática de insulina en ratas NAD-STZ. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Salick, J. *et al.* (2003). Intellectual imperatives in ethnobiology. Missouri botanical garden. St Louis: 10.
- Sanabria, A. (1983). Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae: 61.
- Saric-Kundalic, B. Dobes, C. *et al.* (2011). Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east,north and north-east Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 1051-1076.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2011). Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Montreal Canadá. 26 pp. Disponible en:<http://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-es.pdf>
- Segal, C. Rodarte, B. (2011). Manual de Biotecnología. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México: 55.



- Sepúlveda-Jimenez, G. Porta-Ducoing, H. *et al.* (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3): 355-363.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. *CYTED. Colombia*: 161-163.
- Sistema Nacional de Salud (SNS). (2000). Tratamiento de la diabetes mellitus. 24 (2). URL: <http://www.msc.es/farmacia/infmedic>
- Simó, R. Hernández, C. (2002). Tratamiento de la diabetes mellitus: objetivos generales y manejo en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*, 55(8):845-60.
- Sorza, L. *et al.* (2009). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, Tecnología en Regencia de Farmacia: 1-34.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*, 237: 481-490.
- Stumvoll, M. Goldstein, B. *et al.* (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365: 1333-1346.
- Surya, S. Dhaliya, A. *et al.* (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pac J Trop Dis*, 4(5): 337-347.
- Tahara, A. Matsuyama-Yokono, A. *et al.* (2008). Hypoglycaemic Effects of Antidiabetic Drugs in Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Mildly Diabetic and Streptozotocin-Induced Severely Diabetic Rats. *Journal compilation Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103: 560-568.
- Tropicos  
URL: <http://www.tropicos.org/>  
Fecha de consulta: Febrero, 2015.
- Torres, M. Alons, G. *et al.* S/F. Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Zacatecas; 2 Universidad Autónoma de Querétaro.  
URL: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/10VeranoRegionCentro/34UAZAlonsoTorresIbarraMartinez.pdf>



- Torres-Piedra, M. Ortiz-Andrade, R. *et al.* (2010). A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *European journal of medicinal chemistry*, 45(6); 2606-2612.
- Triplitt, C. (2012). Examining the Mechanisms of Glucose Regulation. *The American Journal of Managed Care*, 1 (18): 4-10.
- Vilela, A. González-Paleo, L. *et al.* (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral*, 21: 317-327.
- Vlietinck, A. Pieters, L. *et al.* (2009). Legal Requirements for the Quality of Herbal Substances and Herbal Preparations for the Manufacturing of Herbal Medicinal Products in the European Union. *Planta Med*, 75: 683-688.
- Wagner, H. Bladt, S. *et al.* (1984). *Plant Drug Analysis*. Ed. Scott. Berlín: 320.
- Waldstein, A. (2006). Mexican migrant ethnopharmacology: Pharmacopoeia, classification of medicines and explanations of efficacy. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 299–310.
- Waller, D. (1993). Methods in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 38: 189-195.
- Wang, P. Su, Z. *et al.* (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 3: 99-120.
- Watanabe, K. Miyamoto, T. *et al.* (2012). Type 2 diabetes mellitus patients manifest characteristic spatial EMG potential distribution pattern during sustained isometric contraction. *Diabetes research and clinical practice*, 97: 468-473.
- Weckerlea, C. Cabrasb, S. *et al.* (2011). Quantitative methods in ethnobotany and ethnopharmacology: Considering the overall flora-Hypothesis testing for over- and underused plant families with the Bayesian approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 837-843.
- Zhang, Z. Liu, J. *et al.* (2014). Thin Layer Chromatography Coupled with Surface Enhanced Raman Scattering as a Facile Method for On-Site Quantitative Monitoring of Chemical Reactions. *American Chemical Society*: 1-21.