

T

1181

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

124215

1215



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO QUÍMICO Y ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE  
DE LA RAÍZ DE  
*Ibervillea sonorae* Greene**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**  
P R E S E N T A :  
**ERICA HERNÁNDEZ GALICIA**

**DIRECTORES:**

**DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR**

**DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO**

**ASESOR:**

**DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS**

**MÉXICO, D.F.**

**SEPTIEMBRE 2007**

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA PERTENECE AL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACyT Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO PFP-20-93.

AGRADEZCO AL CONACyT POR LA BECA ECONÓMICA, CON REGISTRO 172484, OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO DOCTORAL.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

ERICA HERNÁNDEZ GALICIA

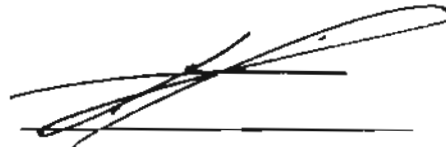
El día 13 de septiembre del 2007

Jurado:

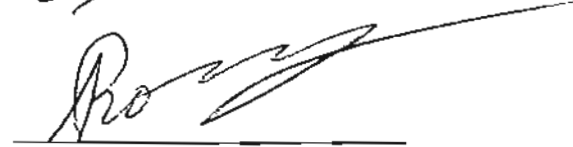
DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR



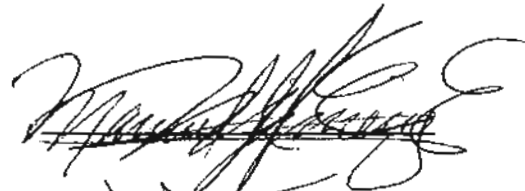
DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO



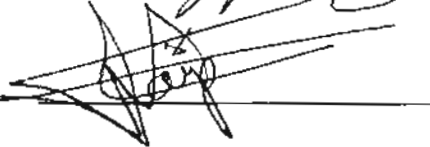
DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS



DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA



DR. ALFONSO EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA



COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORES DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

Investigador Titular B, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo  
XXI, IMSS. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

ASESOR

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD, DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA Y EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS NATURALES, UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a mis tutores Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y al Dr. Fernando Calzada Bermejo por la dirección de esta tesis, su dedicación y esfuerzo para el éxito de este trabajo.

Dr. Rubén Román Ramos por sus comentarios, sugerencias y por todo el apoyo que siempre me ha brindado. Gracias por creer en mí.

Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda por todos los conocimientos que compartió conmigo y por su valioso tiempo dedicado a este trabajo de tesis.

Dr. Manuel Jiménez Estrada por la revisión de esta tesis.

Bio. Exp. Laura Isabel Vázquez Carrillo y Laura Maricela García Vega, que con su apoyo fue posible la realización de este trabajo. A la M en C. Tania Banderas, por su apoyo en el manejo del paquete estadístico.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera hicieron posible la terminación de este trabajo de tesis y que no los mencione, gracias a todos.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Ernesto Hernández Cedillo y Silvia Galicia Buendía, por el apoyo incondicional para alcanzar todas mis metas. Gracias por estar siempre conmigo.

A mis hermanos Ernesto, Oscar, Silvia y Rafa porque estamos y seguiremos juntos.

A mi esposo Enrique Cruz García que me ha dado su apoyo y confianza para llegar a la meta propuesta.

A mis hijos Héctor y Emiliano, quienes alegran mi vida, dan razón a mi esfuerzo y me entregan siempre su cariño. Ellos son el principal motor de mi vida.

A mi familia por su cariño y apoyo que me han brindado en todo momento.



## ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE ANEXOS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de la Diabetes mellitus (DM)	1
1.2 Importancia, síntomas y complicaciones de la DM	1
1.3 Clasificación y causas de la DM	2
1.4 Tratamientos actuales de la DM	5
1.5 Alternativas en el control de la DM	7
1.6 Medicina tradicional y DM	8
1.7 Generalidades de <i>Ibervillea sonora</i>	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Fitoquímica	22
5.1.1 Material vegetal	22
5.1.2 Extracción	22
5.1.2.1 Preparación de los extractos de DCM, ME, A y LJ de la raíz de <i>I. sonora</i> en pequeña escala	22
5.1.2.2 Preparación del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonora</i> en gran escala	23
5.1.3 Estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM	24
5.1.3.1 Material cromatográfico	24
5.1.3.2 Fraccionamiento biodirigido	25
5.1.4 Caracterización de los compuestos aislados del estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonora</i>	27
5.1.4.1 Equipo utilizado para la caracterización estructural de los compuestos	27

5.1.4.1	Equipo utilizado para la caracterización estructural de los compuestos	27
5.1.4.2	Identificación de los compuestos obtenidos del fraccionamiento biodirigido	27
5.1.4.3	Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la mezcla de MG	28
5.1.4.4	Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la mezcla de AG	28
5.1.4.5	Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la mezcla de MEAG	29
5.1.4.6	Hidrólisis alcalina de la mezcla de MG	29
5.2	Experimentos farmacológicos	30
5.2.1	Animales de experimentación	30
5.2.2	Efecto hipoglucémico agudo producido por los extractos de DCM, ME, A y LJ en ratones sanos	30
5.2.3	Efecto hipoglucémico agudo producido por el extracto de DCM en ratones con diabetes experimental	31
5.2.4	Estudio toxicológico agudo del extracto de DCM en ratones sanos	31
5.2.5	Efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM en ratas con diabetes inducida con aloxana	32
5.2.6	Efecto hipoglucémico de las fracciones primarias y secundarias en ratones sanos y con diabetes experimental	33
5.2.7	Efecto hipoglucémico de la mezcla de los AG y MG en ratones con diabetes experimental	34
5.2.8	Análisis estadístico	34
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	Efecto hipoglucémico de los extractos de DCM, ME, A y LJ en ratones sanos	36
6.2	Efecto hipoglucémico del extracto de DCM en ratones con diabetes experimental	38
6.3	Estudio toxicológico agudo del extracto de DCM en ratones sanos	39
6.4	Efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM a ratas con diabetes inducida con aloxana	42
6.5	Efecto hipoglucémico de las fracciones primarias y secundarias en ratones sanos y con diabetes experimental	47
6.6	Caracterización de los compuestos aislados del estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i>	48
6.7	Efecto hipoglucémico de la mezcla de los AG y MG en ratones con diabetes experimental	53
7	CONCLUSIONES	57
8	PERSPECTIVAS	58

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
PUBLICACIÓN DEL TEMA DE TESIS	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fármacos utilizados en el tratamiento de la DM.....	6
Figura 2.	Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de <i>M. charantia</i> : (G) $\beta$ -sitosterol-D-glucósido y (H) 5-25-estigmastadieno-3- $\beta$ -ol-D-glucósido.....	10
Figura 3.	Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de <i>C. roseous</i> , (I) catarantina, (J) leurosina, (K) tetrahidroalstonina, (L) vindolina.....	11
Figura 4.	Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de <i>T. stans</i> : (M) tecomina y (N) tecostanina.....	12
Figura 5.	Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de <i>T. foenum-graceum</i> : (O) cumarina, (P) escopoletina y (Q) fenogreequina.....	12
Figura 6.	Compuesto con actividad hipoglucemiante aislado de <i>B. veronicaefolia</i> Gray, 5,7,3'-trihydroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (R).....	14
Figura 7.	Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de <i>C. obtusifolia</i> : ácido clorogénico (S) e isoorientina (U).....	15
Figura 8.	Compuesto con actividad hipoglucemiante aislado de <i>P. peltatum</i> : peltalosa (37).....	16
Figura 9.	<i>Ibervillea sonora</i> Greene.....	17
Figura 10.	Obtención del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonora</i> .....	23
Figura 11.	Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de la FP9 derivada del extracto de	

	DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones con diabetes experimental (n=7 por grupo).....	50
Figura 12.	Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de la FS1 derivada de la FP9 de <i>I. sonorae</i> en ratones con diabetes experimental (n=7).....	51
Figura 13.	Estructuras de los compuestos 12-16.....	51
Figura 14.	Estructuras de los compuestos 1-11.....	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	24
Tabla 2.	Resumen del fraccionamiento primario del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> .....	26
Tabla 3.	Resumen del fraccionamiento de la fracción primaria FP9.....	26
Tabla 4.	Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de SSI, aceite de maíz, tolbutamida y los extractos de DCM, ME, A y LJ de <i>I. sonorae</i> en ratones sanos (n=6 por grupo).....	37
Tabla 5.	Efecto sobre la glucemia producida por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y el extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones con diabetes experimental.....	39
Tabla 6.	Curso temporal de la temperatura producido por la administración ip de aceite de maíz y el extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones sanos (n=10 por grupo).....	41
Tabla 7.	Curso temporal de la temperatura producido por la administración ig de aceite de maíz y el extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones sanos (n=10 por grupo).....	41
Tabla 8.	Efecto de la administración diaria del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> sobre varios parámetros bioquímicos ( $\bar{X} \pm EEM$ ) en ratas con diabetes experimental. ....	46
Tabla 9.	Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de	

	aceite de maíz, tolbutamida y de las FP del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones sanos (n=6 por grupo).....	49
Tabla 10.	Curso temporal de la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de las fracciones secundarias de la FP9 del extracto de DCM de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones sanos (n=7 por grupo).....	50
Tabla 11.	Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz y de la mezcla de AG y MG de la FS1 de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones con diabetes experimental.....	55

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	IR de la mezcla de AG.....	70
Anexo 2.	RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de AG.....	71
Anexo 3.	EMIE del ácido laúrico.....	72
Anexo 4.	EMIE del ácido mirístico.....	73
Anexo 5.	EMIE del ácido pentadecanoico.....	74
Anexo 6.	EMIE del ácido palmítico.....	75
Anexo 7.	EMIE del ácido esteárico.....	76
Anexo 8.	IR de la mezcla de MG.....	77
Anexo 9.	RMN- <sup>13</sup> C de la mezcla de MG.....	78
Anexo 10.	RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de MG.....	79
Anexo 11.	CG-EM del palmitato de metilo.....	80
Anexo 12.	CG-EM del margarato de metilo.....	81
Anexo 13.	CG-EM del estearato de metilo.....	82
Anexo 14.	CG-EM del nonadecilato de metilo.....	83
Anexo 15.	CG-EM del araquidonato de metilo.....	84
Anexo 16.	CG-EM del behenato de metilo.....	85
Anexo 17.	CG-EM del tricosanoato de metilo.....	86
Anexo 18.	CG-EM del tetracosanoato de metilo.....	87
Anexo 19.	CG-EM del pentacosanoato de metilo.....	88
Anexo 20.	CG-EM del hexacosanoato de metilo.....	89
Anexo 21.	CG-EM del octacosanoato de metilo.....	90



## RELACIÓN DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

A	Acuoso
AcOEt	Acetato de etilo
AG	Ácidos grasos
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CeSO <sub>4</sub>	Sulfato cérico
CG	Cromatografía de gases
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
DCM	Extracto de diclorometano
DM	Diabetes mellitus
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
DE	Desviación estándar
DL <sub>50</sub>	Dosis letal cincuenta
EEM	Error estándar de la media
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
FAB <sup>+</sup>	Bombardeo rápido de átomos
FP	Fracción primaria
FS	Fracción secundaria
ig	Intragástrica

ip	Intraperitoneal
iv	Intravenosa
IR	Infrarrojo
LJ	Liofilizado del jugo
ME	Extracto de metanol
MeOH	Metanol
MEAG	Metil ésteres de ácidos grasos
MG	Monoglicéridos
MHz	Megahertz
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mg/dl	Miligramo por decilitro
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
SSI	Solución salina isotónica
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
TMS	Tetrametil silano
UI	Unidad interacional
UMA	Unidad masa atómica
UV	Ultravioleta
$\bar{X}$	Media

## RESUMEN

En México la DM constituye uno de los problemas más importantes de salud pública. Su tratamiento farmacológico se realiza con base en la administración de hipoglucemiantes orales (sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, meglitinidas y tiazolidinedionas) y/o insulina. Estos medicamentos, a pesar de su amplio uso y efecto benéfico, no han sido suficientes para lograr un control adecuado de la DM y no han podido evitar el desarrollo de las complicaciones agudas y crónicas características de la misma. Entre las alternativas existentes, al alcance de la población masiva de los países en desarrollo, para el control de la DM se encuentran las plantas medicinales usadas empíricamente como antidiabéticas. Investigaciones etnofarmacológicas reportan que a nivel mundial se utilizan más de 1200 plantas en el control empírico de la DM. En México la población utiliza más de 250 plantas como antidiabéticas. Una de estas plantas es *I. sonorae* Greene (Cucurbitaceae) conocida popularmente como guareque o wereque. De esta planta sólo había sido estudiada la actividad farmacológica de su preparación tradicional, por lo que fue seleccionada para realizar estudios dirigidos al aislamiento e identificación de los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante. El presente trabajo se divide en cuatro partes: la primera comprende la actividad hipoglucemiante obtenida de 4 productos derivados de la raíz de *I. sonorae*, la segunda incluye el estudio toxicológico agudo producido por el extracto de diclorometano (DCM) en ratones sanos, la tercera se refiere al efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM a ratas con diabetes

inducida con aloxana y la última describe el estudio fitoquímico biodirigido de la raíz de *I. sonorae*.

Los animales empleados para la evaluación farmacológica y toxicológica fueron: ratones macho (*Mus musculus*) cepa CD-1, y ratas macho (*Ratus norvegicus*) cepa Wistar. El ensayo utilizado para la determinación del efecto hipoglucémico *in vivo* de los diferentes extractos, fracciones y compuestos fue un método previamente descrito por Alarcón y col. (2005).

Una vez preparados los extractos de diclorometano (DCM), metanol (ME), acuoso (A) y jugo liofilizado (LJ) de la raíz de *I. sonorae*, éstos se sometieron a una evaluación de su efecto hipoglucémico en ratones sanos y con diabetes experimental. El mejor efecto fue observado en el extracto de DCM a dosis de 300 y 600 mg/kg, con un descenso del 30.1% y 70.1%, respectivamente, a los 360 minutos. El estudio toxicológico agudo producido por el extracto de DCM en ratones sanos, permitió conocer que la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) del extracto de DCM administrado por vía ip. es de 425.34 mg/kg. La  $DL_{50}$  obtenida por la administración oral fue de 2158 mg/kg. El análisis toxicológico demuestra que el extracto de DCM pertenece al índice toxicológico nivel 3 (moderadamente tóxico).

El efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM a ratas con diabetes inducida con aloxana muestra que el grupo tratado con el extracto de DCM redujo moderadamente la glucemia y hubo un importante incremento en el peso. Los niveles de colesterol total, TGO, TGP y triglicéridos no mostraron modificaciones importantes después de los 42 días de tratamiento con el extracto de DCM.

El extracto de DCM se sometió a un estudio fitoquímico biodirigido empleando como técnicas de separación y purificación métodos de CC y CCF. La prueba biológica se realizó de la forma ya descrita. La identificación de los compuestos se hizo mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas. Del estudio se aislaron dos grupos de compuestos; una mezcla de monoglicéridos (MG) y una mezcla de ácidos grasos (AG). La mezcla de MG está constituida por: 1-monopalmitina(1), 1-monomargarato de glicerilo (2), 1-monoestearina (3), 1-monononadecilato de glicerilo (4), 1-monoaraquidonato de glicerilo (5), 1-monobehenato de glicerilo (6), 1-monotricosanoato de glicerilo (7), 1-monotetracosanoato de glicerilo (8), 1-monopentacosanoato de glicerilo (9), 1-monohexacosanoato de glicerilo (10) y 1-monooctacosanoato de glicerilo (11). Por su parte, la mezcla de AG resultó estar constituida por el ácido láurico (12), ácido mirístico (13), ácido pentadecanoico (14), ácido palmítico (15) y ácido esteárico (16). Ambos grupos de compuestos, administrados conjuntamente, resultaron ser los responsables de la actividad hipoglucemiante detectada inicialmente en el extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae*.

Palabras clave: *Ibervillea sonorae*; Cucurbitaceae; Ácidos grasos; Monoglicéridos; Plantas medicinales; Plantas hipoglucemiantes; Diabetes mellitus.

## ABSTRACT

In Mexico the DM constitutes one of the most important problems of public health. The pharmacological treatment of the DM is performed by administration of oral hypoglycemic agents (sulphonylureas, biguanides, inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases and thiazolidinediones) and/or insulin. However, these medicines have not been sufficient to achieve a suitable control of the DM and in many cases they can not avoid the development of the acute and chronic typical complications of the same. A good alternative for the DM control is found in the medicinal plants used empirically by population as antidiabetic remedy. Ethnobotanic investigations report that more than 1200 plants are used in the empirical control of the DM worldwide. In Mexico the population uses most of 250 plants as antidiabetic remedy. One of these plants is *I. sonorae* Greene (Cucurbitaceae) popularly known as guareque or wereque. The hypoglycemic effect of the traditional preparation of this plant was initially studied; then, the plant was selected to perform studies for to isolate and to characterize the active substances responsible of the hypoglycemic activity.

The present work is divided in four parts: the first one includes the hypoglycemic effect produced by 4 extracts derived from the root of *Ibervillea sonorae*; the second one includes the acute toxicological study produced by the extract of dichloromethane (DCM) in healthy mice; the third one talks about to the hypoglycemic effect produced by the daily administration of the extract of DCM to rats with diabetes induced with aloxan; and the last one describes the bioassay-guided phytochemical study of the root of *I. sonorae*. The animals used for the pharmacological and toxicological evaluation were: Male adult CD-1 *Mus musculus*, and male Wistar rats (*Ratus*

*norvegicus*). The test used for the determination of the hypoglycemic effect in vivo of the different extracts, fractions and compounds was a method previously described by Alarcon et al. (2005). Once prepared the 4 extracts (water (A), lyophilized juice (LJ), dichloromethane (DCM) and methanol (ME)), from the root of *I. sonorae*, their hypoglycemic effect was assayed in healthy and diabetic mice. The best hypoglycemic effect was observed in the extract of DCM (doses of 600 and 300 mg/kg). The acute toxicological study produced by the extract of DCM in healthy mice, indicated that the lethal dose average ( $DL_{50}$ ) of the extract of DCM administered by via ip is 425.34 mg/kg. The  $DL_{50}$  obtained by the oral administration is 2,158 mg/kg. The toxicological analysis indicated that the extract of DCM belongs to the level 3 toxicological index (moderately toxic). The hypoglycemic effect produced by the daily administration of the extract of DCM to rats with alloxan-induced diabetes showed a moderate reduction of the glycemia with a important increase in the body weight. The triglycerides, total cholesterol, GOT, and GPT levels did not show any important modification at 42th day of treatment with the DCM extract. The DCM extract was submitted to a bioguided phytochemistry study using separation and purification techniques, such as column and thin layer chromatography. The biological tests were made in the already described way. The identification of compounds was made by means of the analysis of their spectroscopic and spectrometric constants. From the studies were isolated two groups of compound: monoglycerides (MG) and fatty acids (FA). The MG's are: 1-monopalmitin (1), glyceryl 1-monomargarate (2), 1-monostearin (3), glyceryl 1-monononadecylate (4), glyceryl 1-monoarachidanate (5), glyceryl 1-monobehenate (6), glyceryl 1-monotricosanoate (7), glyceryl 1-

monotetracosanoate (8), glyceryl 1-monopentacosanoate (9), glyceryl 1-monohexacosanoate (10), and glyceryl 1-monooctacosanoate (11) and the FA's are: lauric acid (12), myristic acid (13), pentadecanoic acid (14), palmitic acid (15) and stearic acid (16). Both groups of compounds need to be administered together to reproduce the hypoglycemic effect initially observed in the DCM extract of *I. sonorae*.

Key words: *Ibervillea sonorae*; Cucurbitaceae; Fatty acids; Monoglycerides; Medicinal plants; Hypoglycemic plants; Diabetes mellitus.



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. DEFINICIÓN DE LA DIABETES MELLITUS (DM)**

La DM se puede definir como un síndrome caracterizado por un estado de hiperglucemia crónica como consecuencia de una producción insuficiente de insulina, resistencia a esta hormona o ambas (ADA, 2005). Los mecanismos que dan lugar a la diabetes van desde la destrucción de las células beta por una respuesta autoinmunitaria hasta situaciones en que se observa resistencia a la insulina. Aunque la hiperglucemia es el marcador bioquímico de la diabetes, el síndrome se caracteriza por profundas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Herman, 1999).

### **1.2. IMPORTANCIA, SÍNTOMAS Y COMPLICACIONES DE LA DM**

La DM constituye uno de los problemas más importantes de salud pública. En México se registran anualmente más de 180 mil casos nuevos y causa alrededor de 36 mil defunciones (Alpizar y col., 1998). El incremento observado de la ocurrencia de diabetes en México probablemente refleja una mayor exposición a factores de riesgo relacionados con los estilos de vida, en particular alimentarias y falta de ejercicio, que favorecen un incremento en la masa corporal, en una población con predisposición genética (Escobedo y col., 1996).

En el año de 1997 en los Estados Unidos de América se reportaron alrededor de 16 millones de personas con diabetes (Engelgau y col., 2000). A nivel mundial en el año 2000 se calculó que el número de diabéticos en América era de 35 millones, cifra que se incrementará a 64 millones en el año 2025; 52% de los

diabéticos en el continente viven en América Latina y el Caribe y esa proporción se prevé crecerá a 62% en el año 2025 (Vázquez y col., 2006).

La hiperglucemia, poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso son síntomas característicos de la diabetes mal controlada, y en muchas ocasiones también hay visión borrosa. Las complicaciones crónicas de la enfermedad son consecuencia del metabolismo anormal, tanto de la glucosa como de las proteínas y los lípidos. Las complicaciones de la diabetes a largo plazo son: retinopatía con pérdida potencial de la visión, nefropatía que conduce a insuficiencia renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies y amputaciones. Además, se pueden presentar alteraciones a nivel gastrointestinal, genitourinario, cardiovascular y disfunción sexual. La posibilidad de sufrir infarto de miocardio, accidente vascular cerebral e insuficiencia renal es dos veces superior que en la población de características similares sin diabetes y el riesgo de sufrir una amputación es 10 veces mayor (Alpizar y col., 1999; DCCT RG, 1993).

### **1.3. CLASIFICACIÓN Y CAUSAS DE LA DM**

La DM de acuerdo a su etiología se clasifica en cuatro tipos (Committee Report, 1997):

- Diabetes tipo 1.
- Diabetes tipo 2.
- Diabetes gestacional.
- Otros tipos específicos de diabetes.

La DM tipo 1 (antes conocida como DM insulino dependiente) puede aparecer a edades tempranas o avanzadas de la vida, como resultado de un proceso

autoinmunitario que se relaciona con predisposición genética y que se desencadena por factores ambientales (Atkinson, 1990).

Entre los factores ambientales se puede mencionar la influencia de algunos agentes infecciosos que desencadenan el inicio de las manifestaciones de diabetes, al disparar vías efectoras específicas; sin embargo, se ha asociado la presencia de virus con el desarrollo de la DM tipo 1, como el virus Coxsackie B4 causante de la rubéola congénita (Zuñiga, 1995).

Este tipo de diabetes en México constituye del 1 al 2 % de todos los casos. Su incidencia se aproxima a 2/100 000 habitantes. Suele diagnosticarse en la infancia o la adolescencia, por lo que tiene un fuerte impacto en la dinámica familiar y más tarde en la capacidad productiva del individuo. Los signos y síntomas aparecen de manera brusca y la afección es fatal si no se administra tratamiento oportuno con insulina (Hardman y col., 1996; Lerman, 1998).

De todos los tipos de DM, la diabetes tipo 2 (antes conocida como DM no insulino dependiente) es la más frecuente. Su prevalencia aumenta conforme la edad avanza y es más habitual en sujetos con dislipidemias y antecedentes familiares de DM. En México, uno de cada cuatro individuos mayores de 50 años tiene este tipo de diabetes. Destaca también una elevada prevalencia de diabetes tipo 2 en individuos con edades que oscilan entre los 35 y 45 años (5%). Estas cifras son aún mayores en la población mexicana que emigró a Estados Unidos, donde la prevalencia de diabetes casi se ha duplicado (Escobedo y col., 1996).

La mortalidad por DM en México se elevó de 39 a 49 por cada 100 mil habitantes entre el año 1985 y el año 2000, ocupando los primeros lugares como causa de muerte tanto en el hombre como en la mujer y provocando una cantidad muy

importante de años de vida saludables perdidos (Vázquez y col., 2006). Para el año 2025 cerca de 11.7 millones de mexicanos se espera sean diagnosticados con diabetes. En el año 2000, la diabetes fue la primer causa más frecuente de hospitalización y la segunda causa más común de muerte hospitalaria (Rull y col., 2005).

Pese a que la diabetes tipo 2 es un problema común, un gran porcentaje de las personas que la padecen alrededor del 35 % no se sabe diabético porque no ha acudido con algún médico ni se ha realizado estudios de glucosa en sangre.

Una vez que la diabetes se diagnostica, estos sujetos suelen admitir que durante un periodo largo pero difícil de precisar sentían la boca más seca, necesitaban orinar con mayor frecuencia, en algún momento su visión fue algo borrosa, no aumentaban de peso aunque comían en exceso y, en el caso de las mujeres, cursaban con infecciones vaginales recurrentes, si bien desconocían que estos síntomas se relacionan con diabetes y simplemente se habían acostumbrado a ellos.

Con base en los datos epidemiológicos con que se cuenta, las predicciones sugieren que la incidencia de diabetes tipo 2 continuará en aumento, en estrecha relación con la fuerte predisposición genética de la población del país, por la mayor migración del área rural a centros urbanos, los cambios desfavorables en los hábitos de alimentación y la tendencia a realizar menor actividad física (Lerman, 1998).

La diabetes gestacional es la forma de la enfermedad que se inicia o se descubre durante el embarazo. No incluye a pacientes con diagnóstico previo de diabetes y que se embarazan. Al término del embarazo es posible que la paciente regrese a

un estado de tolerancia normal a la glucosa o bien permanezca con intolerancia a la glucosa o con diabetes (Smith y Reynard, 1998; Wood y col., 2000).

Los estudios de seguimiento han demostrado que del 30 al 50% de estas mujeres desarrollará diabetes tipo 2 en los 10 años posteriores al evento obstétrico, además 70% de las pacientes con diabetes gestacional repiten el trastorno en el siguiente embarazo (Hernández-Valencia, 2005).

La clasificación actual incluye otros tipos específicos de diabetes, tales como defectos genéticos en la función de la célula beta, defectos genéticos relacionados con la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, enfermedades endocrinas, diabetes inducida por sustancias químicas y medicamentos, infecciones, formas poco comunes de diabetes mediada por el sistema inmunológico y otros síndromes genéticos que en ocasiones se relacionan con diabetes.

#### **1.4. TRATAMIENTOS ACTUALES DE LA DM**

Los fármacos que se utilizan actualmente en el control de la diabetes son los hipoglucemiantes orales como son las sulfonilureas de “primera generación” [tolbutamida (A), acetohexamida, tolazamida y cloropropamida (B)], las de “segunda generación” [gliburida (C), glipizida y gliclazida (D)], de “tercera generación” (glimepirida), las biguanidas [fenformina (E) y metformina (F)] (Figura 1), los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa (acarbose), meglitinidas (nateglinida y repaglinida), tiazolidinedionas (ciglitazona y pioglitazona) y una nueva clase de tratamiento, sitagliptina e insulina .

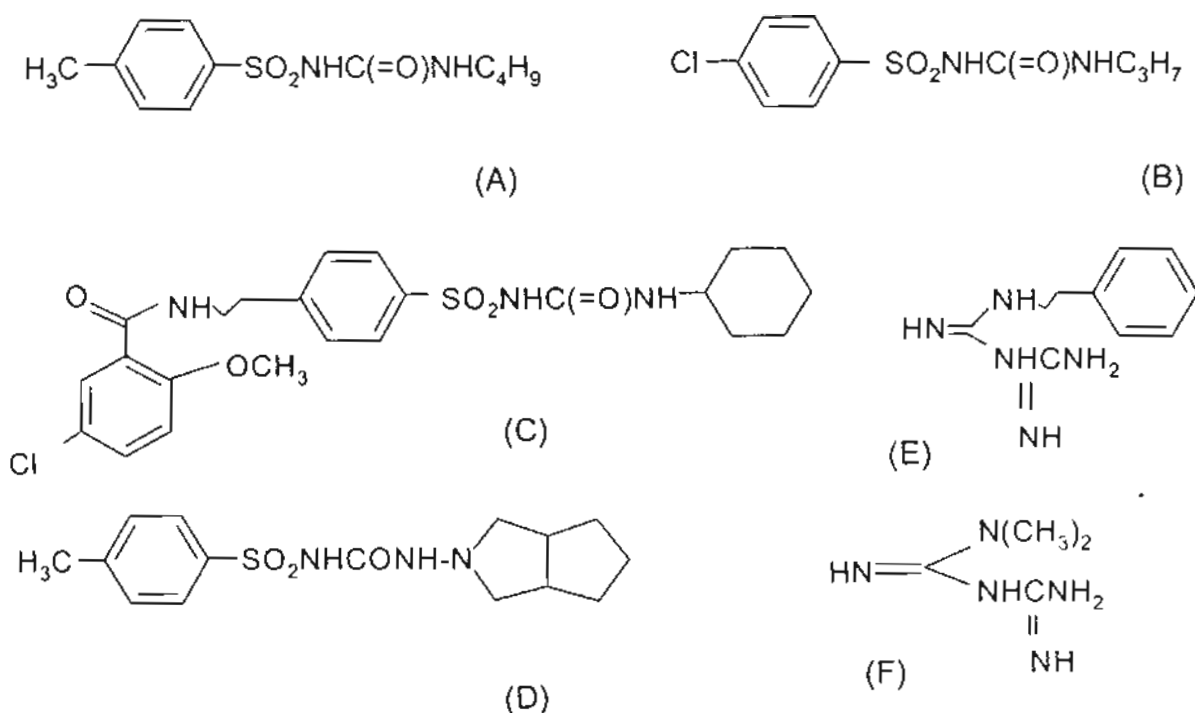


Figura 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la DM

Los mecanismos mediante los cuales los fármacos pueden conducir a un descenso de la glucemia son diversos; por ejemplo, estimulación de la secreción de insulina (sulfonilureas o repaglinida), aumento de la captación de glucosa por los músculos (tiazolidinedionas y biguanidas), reducción de la producción de glucosa (biguanidas y tiazolidinedionas), retardo de la absorción intestinal de los hidratos de carbono (inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa), mejoran el control de la glucemia aumentando las concentraciones de las hormonas incretinas (sitagliptina) y corrección de la deficiencia de insulina (insulina o análogos de la insulina)

(Inzucchi, 2002; Lawrence, 1999; Scheen, 1997; Scheen y Lefebvre, 1998; Stumvoll y col., 2005).

A pesar de su amplio uso y efecto benéfico en el control de los pacientes diabéticos, estos medicamentos no han sido suficientes para lograr un control adecuado de la DM y no han podido evitar el desarrollo de las complicaciones agudas y crónicas características de la misma. Además de los efectos adversos de los fármacos que incluyen náusea, vómito, ictericia colestásica, reacciones de hipersensibilidad generalizadas y dermatológicas, hipoglucemia, diarrea, sabor metálico. Aunque es innegable el progreso en el control del paciente diabético, aún quedan muchos problemas por resolver como son la administración y dosificación correcta de la insulina e hipoglucemiantes orales.

Es indudable el beneficio que han recibido millones de diabéticos en el mundo con el desarrollo de metodologías para la extracción, purificación y producción a gran escala de la insulina. Sin embargo, con este fármaco se tienen todavía problemas de dosificación. Además de que su administración parenteral puede producir también efectos indeseables como la lipotrofia.

### **1.5. ALTERNATIVAS EN EL CONTROL DE LA DM**

Además de los fármacos ya mencionados, para el tratamiento de la DM, se tienen otras alternativas que incluyen: el trasplante de páncreas, injerto de islotes pancreáticos y la implantación de bombas de infusión de insulina o páncreas artificial. No obstante las dos primeras no han podido superar las barreras de histocompatibilidad que llevan, casi invariablemente, al rechazo de injerto y con el

páncreas artificial aún no se logran superar algunos aspectos técnicos (Saudek y col., 1997; Bennet y col., 1999; Robertson y col., 2000; ADA, 2000).

Además, estas alternativas pertenecen a una medicina que requiere cierto nivel económico de los pacientes y no están al alcance de la población de los países en desarrollo.

Otra alternativa son las plantas medicinales, según datos de la Organización Mundial de la Salud, más del 70% de la población mundial tiene que recurrir a la medicina tradicional, como única alternativa a su alcance, para resolver sus principales problemas de salud (Alarcón y col., 1993).

En el caso de la DM, la medicina tradicional mexicana la trata con plantas conocidas como antidiabéticas (Aguilar y col., 1994; Castillo, 1988; Del Amo, 1979; Díaz, 1976; Encarnacion y col., 1986; Encarnacion y col., 1987; Frei y col., 1998; Lozoya y col., 1987; Martínez, 1987; Winkelman, 1986; Zamora y col., 1992).

## **1.6. PLANTAS MEDICINALES Y DM**

Se sabe que mundialmente son utilizadas más de 1200 plantas medicinales en el control de la DM (Marles y Farnsworth, 1994). Algunas de estas plantas han sido objeto de estudios farmacológicos exhaustivos dirigidos hacia la validación de sus propiedades antidiabéticas. Sin embargo, alrededor de 800 especies vegetales reportadas como antidiabéticas no se han sometido a estudios sistematizados.

De acuerdo con el tipo de estudios realizados con las plantas estudiadas, éstas fueron clasificadas en tres categorías (Bailey y Day, 1989; Marles y Farnsworth, 1994, 1995):



- 1) Plantas antidiabéticas a partir de las cuales se ha logrado aislar un agente hipoglucemiante potencial.
- 2) Plantas antidiabéticas cuyo efecto hipoglucémico ha sido estudiado a nivel experimental y/o clínico, pero a partir de las cuales no se ha logrado aislar la sustancia responsable de la actividad hipoglucemiante.
- 3) Plantas antidiabéticas cuyo efecto hipoglucémico fue estudiado experimental y/o clínicamente, pero cuyos resultados fueron negativos o contradictorios.

A la fecha se ha demostrado la acción hipoglucemiante en más de 300 plantas y de ellas se han aislado alrededor de 150 compuestos hipoglucemiantes. En el 19% de las 300 plantas estudiadas los resultados han sido negativos o contradictorios. Cabe señalar también que el 90% de los estudios realizados con estas plantas ha sido a nivel experimental, enfocados a los efectos agudos, mientras que a nivel toxicológico y clínico se ha evaluado sólo el 10%. En menos del 10% de las plantas estudiadas se han realizado estudios dirigidos a la determinación de su actividad biológica a largo plazo.

Las familias botánicas que contribuyen con más especies con efecto antidiabético a nivel mundial son las siguientes: *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae* y *Euphorbiaceae*, entre otras. Entre las plantas más ampliamente utilizadas a nivel mundial se mencionan: *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), *Aloe vera* (Liliaceae), *Syzygium cumini* (Myrtaceae), *Tecoma stans* (Bignoniaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae), *Lupinus albus* y *Trigonella foenum-graceum* L. (Fabaceae), *Allium cepa* y *A. sativum* (Liliaceae) (Marles y Farnsworth, 1994, 1995). *M. charantia* es la planta más ampliamente estudiada a nivel mundial,

se ha estudiado el efecto producido por sus flores, frutos, hojas, etc., tanto a nivel experimental como a nivel clínico, se ha estudiado su efecto hipoglucémico agudo y crónico, sus efectos toxicológicos *in vivo* e *in vitro*. Además, han sido propuestas varias sustancias como las responsables de la actividad hipoglucemiante, tal como la mezcla de dos glucoesteroles:  $\beta$ -sitosterol-D-glucósido (G) y 5-25-estigmastadieno-3- $\beta$ -ol-D-glucósido (H) (Figura 2) (Ali y col., 1993, Tennekoon y col., 1994).

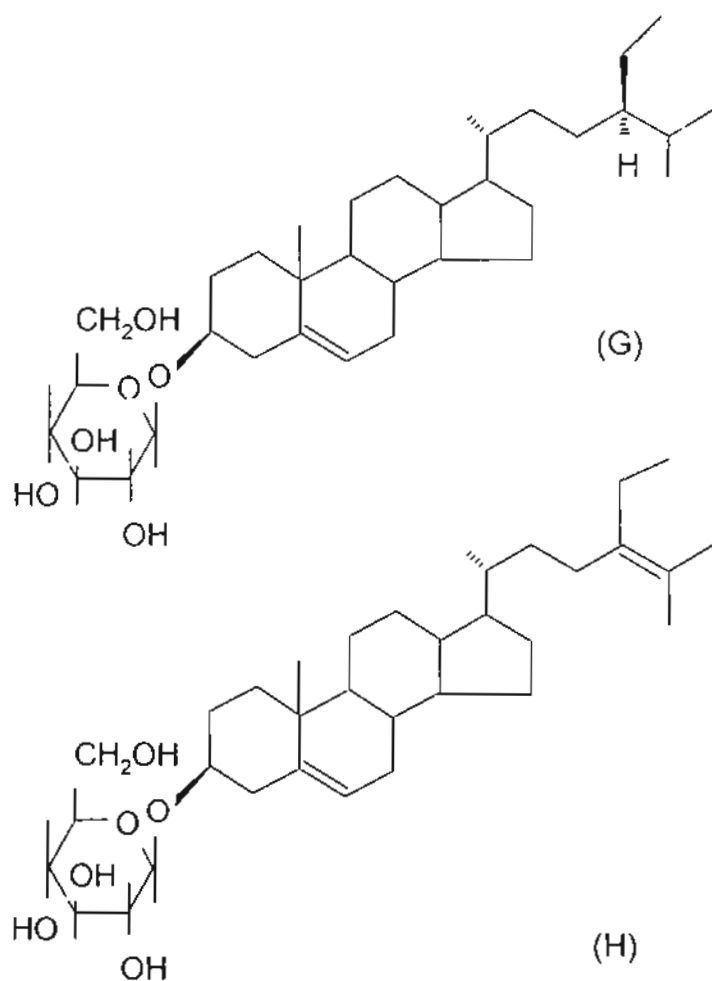


Figura 2. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de *M. charantia*: (G)  $\beta$ -sitosterol-D-glucósido y (H) 5-25-estigmastadieno-3- $\beta$ -ol-D-glucósido

De *Catharanthus roseous* se aislaron los alcaloides catarantina (I), leurosina (J), tetrahidroalstonina (K) y vindolina (L) (Figura 3).

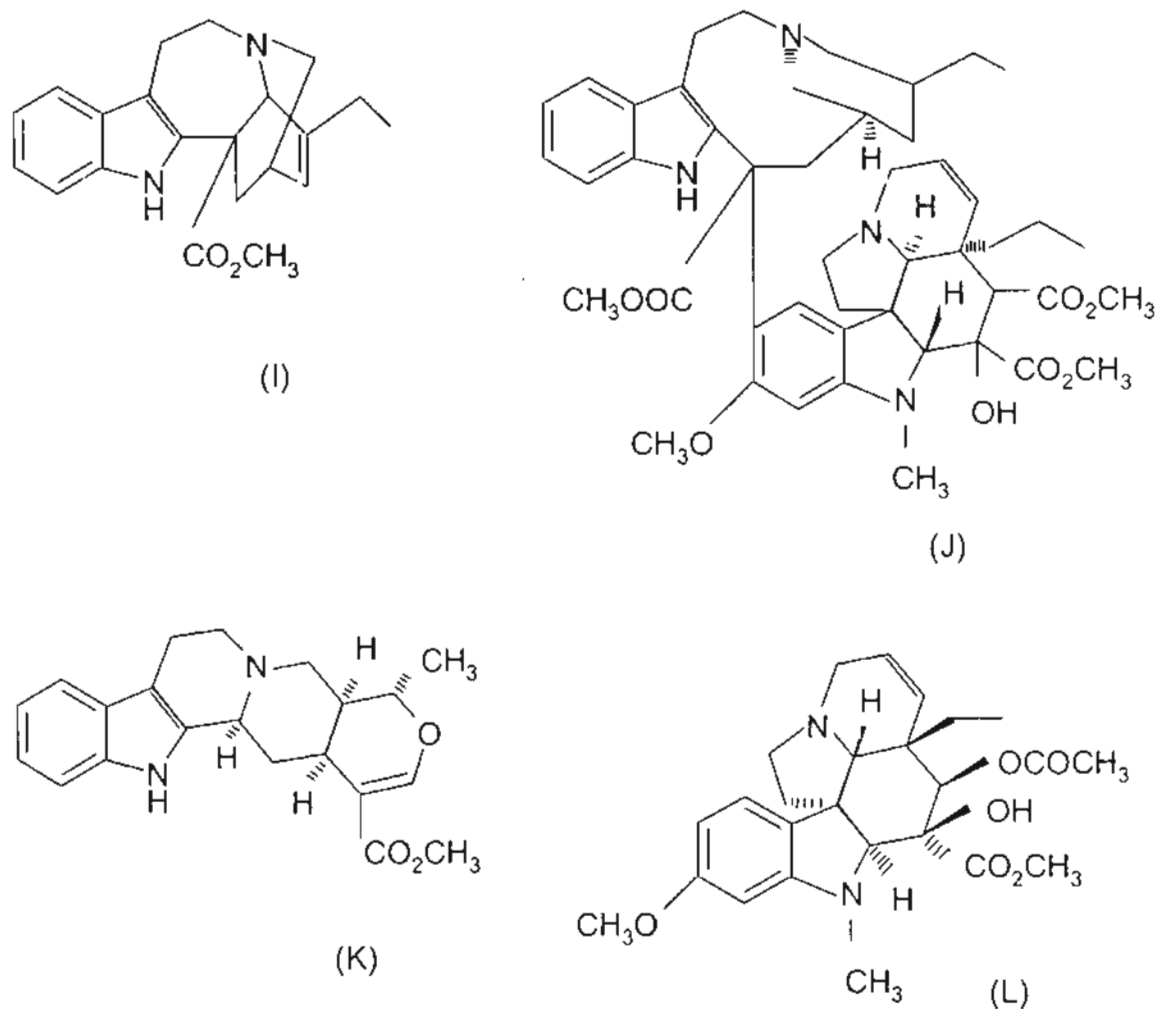


Figura 3. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de *C. roseous*, (I) catarantina, (J) leurosina, (K) tetrahidroalstonina, (L) vindolina.

De *Tecoma stans* se han aislado los alcaloides tecomina (M) y tecostanina (N) (Figura 4) (Hammouda y Amer 1960, Hammouda y col., 1964).



Figura 4. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de *T. stans*: (M) tecomina y (N) tecostanina.

De *T. foenum-graceum* algunos compuestos son: cumarina (O), escopoletina (P) y fenogreequina (Q) (Figura 5) (Marles y Farnsworth, 1995).

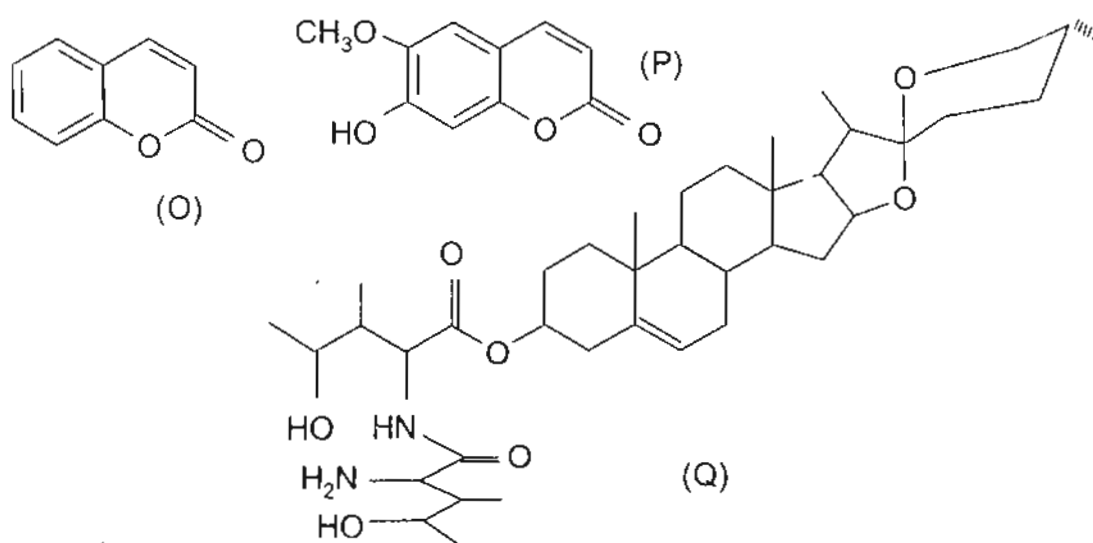


Figura 5. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de *T. foenum-graceum*: (O) cumarina, (P) escopoletina y (Q) fenogreequina.

La naturaleza química de los compuestos hipoglucemiantes que más frecuentemente se han aislado de plantas antidiabéticas son carbohidratos, alcaloides, glucopéptidos, terpenoides, péptidos, flavonoides, esteroides y compuestos de naturaleza lipídica (Marles y Farnsworth, 1994).

Es importante subrayar que más del 10% de las plantas reportadas mundialmente como antidiabéticas crecen en México. Sin embargo, a pesar de que estas plantas representan una alternativa útil para el control de la DM al alcance de la mayoría de la población y que representan una fuente potencial de materia prima para la obtención de nuevos medicamentos hipoglucemiantes orales; su investigación experimental básica y clínica en nuestro país es incipiente.

Por otra parte dentro de la población de salud pública la DM es uno de los padecimientos con más altos índices de prevalencia y mortalidad, es tratada con base en la administración oral de plantas medicinales. En México se utilizan alrededor de 270 plantas en el control de la DM (Hernández y col., 2002<sup>a</sup>). De éstas se ha evaluado el efecto hipoglucémico de alrededor de 80 especies diferentes y poco más del 50% ha mostrado efecto hipoglucémico en diferentes modelos experimentales, y con el resto, los resultados han sido negativos o contradictorios. Con los datos obtenidos hasta la fecha no se puede afirmar la ausencia de efecto hipoglucémico en este último grupo de plantas, ya que en la mayoría de los experimentos se ha evaluado únicamente el efecto hipoglucémico agudo. No se descarta la posibilidad que el efecto hipoglucémico de algunas de estas plantas sólo se pueda apreciar en estudios crónicos, como es el caso de *Aloe barbadensis* (Ali-Ajabnoor 1990). Al respecto, cabe señalar que apenas en el

5% de las 80 plantas estudiadas se han realizado estudios bajo administración crónica de la planta.

Por otro lado, únicamente en el 10% de las plantas estudiadas se han efectuado estudios clínicos, lo que refleja, a su vez, el mínimo número de estudios realizados en los que se han valorado los probables efectos toxicológicos producidos por estas plantas en el ámbito experimental (sólo en tres especies). Por su parte, en cuanto al aislamiento y caracterización química de las sustancias responsables de la actividad hipoglucemiante, en alrededor del 12% se ha propuesto un agente hipoglucemiante potencial (Roman y col., 1991, 1992<sup>a</sup>, 1992<sup>b</sup>, 1995; Perez y col., 1984, 1998<sup>a</sup>, 1998<sup>b</sup>; Alarcon y col., 1993, 1997, 1998, 2003). De los cuales podemos mencionar al flavonoide 5,7,3'-trihydroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (R) aislado de *Brickellia veronicaefolia* Gray. (Figura 6) (Perez y col., 2000<sup>a</sup>).

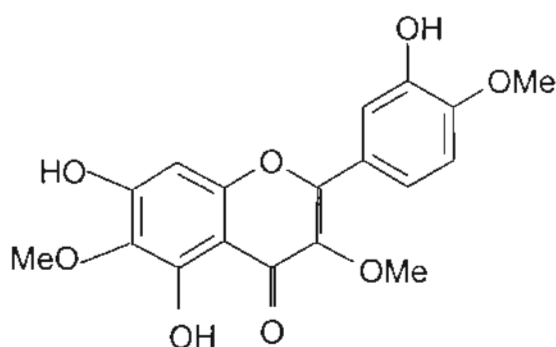


Figura 6. Compuesto con actividad hipoglucemiante aislado de *B. veronicaefolia* Gray: 5,7,3'-trihydroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (R).

De la planta *Parmentiera edulis*, se aisló una guaianolida; lactucin-8-O-metilacrilato (Pérez y col., 2000<sup>b</sup>). Un glucósido (Camperol-3-O-soforósido-4'-O-β-

D-glucósido) se obtuvo de *Equisetum myriochaetum* (Andrade y col., 2000). De *Cecropia obtusifolia* se aisló: ácido clorogénico (S) e isoorientina (T) (Figura 7).

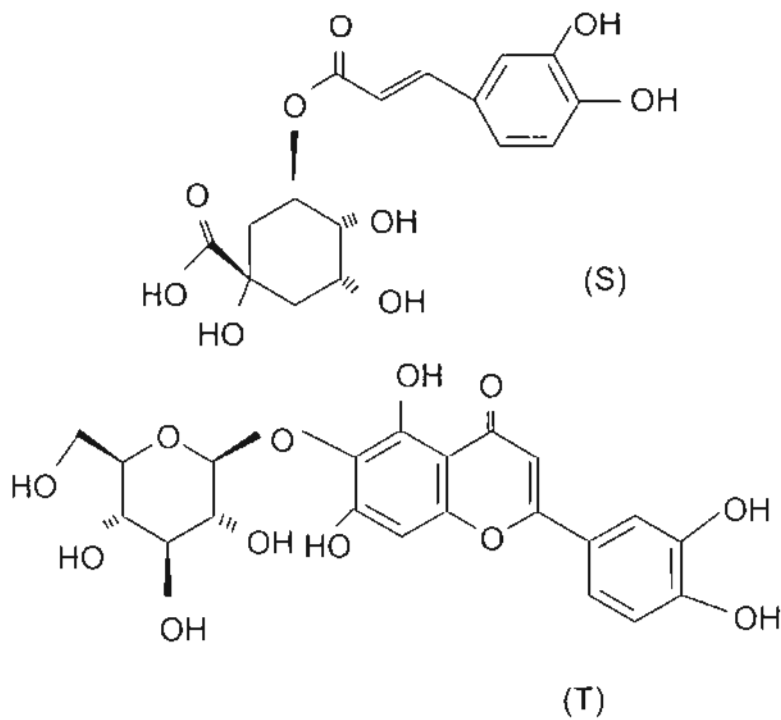


Figura 7. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de *C. obtusifolia*: ácido clorogénico (S) e isoorientina (T).

De *Psacalium peltatum* se aisló la peltalosa (2,6-anhidro-5-ulopiranososa) (U) (Figura 8) (Contreras-Weber, 2005).

Entre las plantas con mayor actividad hipoglucemiante se encuentran: *Guaiacum coulteri* A. Gray, *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass, *Cecropia obtusifolia* Bertol, *Psacalium decompositum* (Gray), *Coutarea latiflora* Moc. et Sess, *Ibervillea sonora* (Wats) Greene, *Lepechinia caulescens* (Ort) Epl, *Calamintha macrostema* y *Salpianthus arenarius* (H.B.K.) G. Ort, entre otras. Dos de estas especies pertenecen a la familia *Cucurbitaceae* (*C. ficifolia* e *I. sonora*).

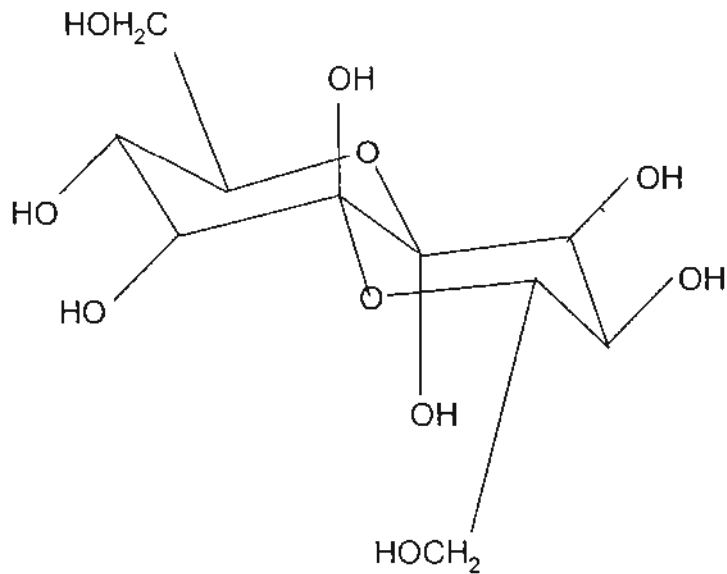


Figura 8. Compuesto con actividad hipoglucemiante aislado de *P. peltatum*: peltalosa (U).

En México el fruto de *C. ficifolia* y la raíz de *I. sonorae* fueron evaluadas experimentalmente y ambas mostraron notable actividad hipoglucemiante. Sin embargo, *C. ficifolia* mostró efectos tóxicos (Hernández y col., 2002<sup>b</sup>), mientras que *I. sonorae*, aún a dosis tan altas como 850 mg/kg, no mostró signos de toxicidad (Alarcon y col., 2002<sup>a</sup>; 2002<sup>b</sup>). Estudios experimentales previos con *I. sonorae* han logrado validar su actividad hipoglucemiante (Alarcon y col., 2002<sup>a</sup>). Sin embargo, aún no se han iniciado los estudios dirigidos al aislamiento y caracterización química de los principios activos presentes en dicha planta. Además, existe poca información sobre la toxicidad potencial, lo cual es importante ya que su aparente inocuidad podría, eventualmente conducir al estudio de su actividad hipoglucemiante a nivel clínico.



### 1.7. GENERALIDADES DE *Ibervillea sonora*:

*Ibervillea sonora* Greene (Sinonimia: *Maximowiczia sonora* S. Wats; Cucurbitaceae) es una planta dioica perenne, se conoce popularmente como "wareque" o "guereque" (Figura 9); se localiza en zonas semiáridas de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California (López e Hinojosa, 1988; Xolaipa, 1994).



Figura 9. *Ibervillea sonora* Greene.

La administración ip de la decocción liofilizada (300 mg/kg) de la raíz de *I. sonora* a ratones sanos, redujo significativamente los niveles de glucosa en sangre en el minuto 240 de  $42.3 \pm 2.3$  a  $27.9 \pm 2.5$  mg/dl. Además, la administración por la misma vía de la decocción a diferentes dosis (150, 300, 600 y 850 mg/kg) produjo descensos altamente significativos de los niveles de glucosa en sangre con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Este efecto fue dosis dependiente al minuto 240. En ratones con diabetes experimental, cuyas glucemias iniciales oscilaron de

214.7 ± 22.0 a 233.3 ± 29.8 mg/dl, la administración de la decocción de *I. sonorae* a dosis de 300 mg/kg redujo la glucemia en el minuto 360 de 214.7 ± 18.6 a 35.4 ± 2.8 mg/dl y a dosis de 500 mg/kg de 233.3 ± 29.8 a 30.3 ± 2.9 mg/dl. Ambas dosis también redujeron significativamente la glucemia al minuto 240. Así, por su evidente efecto hipoglucémico y por su aparente baja toxicidad, *I. sonorae* fue seleccionada para continuar con el estudio de su actividad farmacológica y toxicológica, tanto a nivel agudo como a nivel crónico. Así mismo, se consideró importante realizar el aislamiento y la purificación química de las sustancias responsables de la acción hipoglucemiante presentes en la raíz de *I. sonorae*.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

*I. sonorae* es una de las plantas antidiabéticas utilizada en México. En estudios previos con la decocción de la raíz de la planta se ha demostrado actividad hipoglucemiante. Sin embargo, aún no se han realizado estudios con la administración diaria de los extractos que permitan validar su efecto hipoglucémico a largo plazo y su inocuidad. Por otro lado, no se conoce la naturaleza química de los principios activos de la planta.

Este trabajo consistió en realizarse en cuatro partes: la primera comprende la actividad hipoglucemiante obtenida del rastreo de 4 extractos derivados de la raíz de *I. sonorae*, la segunda incluye el estudio toxicológico agudo producido por el extracto de DCM en ratones sanos, la tercera se refiere al efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM a ratas con diabetes inducida con aloxana y la última describe el estudio fitoquímico biodirigido de la raíz de *I. sonorae*. La propuesta cobra importancia si se considera que los resultados obtenidos de esta investigación generarían información para el futuro desarrollo de nuevos medicamentos para el control de la DM, patología que actualmente representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial.

### **3. HIPÓTESIS**

El efecto hipoglucémico de la raíz de *I. sonorae* en animales de experimentación se debe a la presencia de una o más sustancias, las cuales pueden ser aisladas, purificadas y caracterizadas químicamente empleando una metodología fitoquímica convencional, apoyada de pruebas para la determinación de su actividad hipoglucemiante.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto hipoglucémico de la raíz de *I. sonorae* en ratones sanos y con diabetes experimental y caracterizar químicamente las sustancias responsables de dicha actividad.

#### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener los extractos de diclorometano (DCM), metanólico (ME), acuoso (A) y liofilizado del jugo (LJ) de la raíz de *I. sonorae*, así como evaluar su efecto hipoglucémico en ratones sanos.
2. Evaluar el efecto hipoglucémico agudo del extracto más activo en ratones con diabetes experimental.
3. Realizar pruebas de toxicidad aguda con el extracto más activo en ratones sanos.
4. Estudiar el efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto más activo a ratas con diabetes inducida con aloxana.
5. Realizar el fraccionamiento del extracto con mayor actividad

hipoglucemiante y evaluar el efecto hipoglucémico de las fracciones combinadas resultantes, en ratones sanos.

6. Evaluar el efecto hipoglucémico de las fracciones con mayor actividad en ratones con diabetes experimental.
7. Separar y/o purificar la(s) fracción(es) con mayor actividad hipoglucemiante y evaluar su efecto hipoglucémico en ratones sanos.
8. Evaluar la acción hipoglucemiante de los compuestos aislados de la fracción activa en ratones con diabetes experimental.
9. Caracterizar mediante métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos el o los compuestos con actividad hipoglucemiante.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Fitoquímica

#### 5.1.1. Material vegetal

*Ibervillea sonorae* Greene se adquirió en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. La identificación se llevó a cabo en el Herbario de Plantas Medicinales del IMSS (Herbario IMSSM), por el M en C. Santiago Xolalpa, se depositó el ejemplar de herbario correspondiente, con número de registro 14,184.

Se separó la raíz de dos plantas, uno de los cuales se secó en la oscuridad a temperatura ambiente (1 semana), se molió y se guardó en recipientes de vidrio hasta su utilización. La otra raíz se procesó fresco.

#### 5.1.2. Extracción

##### 5.1.2.1. Preparación de los extractos de DCM, ME, A y LJ de la raíz de *I. sonorae* en pequeña escala

Con 300 g de material vegetal se formaron 3 muestras de 100 g cada una. Las muestras 1 y 2 fueron sometidas a un proceso de extracción mediante maceración con 300 ml de diclorometano (DCM) y metanol (ME), respectivamente, por dos ocasiones a intervalos de una semana; a los extractos resultantes se les eliminó el disolvente por destilación a presión reducida hasta obtener extractos de DCM y ME a peso constante. Se obtuvieron 1.87 g del extracto de DCM y 14.09 g del extracto de ME.

La muestra 3 se extrajo por decocción del material vegetal con 300 ml de agua por 30 minutos, la eliminación del agua se hizo por liofilización hasta obtener el

extracto acuoso (A), obteniéndose 10.62 g de extracto. Por otro lado, con 1.176 kg de raíz fresco se obtuvo el jugo (488 ml), el cual se liofilizó (LJ) para obtener 31.7 g. Los extractos resultantes se colocaron en viales y en refrigeración a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su evaluación.

Para las pruebas biológicas, los extractos metanólico y acuosos se disolvieron en solución salina isotónica (SSI) y el extracto de DCM en aceite de maíz.

### 5.1.2.2. Preparación del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en gran escala

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación farmacológica (Ver sección 6.1), se seleccionó el extracto de DCM para realizar su estudio fitoquímico biodirigido. El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y posteriormente se molió en un molino Tor-Rey, después se procedió a la extracción de 15.5 kg de material vegetal. El extracto de DCM se obtuvo por maceración a intervalos de una semana por tres veces con 20 l de diclorometano en cada ocasión. El extracto resultante se concentró al vacío, después de este proceso se obtuvieron 160.5 g de un residuo de color café oscuro (Figura 10), al cual se le determinó su actividad hipoglucemiante.

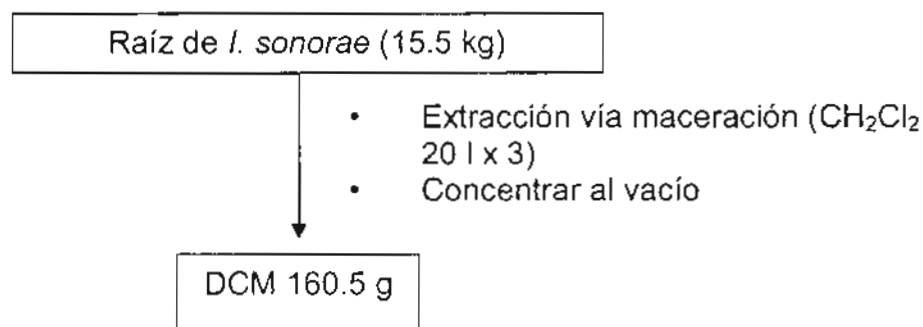


Figura 10. Obtención del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae*.

### 5.1.3. Estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM

#### 5.1.3.1. Material cromatográfico

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice, Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF), tanto analíticos como preparativos se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio o aluminio recubiertas de sílica gel (Sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck), además de varios eluyentes.

Los agentes cromógenos utilizados para revelar los compuestos se incluyen en la Tabla 1 y también se visualizó con luz ultravioleta (UV).

Tabla 1. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
Vainillina	Vainillina etanólica al 1%	Wagner y col., 1984.
Dragendorff	Ácido sulfúrico etanólico al 5% 2.6 g carbonato de bismuto básico 7 g yoduro de sodio 25 ml ácido acético glacial 89 ml acetato de etilo 0.5 ml agua	Stahl, 1969.
Sulfato cérico	12 g sulfato cérico 22.2 ml ácido sulfúrico concentrado 350 g hielo	Stahl, 1969.
Tricloruro de hierro	Tricloruro de hierro-acuoso al 10%	Wagner y col., 1984.

Para el desarrollo de color es necesario calentar durante dos minutos a 110 °C.



### 5.1.3.2. Fraccionamiento biodirigido

Una parte del extracto de DCM (90 g) se sometió a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria sílica gel (612 g) y como eluyentes hexano/ $\text{CHCl}_3$ /AcOEt/MeOH y mezclas de estos disolventes. Se obtuvieron un total de 254 fracciones (250 ml c/u) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica y así obtener diez fracciones primarias (FP1-FP10), las cuales fueron sometidas a pruebas biológicas para evaluar su actividad hipoglucemiante.

En la Tabla 2 se resume el fraccionamiento primario y se incluyen el eluyente empleado, la proporción del disolvente(s), el número de fracciones, fracciones combinadas y el rendimiento de las fracciones en g.

Una parte de la fracción primaria más activa FP9 (35.0 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria sílica gel (500 g) y como eluyentes  $\text{CHCl}_3$ : AcOEt: MeOH. Se obtuvieron un total de 530 fracciones (50 ml c/u), reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica, hasta obtener así 5 fracciones secundarias: FS1/FS5. En la Tabla 3 se resume el fraccionamiento secundario y se incluyen los eluyentes empleados, el número de fracciones, fracciones combinadas. Y el rendimiento de las fracciones en g.

En el caso de la fracción FS1 (1.5 g) se empleó sílica gel (1.9 g) y como eluyentes  $\text{CHCl}_3$ / AcOEt, obteniendo dos mezclas de compuestos: una mezcla de monoglicéridos (MG, 1-11, 348.0 mg) y una mezcla de 5 ácidos grasos (AG, 12-16, 702.7 mg).

Tabla 2. Resumen del fraccionamiento primario del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae*.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (V/V)	NÚMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	RENDIMI ENTO EN g
Hexano	(100)	1-23	FP1 (1-15)	4.8
Hexano:CHCl <sub>3</sub>	(97:3)	24-39	FP2 (16-123)	9.0
Hexano:CHCl <sub>3</sub>	(90:10)	40-55		
Hexano:CHCl <sub>3</sub>	(80:20)	56-71		
Hexano:CHCl <sub>3</sub>	(70:30)	72-87		
Hexano:CHCl <sub>3</sub>	(60:40)	88-103		
Hexano: CHCl <sub>3</sub>	(50:50)	104-135	FP3 (124-155)	1.0
Hexano:CHCl <sub>3</sub>	(25:75)	136-199	FP4 (156-198)	4.0
			FP5 (199-215)	20.6
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	(70:30)	200-235	FP6 (216-233)	3.4
			FP7 (234-236)	1.3
AcOEt:MeOH	(80:20)	236-254	FP8 (237-238)	5.2
			FP9 (239-244)	39.5
			FP10 (245-254)	2.8

Tabla 3. Resumen del fraccionamiento de la fracción primaria FP9

ELUYENTE	PROPORCIÓN (V/V)	NÚMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	RENDIMI ENTO EN g
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	(90:10)	1-46	FS1 (1-232)	2.3
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	(80:20)	47-86		
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	(70:30)	87-206		
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	(60:40)	207-356	FS2 (233-405)	4.3
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	(30:70)	357-411	FS3 (406-421)	1.7
AcOEt:MeOH	(50:50)	412-520	FS4 (422-514)	5.7
AcOEt:MeOH	(75:25)	521-530	FS5 (515-530)	7.0

#### **5.1.4. Caracterización de los compuestos aislados del estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae***

##### **5.1.4.1. Equipo utilizado para la caracterización estructural de los compuestos**

Los espectros en el IR (pastilla de KBr) se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 599. Los espectros de RMN se obtuvieron en los siguientes equipos: Varian Unity Plus 300, Unity Plus 500 y Bruker DMS 500, utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y TMS como referencia interna. RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz y 500 MHz) y RMN- $^{13}\text{C}$  (300 MHz y 500 MHz). Los experimentos de CG acoplada a EM (CG-EM) fueron realizados en un espectrómetro de masas JEOL SX-102 A, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890-II. La columna empleada fue de fenil metil silicón (30 cm X 0.3 mm i.d.) de 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor. Se utilizó He como gas acarreador. La columna se manejó a temperaturas programadas de 180 a 300°C con incrementos de 8°C/min. Las temperaturas del detector e inyector fueron de 300°C; la energía de ionización fue de 70 eV. Los parámetros de los espectros de masas fueron programadas con un software Hewlett-Packard. Las masas detectadas fueron de 33-800au.

##### **5.1.4.2. Identificación de los compuestos obtenidos del fraccionamiento biodirigido**

Al realizar el fraccionamiento del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* se aislaron dos grupos de compuestos, que fueron identificados mediante métodos cromatográficos, espectroscópicos, espectrométricos y químicos.

#### 5.1.4.3. Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la mezcla de MG.

*Mezcla de 1-monoglicéridos* (MG, 1-11): Aceite sin color. IR (KBr):  $\nu_{\max} = 3412, 2921, 2850, 1725, 1462, 1365, 1220, 1179, 720 \text{ cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  0.88 (3H, t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , terminal  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (Sa,  $n\text{CH}_2$ ), 2.33 (2H, t,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 3.59 (1H, dd,  $J = 11.5, 6 \text{ Hz}$ , H-3b), 3.70 (1H, dd,  $J = 11.5, 4 \text{ Hz}$ , H-3a), 3.93 (1H, m, H-2), 4.14 (1H, dd,  $J = 11.5, 6 \text{ Hz}$ , H-1b), 4.19 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.9 \text{ Hz}$ , H-1a). RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  14.1 (terminal  $\text{CH}_3$ ), 29.6 ( $n\text{CH}_2$ ), 31.8, 24.8, 22.6 (carbonos de la cadena alquílica), 34.1 ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 63.3 (C-3), 65.1 (C-1), 70.2 (C-2), 174.3 ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ).

#### 5.1.4.4. Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la mezcla de AG

*Mezcla de ácidos grasos* (AG, 12-16): Residuo blanco (hexano). IR (KBr):  $\nu_{\max} = 3300, 2920, 2850, 1750, 1450, 1240, 720 \text{ cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  0.88 (3H, t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , terminal  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (Sa,  $n\text{CH}_2$ ), 2.34 (2H, t,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ). RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  14.1 (terminal  $\text{CH}_3$ ), 29.7 ( $n\text{CH}_2$ ), 31.9, 24.6, 22.6 (carbonos de la cadena alquílica), 33.9 ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 175.3 ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ).  $t_R$  (min), GCMS (70 eV):  $m/z$  (rel. int.)= (7.55 min), 200  $[\text{M}_{12}]^+$  (50); (8.27), 228  $[\text{M}_{13}]^+$  (70); (8.58), 242  $[\text{M}_{14}]^+$  (100); (8.96), 256  $[\text{M}_{15}]^+$  (100); (9.55), 284  $[\text{M}_{16}]^+$  (100). Todos los espectros de masas muestran el patrón de fragmentación característico para un AG de cadena larga: 60, 43, 41.

#### 5.1.4.5. Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la mezcla de MEAG

Mezcla de metilesteres de ácidos grasos (MEAG, 37-47): Aceite incoloro ( $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr):  $\nu_{\text{max}} = 2923, 2853, 1731, 1463, 1270, 725 \text{ cm}^{-1}$ . RMN-  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  0.87 (3H, t,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ , terminal  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (Sa,  $n\text{CH}_2$ ), 2.29 (2H, t,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ), 3.66 (3H, s,  $\text{CO}_2-\text{CH}_3$ ).  $t_R$  (min), CG-EM (70 eV):  $m/z$  (rel. int.) = (8.99 min), 270  $[\text{M}_{17}]^+$  (13); (9.55), 284  $[\text{M}_{18}]^+$  (80); (10.10), 298  $[\text{M}_{19}]^+$  (78); (10.62), 312  $[\text{M}_{20}]^+$  (5); (11.13), 326  $[\text{M}_{21}]^+$  (5); (12.20), 354  $[\text{M}_{22}]^+$  (100); (12.79), 368  $[\text{M}_{23}]^+$  (13); (13.47), 382  $[\text{M}_{24}]^+$  (42); (14.22), 396  $[\text{M}_{25}]^+$  (100); (15.13), 410  $[\text{M}_{26}]^+$  (100); (17.55), 438  $[\text{M}_{27}]^+$  (75). Todos los espectros de masas muestran el patrón de fragmentación característico para un MEAG de cadena larga: 74, 43, 41.

#### 5.1.4.6. Hidrólisis alcalina de la mezcla de MG

Una muestra de MG (40 mg) se disolvió en NaOH metanólico (0.5 N, 2 ml) posteriormente se sometió a reflujo de  $40^\circ\text{C}$  por 5 h, a la mezcla de reacción se le adicionaron 2.5 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{BF}_3$  y se continuó el calentamiento durante 15 min. Para recuperar a los esterres de los AG la mezcla fue diluida con  $\text{H}_2\text{C}$  (5 ml) y extraída con  $\text{CHCl}_3$  (3 x 5 ml). La fracción orgánica resultante fue lavada con  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 5 ml) y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El disolvente se evaporó para obtener mezcla de MEAG como un aceite incoloro (20 mg) (OAO, 1995; Mata y col., 1991).

## **5.2. Experimentos farmacológicos**

### **5.2.1. Animales de experimentación**

Se trabajó con ratones (*Mus musculus*) cepa CD-1, machos, adultos, de 25 a 40 g de peso corporal y ratas (*Ratus norvegicus*) cepa Wistar, machos, adultos, de 220 a 400 g de peso corporal. Los animales de experimentación fueron alimentados con nutricubos para roedores y agua *ad libitum*, mantenidos en condiciones óptimas en el bioterio de la UAM-I, en cuanto a iluminación, temperatura y vivienda. Alojados en condiciones uniformes, clínicamente sanos, acorde a las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (Diario Oficial, 2001).

### **5.2.2. Efecto hipoglucémico agudo producido por los extractos de DCM, ME, A y LJ en ratones sanos**

Se formaron 7 grupos de 6 animales cada uno. Al grupo A1 se le administró solución salina isotónica (SSI); al grupo A2 se le administró aceite de maíz; al grupo A3 se le administró tolbutamida (Artosin, tabletas de 500 mg, Roche) como control positivo (150 mg/kg); a los grupos A4 y A5 se les administraron los dos extractos acuosos y a los grupos A6 y A7 los dos extractos orgánicos a dosis de 300 y 600 mg/kg. Los ensayos biológicos se realizaron de la siguiente forma:

- 1) Antes de cada estudio los ratones se sometieron a un ayuno de 18 h y se pesaron.
- 2) Se determinó la glucemia inicial (t=0).
- 3) Se administraron las diferentes sustancias descritas en el paso anterior por vía ip.
- 4) Se determinó la glucemia a los 120, 240 y 360 minutos después de la

administración de las sustancias, en muestras sanguíneas obtenidas por punción de la punta de la cola de los animales. La cuantificación de la glucemia se realizó con tiras reactivas Accutrend Sensor Comfort Glucose, en un glucómetro Accutrend Sensor (Roche).

### **5.2.3. Efecto hipoglucémico agudo producido por el extracto de DCM en ratones con diabetes experimental**

La diabetes se les indujo a los animales mediante la administración intravenosa (iv) de aloxana (aloxana monohidratada (2, 4, 5, 6-(1H, 3H)-pirimidinetetróna, Sigma-Aldrich) a dosis de 75 mg/kg, en días alternados (Rodríguez y col., 1975). Después de un periodo de estabilización de una semana se les determinó la glucemia postprandial. Los animales con valores de glucemia  $\geq 200$  mg/dL fueron considerados diabéticos.

Se formaron 4 grupos: al grupo B1 con 12 ratones se les administró aceite de maíz; al grupo B2 con 6 ratones se les administró tolbutamida como control positivo (150 mg/kg); a los grupos B3 y B4 con 6 y 8 ratones respectivamente se les administró el extracto de DCM (300 y 600 mg/kg). Las sustancias se administraron por vía ip. Los ensayos biológicos se realizaron de la misma forma que en los ratones sanos.

### **5.2.4. Estudio toxicológico agudo del extracto de DCM en ratones sanos**

El estudio toxicológico se realizó en ratones sanos, divididos en 2 grupos. El grupo 1, integrado por 50 ratones divididos al azar en 5 subgrupos (T1, T2, T3, T4 y T5), fue tratado con el extracto de DCM a 5 diferentes dosis (357, 406, 463, 527 y

1000 mg/kg) por vía ip. El grupo 2, dividido en 5 subgrupos (TI, TII, TIII, TIV y TV) se estudió de la misma forma que el grupo anterior, pero la administración del extracto fue por vía intragástrica (ig) (1600, 2158, 2328, 2515 y 2883 mg/kg). El control integrado por 10 ratones, los cuales fueron tratados con aceite de maíz. En todos los grupos de animales se midió la temperatura rectal al inicio (t=0), y a los 120, 240 y 360 minutos después de la administración de las sustancias. La latencia de muerte y el número de muertes fue registrada durante las primeras 6 h y cada 24 h durante los 8 días siguientes del estudio. La DL<sub>50</sub> fue calculada por el método de Litchfield y Wilcoxon con los límites de confianza al 95% (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

#### **5.2.5. Efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM en ratas con diabetes inducida con aloxana**

Para el estudio en ratas con diabetes experimental se formaron 3 grupos de 10 ratas cada uno. Al grupo CI se le administró aceite de maíz, al grupo CII, tolbutamida a dosis de 150 mg/kg. Al grupo CIII, el extracto de DCM a razón de 300 mg/kg. La administración fue por vía ig aplicada diariamente con ayuda de una cánula metálica, durante 6 semanas (en un volumen de 4 ml/kg). Se hicieron determinaciones de glucosa en sangre a los 1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días (n=10) y a los 1, 14, 28 y 42 días (n=4) de ácido úrico, colesterol total, transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y triglicéridos. La glucosa se determinó a los 0, 120, 240 y 360 min después de la administración de las sustancias. El peso corporal se midió cada 7 días.

Para la cuantificación de la glucemia, las muestras de sangre se obtuvieron por



punción de la cola de los animales y se realizó como se describió anteriormente. Para la determinación cuantitativa de ácido úrico, colesterol total, TGO, TGP, triglicéridos las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardiaca, previa anestesia con éter etílico. El plasma fue separado inmediatamente por centrifugación a 756 x g por 10 min y fueron cuantificadas usando tiras reactivas en el aparato Reflotrón (Roche).

#### **5.2.6. Efecto hipoglucémico de las fracciones primarias y secundarias en ratones sanos y con diabetes experimental**

El efecto hipoglucémico de las fracciones fue evaluado usando el método previamente descrito para los extractos. La actividad de las fracciones primarias (FP1-FP10) y de las fracciones secundarias (FS1-FS5) se estudió en ratones sanos y sólo las fracciones activas se evaluaron en ratones con diabetes experimental. Los ratones (n=6 por grupo) fueron tratados por vía ip con cada muestra; las fracciones primarias (300 mg/kg en 4 ml/kg de aceite de maíz), las fracciones secundarias (150 mg/kg en 4 ml/kg de aceite de maíz), el control (aceite de maíz, 4 ml/kg), y el control positivo (150 mg/kg de tolbutamida en 4 ml/kg de SSI). Los ensayos biológicos se realizaron de la misma forma descrita anteriormente, determinando la glucemia a los 0, 120 y 240 min.

#### **5.2.7. Efecto hipoglucémico de la mezcla de los AG y MG en ratones con diabetes experimental**

La actividad de la mezcla de AG y MG se estudiaron en ratones con diabetes experimental. Los ratones (n=6 por grupo) fueron tratados por vía ip con cada

muestra: AG y MG (75 mg/kg en 4 ml/kg de aceite de maíz, respectivamente), control (aceite de maíz, 4 ml/kg), y tolbutamida (150 mg/kg en 4 ml/kg de SSI). Los ensayos biológicos se realizaron de la misma forma descrita anteriormente, determinando la glucemia a los 0, 120 y 240 min.

#### **5.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como media ( $\bar{X}$ )  $\pm$  error estándar de la media (EEM). La diferencia entre los estudios se evaluó con la prueba de t de Student, con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) (Steel y Torrie., 1989). Los resultados también se analizaron por un análisis de varianza de una vía y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer usando el software NCSS. Una  $p < 0.05$  se consideró significativa.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de obtener las raíces y una vez sometidos a los procesos de secado y molienda se prepararon los correspondientes extractos, DCM, ME, A y LJ, mediante los procesos de maceración los dos primeros y decocción el tercero. La selección de los disolventes de extracción se decidió haciendo las siguientes consideraciones; el metanol porque es un disolvente polar que permite obtener compuestos de baja, mediana y alta polaridad; el DCM porque es un disolvente de mediana polaridad que permite obtener compuestos de baja y mediana polaridad; en el caso del agua y el jugo porque es la forma más usual en la que la población prepara esta raíz. El estudio de las variaciones de la glucemia basal en animales sanos, como respuesta a determinada sustancia, representa el método más sencillo en la investigación de plantas con probable actividad hipoglucemiante. La escasa variabilidad de los valores de glucosa sanguínea obtenidas en ayuno, indica la uniformidad de los datos al inicio de los experimentos. Estudios previos realizados con la preparación tradicional de *I. sonorae* mostraron que reduce la glucemia en animales de experimentación de manera dosis dependiente. Las dosis administradas fueron de 150, 300, 600 y 850 mg/kg (Alarcón y col., 2002<sup>a</sup>). Aunque la dosis administrada diaria a pacientes diabéticos es claramente menor (75 mg/kg) que la usada en animales de experimentación, en este estudio se decidió usar dosis intermedias, porque el objetivo era detectar la actividad hipoglucemiante causada por los extractos en ratones sanos y con diabetes experimental.

### **6.1. Efecto hipoglucémico de los extractos de DCM, ME, A y LJ en ratones sanos**

Una vez preparados los extractos se sometieron a un rastreo de actividad hipoglucemiante en animales sanos. En la Tabla 4 se muestra el efecto hipoglucémico producido por la administración ip de las diferentes muestras de la raíz de *I. sonorae* a dosis de 300 y 600 mg/kg de peso corporal en ratones sanos. Los valores de la glucemia inicial en el grupo control con SSI ( $69.9 \pm 3.3$  mg/dl), permanecieron prácticamente constantes durante todo el estudio, no existiendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a este valor. Algo similar ocurrió en el grupo control con aceite de maíz, cuya glucemia basal fue de  $56.2 \pm 4.9$  mg/dl, sin registrar variación significativa durante el estudio después de su administración con 0.4% de disminución de la glucemia.

En cambio, en el grupo con administración de tolbutamida, partiendo de una glucemia basal de  $61.6 \pm 2.7$  mg/dl, se observó un descenso estadísticamente significativo de la glucemia a las 2 y 6 h, con un un descenso de 14.9% a las 6 h.

La dosis de 300 mg/kg del extracto de DCM produjo un descenso significativo de los niveles de glucosa en sangre con respecto a los dos grupos control (aceite de maíz y tolbutamida) ( $p < 0.05$ ) al minuto 360. A esta dosis ninguno de los extractos (ME, A, LJ) produjo descensos significativos con respecto al control.

La administración de 600 mg/kg del extracto A y la misma dosis del extracto de DCM produjeron descensos estadísticamente significativos de la glucemia a los 240 y 360 minutos, con respecto a los tres grupos control (SSI, aceite de maíz y tolbutamida).

Todos los extractos estudiados a dosis de 600 mg/kg produjeron descensos significativos de los niveles de glucosa en sangre con respecto al grupo control con SSI ( $p < 0.05$ ) en el minuto 360. Encontrándose que a esta dosis el extracto con mayor actividad resultó ser el DCM con un 70.9% de disminución de la glucemia al minuto 360.

Tabla 4. Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de SSI, aceite de maíz, tolbutamida y los extractos de DCM, ME, A y LJ de *I. sonorae* en ratones sanos (n=6 por grupo).

GRUPO	DOSIS	Glucemia mg/dl ( $\bar{X} \pm EEM$ )			
		0 min	120 min	240 min	360 min
Control (SSI)	4 ml/kg	69.9 $\pm$ 3.3	69.0 $\pm$ 4.6	72.1 $\pm$ 2.9	63.7 $\pm$ 3.4
Control (Aceite de maíz)	4 ml/kg	56.2 $\pm$ 4.9	61.3 $\pm$ 4.8	67.8 $\pm$ 5.5	56.0 $\pm$ 3.8
Tolbutamida (n=6) LJ	150 mg/kg	61.6 $\pm$ 2.7	54.3 $\pm$ 2.9*	56.8 $\pm$ 3.0	52.4 $\pm$ 2.4*
	300 mg/kg	66.4 $\pm$ 9.3	75.0 $\pm$ 5.0	65.0 $\pm$ 6.2	57.0 $\pm$ 5.4
	600 mg/kg	56.3 $\pm$ 4.9	59.2 $\pm$ 3.4	47.8 $\pm$ 2.7	43.0 $\pm$ 2.6*
Extracto A	300 mg/kg	60.3 $\pm$ 4.2	53.3 $\pm$ 5.1	54.0 $\pm$ 2.8	53.8 $\pm$ 4.2
	600 mg/kg	63.5 $\pm$ 1.2	67.0 $\pm$ 1.5	48.4 $\pm$ 3.0*	38.2 $\pm$ 3.2*
Extracto de ME	300 mg/kg	59.0 $\pm$ 6.4	60.4 $\pm$ 3.9	58.0 $\pm$ 2.2	54.6 $\pm$ 3.5
	600 mg/kg	53.6 $\pm$ 1.2	65.8 $\pm$ 3.2	49.8 $\pm$ 2.7	41.6 $\pm$ 4.4*
Extracto de DCM	300 mg/kg	66.6 $\pm$ 3.9	68.2 $\pm$ 6.1	71.3 $\pm$ 4.0	46.0 $\pm$ 4.6*
	600 mg/kg	68.8 $\pm$ 6.6	60.2 $\pm$ 7.7	35.2 $\pm$ 5.4*	20.0 $\pm$ 1.1*

\*Diferencia significativa con respecto a la glucemia inicial:  $p < 0.05$ .

En este primer experimento los resultados mostraron que la decoccion y el jugo de la raíz causan el mismo efecto hipoglucémico en ratones sanos. Por lo tanto, la actividad hipoglucemiante de *I.sonorae* es causada por sustancias que naturalmente existen en la raíz que no se desnaturalizan por el calor. Por esta razón, la raíz de la planta intacta fue usada para obtener los extractos. De acuerdo con los resultados, el extracto de DCM causa una severa hipoglucemia en ratones sanos en ayuno, por lo que este extracto fue seleccionado para estudiar el efecto hipoglucémico administrado durante 42 días en ratas, así como el estudio toxicológico en ratones sanos.

## **6.2. Efecto hipoglucémico del extracto de DCM en ratones con diabetes experimental**

El efecto hipoglucémico producido por la administración ip del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* a dosis de 300 y 600 mg/kg de peso corporal en ratones diabéticos se observa en la Tabla 5. Las glucemias iniciales oscilaron de  $400.7 \pm 18.4$  a  $444.0 \pm 25.0$ . Los valores de la glucemia en el grupo control con aceite de maíz, permanecieron prácticamente constantes durante todo el estudio, no existiendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia inicial. La administración del extracto a dosis de 300 mg/kg produjo descensos altamente significativos de la glucemia del 78.7 % al minuto 240. El porcentaje de disminución a dosis de 600 mg/kg al minuto 240, fue de 76.1%. El extracto de DCM redujo marcadamente los niveles de glucosa en sangre en ratones con diabetes experimental después de su administración ip causando severa hipoglucemia e incluyendo convulsiones generalizadas y subsecuentemente la

muerte de todos los animales estudiados entre los 240 y 360 min. . Por este motivo se decidió realizar los siguientes estudios hasta el minuto 240.

Tabla 5. Efecto sobre la glucemia producida por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y el extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en ratones con diabetes experimental.

GRUPO	DOSIS	Glucemia mg/dl ( $\bar{X} \pm EEM$ )			
		0 min	120 min	240 min	360 min
Control (Aceite de maíz) (n=12)	4 ml/kg	410.3 ± 18.4	422.0 ± 15.8	396.2 ± 20.5	370.4 ± 13.4
Tolbutamida (n=6)	150 mg/kg	403.0 ± 11.6	333.5 ± 23.0*	330.8 ± 14.0*	315.6 ± 18.6*
Extracto de DCM (n=6)	300 mg/kg	444.0 ± 25.0	333.6 ± 38.9*	94.5 ± 9.8*	-
Extracto de DCM (n=8)	600 mg/kg	400.7 ± 18.4	217.2 ± 36.5*	95.6 ± 23.6*	-

\*Diferencia significativa con respecto al control:  $p < 0.05$ .

### 6.3. Estudio toxicológico agudo del extracto de DCM en ratones sanos

El estudio toxicológico por vía ip demostró que la  $DL_{50}$  es de 455.34 mg/kg (Tabla 6). Los valores de la temperatura en la grupo control con aceite de maíz ( $29.9 \pm 2.5$  °C) permanecieron prácticamente constantes durante el estudio, no existiendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a la temperatura inicial.

La administración de las diferentes dosis del extracto de DCM (356.69, 406.20, 462.59, 526.74 y 1000 mg/kg, ip) produjo un descenso estadísticamente significativo y dosis dependiente de la temperatura ( $p < 0.05$ ). La  $DL_{50}$  obtenida por la administración ig fue de 2158.0 mg/kg. El descenso de la temperatura de

las diferentes dosis (1600, 2158, 2328.49, 2515.46 y 2883.20 mg/kg, ig) se muestra en la Tabla 7, donde se observa también un descenso de la temperatura dosis dependiente estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

En general los ratones no mostraron signos de toxicidad, los efectos letales producidos por el extracto de DCM pueden explicarse por una severa hipoglucemia observada por las dos vías de administración. El análisis toxicológico indicó que el extracto de DCM corresponde al índice toxicológico nivel 3 (moderadamente tóxico) (Clinical Toxicology of Commercial Products, 1995), por lo que se puede concluir que los compuestos activos presentes en el extracto de DCM tienen un bajo perfil toxicológico.

En este estudio, los efectos adversos y la mortalidad fueron notados solamente después de la administración ip e ig a dosis relativamente altas del extracto de DCM en los ratones. Sin embargo, el valor de la  $DL_{50}$  por la vía ig es muy alta, por lo que es poco probable que ocurra toxicidad en el humano por el consumo de los extractos crudos de *I. sonorae* por esta vía. No obstante, es necesario realizar los estudios toxicológicos con la administración crónica del extracto.



Tabla 6. Curso temporal de la temperatura producido por la administración ip de aceite de maíz y el extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en ratones sanos (n=10 por grupo).

GRUPO	DOSIS	Temperatura °C ( $\bar{X} \pm$ EEM)			
		0 min	120 min	240 min	360 min
Control (Aceite de maíz)	4 ml/kg	29.9 $\pm$ 2.5	30.3 $\pm$ 1.3	31.3 $\pm$ 1.3	30.9 $\pm$ 1.2
Extracto de DCM	357 mg/kg	30.7 $\pm$ 1.0	30.9 $\pm$ 0.7	30.9 $\pm$ 0.4	29.9 $\pm$ 0.7*
Extracto de DCM	406 mg/kg	31.2 $\pm$ 0.9	27.1 $\pm$ 1.2*	27.9 $\pm$ 1.8*	27.5 $\pm$ 3.1*
Extracto de DCM	463 mg/kg	32.1 $\pm$ 0.5	28.2 $\pm$ 0.9*	28.3 $\pm$ 1.1*	27.3 $\pm$ 1.0*
Extracto de DCM	527 mg/kg	30.8 $\pm$ 0.8	28.3 $\pm$ 2.3*	26.6 $\pm$ 2.3*	26.1 $\pm$ 2.9*
Extracto de DCM	1000 mg/kg	30.4 $\pm$ 0.6	28.7 $\pm$ 0.4*	27.4 $\pm$ 2.0*	25.7 $\pm$ 1.8*

\*Diferencia significativa con respecto al control: p<0.05 prueba de t.

Tabla 7. Curso temporal de la temperatura producido por la administración ig del control (aceite de maíz) y el extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en ratones sanos (n=10 por grupo).

GRUPO	DOSIS	Temperatura °C ( $\bar{X} \pm$ EEM)			
		0 min	120 min	240 min	360 min
Control (Aceite de maíz)	4 ml/kg	28.0 $\pm$ 1.9	27.7 $\pm$ 3.7	29.0 $\pm$ 1.5	29.8 $\pm$ 1.0
Extracto de DCM	1600 mg/kg	28.7 $\pm$ 0.4	26.9 $\pm$ 0.4*	26.4 $\pm$ 1.1*	26.2 $\pm$ 1.0*
Extracto de DCM	2158 mg/kg	27.4 $\pm$ 3.5	23.9 $\pm$ 2.0*	24.8 $\pm$ 2.0	24.8 $\pm$ 3.2
Extracto de DCM	2328 mg/kg	28.4 $\pm$ 2.0	23.0 $\pm$ 3.0*	22.7 $\pm$ 1.8*	22.9 $\pm$ 2.7*
Extracto de DCM	2512 mg/kg	28.0 $\pm$ 2.9	23.4 $\pm$ 1.8*	21.7 $\pm$ 1.9*	21.6 $\pm$ 1.7*
Extracto de DCM	2883 mg/kg	29.7 $\pm$ 1.7	22.9 $\pm$ 2.5*	21.6 $\pm$ 2.1*	21.6 $\pm$ 1.6*

\*Diferencia significativa con respecto al control: p<0.05 prueba de t.

#### **6.4. Efecto hipoglucémico producido por la administración diaria del extracto de DCM a ratas con diabetes inducida con aloxana**

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la glucemia, peso, ácido úrico, colesterol total, TGO, TGP y triglicéridos después de la administración diaria del extracto de DCM a ratas con diabetes experimental, se observa que el grupo control (aceite de maíz) presentó una glucemia al inicio del estudio de  $345.3 \pm 48.2$  y se incrementó a  $505.9 \pm 41.7$  mg/dl a los 42 días ( $p < 0.05$ ); en este grupo también hubo un incremento en los triglicéridos de  $77.3 \pm 8.48$  a  $261.5 \pm 69.8$ . El peso corporal se redujo de  $291.3 \pm 28.7$  a  $246.5 \pm 40.4$ , y no mostró cambios importantes en los niveles de colesterol total, TGO, TGP, ni ácido úrico. El grupo tratado con tolbutamida también mostró incremento en la glucemia y en los triglicéridos pero la diferencia no fue significativa. En los demás parámetros bioquímicos no hubo cambios significativos durante los 42 días de tratamiento con este hipoglucemiante oral. El grupo tratado con el extracto de DCM, moderadamente redujo la glucemia de  $355.9 \pm 37.5$  a  $307.5 \pm 53.4$  y hubo un importante incremento en el peso de  $285.2 \pm 35.4$  a  $335.8 \pm 27.3$ , ambos parámetros fueron significativos con respecto a los dos grupos control. Los niveles de colesterol, TGO, TGP no mostraron modificaciones importantes después de los 42 días de tratamiento con el extracto de DCM. El ácido úrico se incrementó de  $2.20 \pm 0.24$  a  $3.35 \pm 0.49$  mg/dl. Los niveles de triglicéridos disminuyeron moderadamente. Los datos que se presentan fueron compilados de los animales que sobrevivieron durante el periodo experimental, porque algunos animales murieron debido a la anestesia con éter o por la punción cardiaca, maniobras realizadas para la obtención de las muestras sanguíneas.

Es evidente el efecto protector de este extracto en la severidad gradual de la diabetes experimental inducida a ratas. La administración diaria ig del extracto de DCM incrementó el peso corporal y moderadamente redujo la glucemia, observándose un mejoramiento en el estado diabético de estos animales después de compararlos con los grupos control negativo y positivo. Los niveles de triglicéridos en el grupo control y el grupo tratado con tolbutamida se incrementó con el tiempo. Sin embargo, en los animales tratados con el extracto de DCM, los niveles de triglicéridos cambiaron moderadamente durante los 42 días del experimento. Estos resultados en combinación con lo observado en el aumento de peso corporal y en la reducción de la glucemia por la administración del extracto de DCM, sugiere que la actividad hipoglucemiante de la planta podría ser explicada como un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina y/o por la reducción de la resistencia a la insulina. En estudios previos se determinó que la preparación tradicional de *I. sonorae* reduce la glucemia en animales sanos y con diabetes moderada (con células  $\beta$  funcionales), pero no en animales con diabetes severa (sin células  $\beta$  funcionales). Por lo tanto es necesario tener insulina endógena para observar la actividad hipoglucemiante de *I. sonorae*. Los valores de TGO también se incrementaron en el grupo control, pero no en el de tolbutamida ni en el grupo tratado con el extracto de DCM. Los niveles anormales en plasma de TGO y TGP son de importancia clínica y toxicológica, e indican que el tejido está dañado por condiciones de la enfermedad o como consecuencia de un tóxico (Singh y col., 2001). La diabetes experimental inducida con aloxana en ratas causa daño en el tejido del páncreas, riñón, hígado y corazón, lo cual puede ser reflejado en el incremento de TGO y TGP (Rerup, 1970; Stanely y col., 2000;

Singh y col., 2001). El extracto de DCM y la tolbutamida no produjeron cambios en los niveles de TGO. Además, el extracto de DCM significativamente redujo los niveles plasmáticos de TGP con respecto al grupo control. Cabe señalar, por otro lado, que después de 42 días de tratamiento con el extracto de DCM algunos animales mostraron diarrea y decremento en la actividad motora. No hubo alteraciones macroscópicas en el hígado, ni en el riñón en ningún grupo, pero sí inflamación del colon, principalmente en los animales tratados con el extracto de DCM.

Aunque no hay muchas plantas Cucurbitáceas usadas como remedios antidiabéticos en el mundo, algunos géneros han sido mencionados: *Benincasa*, *Bryonia*, *Citrullus*, *Coccinia*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Melothria*, *Momordica* y *Trichosanthes* por Marles y Farnsworth (1995). Estos géneros conforman alrededor de 30 especies diferentes, 12 de las cuales han mostrado actividad hipoglucemiante en ensayos experimentales y clínicos. Cabe señalar que varias de estas especies han sido asociadas con algún efecto tóxico (Marles y Farnsworth, 1995; De Smet, 1997; Perez y col., 1998<sup>b</sup>; Jayasooriya y col., 2000; Abdel-Hassan y col., 2000). Tal es el caso de *Bryonia alba* Linn., *B. dioica* Jacq., *Coccinia cordifolia* (L.) Cogn., *C. indica*, *Trichosanthes dioica*, y *T. kirilowii* Maxim. Las raíces de estas plantas fueron evaluadas experimentalmente y las únicas que no mostraron efectos tóxicos fueron aquellas provenientes de *C. cordifolia* y *T. dioica* (Marles y Farnsworth, 1995). De algunas de estas especies también se han aislado algunos principios activos, tales como ácido trihidroxiocetadecadienoico de *Bryonia alba*, pectina; un alcaloide cuaternario de *Coccinia indica*, una mezcla de dos glucoesteroides de *Momordica foetida* Schumacher & Thonn. La charantina fue

aislada primeramente de *Momordica charantia* Linn., la planta medicinal más ampliamente utilizada en el control de la DM y una de las plantas antidiabéticas más estudiadas a nivel mundial (Karunanayake y col., 1984, 1990; Welihinda y Karunanayake, 1986; Ali y col., 1993; Tennekoon y col., 1994; Marles y Farnsworth, 1995; De Smet, 1997; Perez y col., 1998<sup>b</sup>).

La literatura indica también que hay varios compuestos aislados de las especies Cucurbitaceae, algunos de los cuales tienen efecto hipoglucémico, y algunas veces son también considerados agentes tóxicos. La presencia de alcaloides, flavonas, saponinas, esteroides, fenoles, triterpenos cucurbitacina y otros semejantes a la insulina, también se han reportado para esta familia (Marles y Farnsworth, 1995; Alarcon y col., 2002<sup>a</sup>; Alarcon y col., 2002<sup>b</sup>; Hernandez y col., 2002<sup>a</sup>).

Tabla 8. Efecto de la administración diaria del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* sobre varios parámetros bioquímicos ( $\bar{X}$  + EEM) en ratas con diabetes experimental.

GRUPO	Tiempo (Días)	n	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	Ácido Úrico° (mg/dl)	TGO° (UI)	TGP° (UI)	Colesterol total° (mg/dl)	Triglicérido s° (mg/dl)	
Control (4ml/kg)	0	10	291.3±28.7	345.3±48.2	2.72±0.46	136.8±40.1	106.7±56.8	101.5±1.1	77.3±8.48	
	14	9	308.1±30.8	413.8±49.2	2.18±0.24	136.7±27.2	114.0±14.1	116.3±5.5	262.4±76.7 <sup>§</sup>	
	28	7	276.9±17.9	460.8±64.2	2.66±0.33	71.1±26.0	120.0±59.5	103.3±2.4	189.6±85.9	
	42	7	246.5±40.4	505.9±41.7 <sup>§</sup>	2.75±0.61	122.1±40.0	149.5±53.5	101.5±1.2	261.5±69.8 <sup>§</sup>	
	Tolbutamida (150 mg/kg)	0	10	258.2±27.1	310.4±27.1	2.18±0.24	76.2±9.80	77.4±18.1	<100	88.3±21.1
		14	8	234.5±22.8 <sup>*</sup>	338.1±19.3	2.17±0.11	67.3±15.0	53.8±12.2	<100	80.8±12.4 <sup>*</sup>
28		6	246.5±37.8	424.0±39.9 <sup>§</sup>	2.00±0.11 <sup>*</sup>	63.6±23.1	60.0±21.5	<100	75.3±3.2	
Extracto de DCM (300 mg/kg)	42	4	260.3±21.9	404.3±66.4	2.00±0.10 <sup>*</sup>	65.3±17.0	65.5±3.30	<100	154.3±61.8	
	0	10	285.2±35.4	355.9±37.5	2.20±0.24	66.4±8.09	77.1±15.0	<100	92.0±22.0	
	14	9	328.2±27.9 <sup>#</sup>	324.4±38.0	2.07±0.08	60.46±5.9	58.5±6.35	<100	70.9±0.87 <sup>*</sup>	
Extracto de DCM (300 mg/kg)	28	6	341.3±29.6 <sup>#</sup>	386.7±50.2	2.74±0.60	59.9±8.54	45.6±17.3	<100	85.2±6.69	
	42	6	335.8±27.3 <sup>#</sup>	307.5±53.4 <sup>*</sup>	3.35±0.49 <sup>§</sup>	71.0±5.25	54.5±0.24 <sup>*</sup>	<100	89.0±1.22 <sup>*</sup>	

°  $\bar{X}$  + EEM. de cuatro ratas. \*Diferencia significativa con respecto al control: p<0.05 prueba de t. <sup>§</sup> Diferencia significativa con respecto al valor inicial t=0: p<0.05 prueba de t. <sup>#</sup> Diferencia significativa con respecto a la tolbutamida: p<0.05 prueba de t.

### **6.5. Efecto hipoglucémico de las fracciones primarias y secundarias en ratones sanos y con diabetes experimental**

Otro de los objetivos de esta investigación fue realizar un estudio fitoquímico biodirigido y farmacológico de los compuestos hipoglucemiantes presentes en la raíz de *I. sonorae* con la finalidad de caracterizarlos químicamente. El fraccionamiento del extracto de DCM produjo 10 fracciones primarias, incluyendo la fracción activa FP9. El efecto de las fracciones primarias sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones sanos se observa en la Tabla 9, así como los rendimientos de las fracciones. Los valores de la glucemia en el grupo control con aceite de maíz, permanecen prácticamente constantes durante todo el estudio, no existiendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia inicial.

El grupo con la administración de tolbutamida, partiendo de una glucemia basal de  $47.6 \pm 2.4$  mg/dl mostró descensos estadísticamente significativos de la glucemia a las 2 h. La FP1 produjo un descenso significativo de los niveles de glucosa en sangre al minuto 240. La FP8 produjo descensos estadísticamente significativos de la glucemia a los 120 y 240 minutos, con 32.6% y 38% de disminución de la glucemia, respectivamente. Sin embargo, la FP9 fue la más activa, cambiando el valor de la glucemia inicial de  $48.7 \pm 2.7$  a  $19.1 \pm 3.6$  mg/dl al minuto 240, con 60.8% de disminución de la glucemia.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la administración ip de la FP9 en ratones con diabetes experimental. Se observa que la FP9 causó un decremento significativo de la glucemia comparada con los dos controles (aceite de maíz y tolbutamida) al minuto 240 (de  $366.2 \pm 18.5$  a  $145.9 \pm 31.5$  mg/dl).

El efecto de las fracciones secundarias sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones sanos se observa en la Tabla 10. La tolbutamida causó un decremento significativo de la glucemia del 34.4% al minuto 240. Algo similar ocurre con la FS1, sólo que aquí el efecto fue claramente superior al del hipoglucemiante oral ( $62.4 \pm 5.3$  a  $20.6 \pm 1.4$ ) una reducción del 67.0%.

En la Figura 12 se muestra el efecto hipoglucémico de la FS1 en ratones diabéticos. La FS1 produjo un descenso estadísticamente significativo de la glucemia a los 120 y 240 minutos, con respecto a los grupos control (aceite de maíz y tolbutamida).

#### **6.6. Caracterización de los compuestos aislados del estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae***

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto de DCM de *I. sonorae* condujo al aislamiento de dos mezclas de compuestos, la primera de MG y la segunda de AG. El rendimiento total de cada mezcla fue de 0.012% y 0.025% respectivamente en base al peso seco de la raíz.

La mezcla de AG, se obtuvo como un sólido blanco que se determinó estaba constituida por cinco AG: ácido láurico (12), ácido mirístico (13), ácido pentadecanoico (14), ácido palmítico (15), y ácido esteárico (16). Todos ellos se reportan por primera vez que están contenidos en la raíz de *I. sonorae*.

En el espectro de IR (Anexo 1) se observaron máximos de absorción para C-H a 2920, 2850, 1450 y 720  $\text{cm}^{-1}$ , la última señal es característica de cadenas de más de 4 metilenos. A 1750  $\text{cm}^{-1}$  se observó la señal característica para un carbonilo – C=O de ácido graso. En el espectro RMN- $^1\text{H}$  (Anexo 2), se observó un triplete a



2.34 ppm que integró para dos hidrogenos atribuibles al metileno que se encuentra unido a un grupo carbonilo. Un multiplete a 1.63 ppm atribuibles a los hidrógenos del metileno  $\beta$  al carbonilo, un singulete ancho a 1.25 ppm atribuibles a los hidrógenos de la cadena larga de los ácidos grasos y por último un triplete a 0.88 ppm atribuible a los hidrógenos del metilo terminal de la cadena.

Tabla 9. Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de las FP del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en ratones sanos (n=6 por grupo).

GRUPO	DOSIS	Glucemia mg/dl ( $\bar{X} \pm \text{EEM}$ )		
		0 min	120 min	240 min
Control (Aceite de maíz)	4 ml/kg	51.8 $\pm$ 2.9	59.5 $\pm$ 3.9	58.6 $\pm$ 3.9
Tolbutamida	150 mg/kg	47.6 $\pm$ 2.4	31.3 $\pm$ 2.2*	44.5 $\pm$ 3.2
FP1	300 mg/kg	48.5 $\pm$ 2.6	51.3 $\pm$ 1.9	40.6 $\pm$ 2.0*
FP2	300 mg/kg	45.0 $\pm$ 3.5	57.3 $\pm$ 6.1	53.0 $\pm$ 6.6
FP3	300 mg/kg	51.2 $\pm$ 8.2	47.7 $\pm$ 6.2	51.0 $\pm$ 7.6
FP4	300 mg/kg	52.0 $\pm$ 5.1	62.3 $\pm$ 3.5	65.8 $\pm$ 7.5
FP5	300 mg/kg	46.8 $\pm$ 3.5	49.2 $\pm$ 4.2	49.5 $\pm$ 7.3
FP6	300 mg/kg	52.4 $\pm$ 10.2	53.5 $\pm$ 7.9	54.7 $\pm$ 6.0
FP7	300 mg/kg	50.7 $\pm$ 4.9	56.0 $\pm$ 3.1	46.7 $\pm$ 6.0
FP8	300 mg/kg	49.7 $\pm$ 3.3	33.5 $\pm$ 3.6*	30.8 $\pm$ 5.7*
FP9	300 mg/kg	48.7 $\pm$ 2.7	34.8 $\pm$ 5.4*	19.1 $\pm$ 3.6*
FP10	300 mg/kg	47.2 $\pm$ 3.4	49.8 $\pm$ 2.6	55.2 $\pm$ 6.4

\*Diferencia significativa con respecto a la glucemia inicial:  $p < 0.05$ .

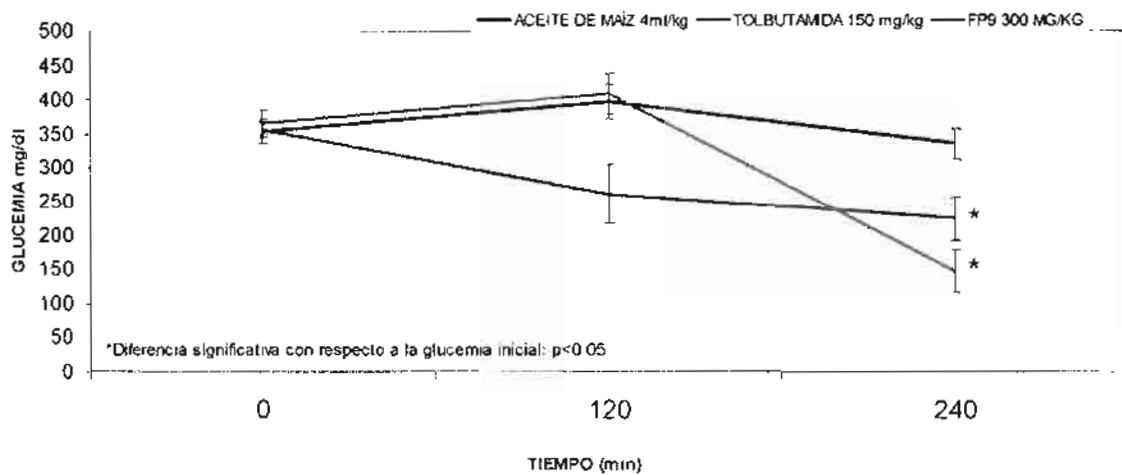


Figura 11. Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de la FP9 derivada del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en ratones con diabetes experimental (n=7 por grupo).

Tabla 10. Curso temporal de la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de las fracciones secundarias de la FP9 del extracto de DCM de la raíz de *I. sonorae* en ratones sanos (n=7 por grupo).

GRUPO	DOSIS	Glucemia mg/dl ( $\bar{X} \pm \text{EEM}$ )		
		0 min	120 min	240 min
Control (Aceite de maíz)	4 ml/kg	74.2 ± 5.5	85.6 ± 12.6	85.2 ± 10.7
Tolbutamida	150 mg/kg	69.4 ± 7.6	37.5 ± 4.7*	45.5 ± 3.2*
FS1	150 mg/kg	62.4 ± 5.3	22.4 ± 4.5*	20.6 ± 1.4*
FS2	150 mg/kg	79.5 ± 4.2	74.3 ± 2.9	53.9 ± 4.6*
FS3	150 mg/kg	73.0 ± 7.4	70.8 ± 8.2	53.0 ± 6.4*
FS4	150 mg/kg	67.1 ± 5.4	54.8 ± 3.1*	59.0 ± 9.4
FS5	150 mg/kg	76.9 ± 6.0	72.9 ± 4.4	70.5 ± 9.3

\*Diferencia significativa con respecto a la glucemia inicial: P<0.05.

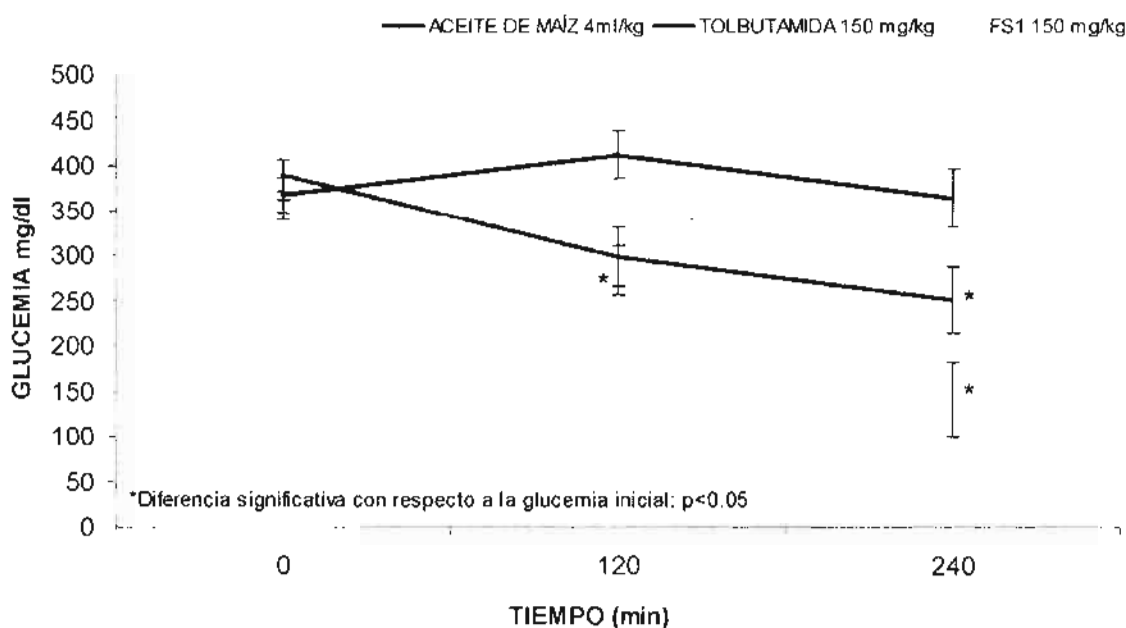
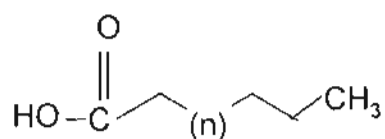


Figura 12. Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz, tolbutamida y de la FS1 derivada de la FP9 de *I. sonoreae* en ratones con diabetes experimental (n=7).

En los espectros de masas de impacto electrónico (Anexos 3-7) se observó el ion molecular de cada uno de los ácidos grasos que integró la mezcla: a m/z 200 para el ácido laurico, a m/z 228 para el ácido mirístico, a m/z 242 para el ácido pentadecanoico, a m/z 256 para el ácido palmítico, a m/z 284 para el ácido esteárico, con tiempos de retención de 7.55, 8.27, 8.58, 8.96 y 9.55, respectivamente (Figura 13).



- 12:** n=6
- 13:** n=8
- 14:** n=9
- 15:** n=10
- 16:** n=12

Figura 13. Estructura de los compuestos 12-16.

En el caso de la mezcla de MG se obtuvieron como un residuo de color blanco, que en el análisis de CCF al ser revelada con  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  al 2% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N se observaron como una banda de color gris, su espectro de IR (Anexo 8) la presencia de una banda de absorción a  $1725 \text{ cm}^{-1}$  en conjunto con una señal a  $\delta_c = 174.3$  ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ) en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Anexo 9) sugirió la presencia de un carbonilo de éster en la mezcla.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Anexo 10) se observaron señales para hidrógenos a  $\delta_H = 4.19$  (1H, dd, H-1a), 4.14 (1H, dd, H-1b), 3.93 (1H, m, H-2), y 3.70 (1H, dd, H-3a), 3.59 (1H, dd, H-3b), y carbonos a  $\delta_c = 65.1$  (C-1), 70.2 (C-2), y 63.3 (C-3) son característicos de 1-monoglicérido y rápidamente permite identificar al sistema de glicerol, de acuerdo a la literatura (Kawagishi y col., 2002); (Konishi y col., 2004).

Las señales de hidrógeno a  $\delta_H = 2.33$  (t,  $-\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 1.25 (SA,  $n\text{CH}_2$ ) y 0.88 (t, terminal  $\text{CH}_3$ ) en conjunto con las señales de carbono  $\delta_c = 34.1$  ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 29.6 ( $n\text{CH}_2$ ), y 14.1 (terminal  $\text{CH}_3$ ) confirman que los compuestos 1-11 son una mezcla de 1-monoglicéridos con una cadena larga de ácidos grasos. La longitud de la cadena O-acilo se determinó por métodos químicos.

La mezcla de MG se saponificó y posteriormente se sometió a una metilación con  $\text{MeOH-BF}_3$  para obtener una mezcla de MEAG (17-27). La cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas de la mezcla permitió obtener 11 espectros de masas con los siguientes iones moleculares a  $m/z = 270, 284, 298, 312, 326, 354, 368, 382, 396, 410$  y  $438$ , (Anexos 11-21), que permitieron identificar los siguientes compuestos: palmitato de metilo ( $\text{C}_{17}\text{O}_2\text{H}_{34}$ ), margarato de metilo

( $C_{18}O_2H_{36}$ ), estearato de metilo ( $C_{19}O_2H_{38}$ ), nonadecilato de metilo ( $C_{20}O_2H_{40}$ ), araquidonato de metilo ( $C_{21}O_2H_{42}$ ), behenato de metilo ( $C_{23}O_2H_{46}$ ), tricosanoato de metilo ( $C_{24}O_2H_{48}$ ), tetracosanoato de metilo ( $C_{25}O_2H_{50}$ ), pentacosanoato de metilo ( $C_{26}O_2H_{52}$ ), hexacosanoato de metilo ( $C_{27}O_2H_{54}$ ), y octacosanoato de metilo ( $C_{29}O_2H_{58}$ ), respectivamente.

El análisis de CG-EM de los MEAG muestra un 31.9% behenato, 21.0% nonadecilato, 20.3% palmitato, 8.1% estearato y 6.2% araquidonato. Por lo tanto, los compuestos del 1-11 fueron identificados como una mezcla de once ésteres de ácidos grasos del glicerol, del cual los ácidos grasos tuvieron cadenas de carbonos 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 y 28, respectivamente.

Con estas evidencias las estructuras de los compuestos fueron establecidas (Figura 14) para la mezcla de los MG (1-11) como: 1-monopalmitina (1), 1-monomargarato de glicerilo (2), 1-monoestearina (3), 1-monononadecilato de glicerilo (4), 1-monoaraquidonato de glicerilo (5), 1-monobehenato de glicerilo (6), 1-monotricosanoato de glicerilo (7), 1-monotetracosanoato de glicerilo (8), 1-monopentacosanoato de glicerilo (9), 1-monohexacosanoato de glicerilo (10) y 1-monooctacosanoato de glicerilo (11). Todos ellos son reportados por primera vez para *I. sonoreae*.

### **6.7. Efecto hipoglucémico de la mezcla de los AG y MG en ratones con diabetes experimental**

En la Tabla 11 se muestra el efecto hipoglucémico producido por la administración ip de la mezcla de AG y los MG por separado, ambos administrados a dosis de 75 mg/kg de peso corporal, en ratones con diabetes experimental, los valores de la

glucemia en el grupo control con aceite de maíz, permanecen prácticamente constantes durante todo el estudio, no existiendo diferencia estadísticamente significativa, con respecto a la glucemia inicial. Un efecto similar ocurre con los grupos que se les administró la mezcla de AG y MG, cuya glucemia basal fue de (390.7 ± 35.3 y 402.8 ± 28.4 mg/dl) respectivamente, y no se registró variación significativa durante el estudio después de la administración. Estos resultados revelan que los grupos de compuestos de AG y MG administrados de manera individual, no tienen efecto hipoglucémico, por lo que se puede deducir que estos compuestos requieren actuar conjuntamente para producir actividad hipoglucemiante. Para confirmar estos resultados se realizó un estudio donde se administró de manera conjunta la mezcla de AG y los MG a dosis de 75 mg/kg de peso corporal a ratones con diabetes experimental, donde se observa que la administración conjunta de AG y MG tiene un descenso de la glucemia estadísticamente significativo al minuto 240 de (413.8 ± 28.1 a 303.2 ± 31.8 mg/dl) del 26.7%.

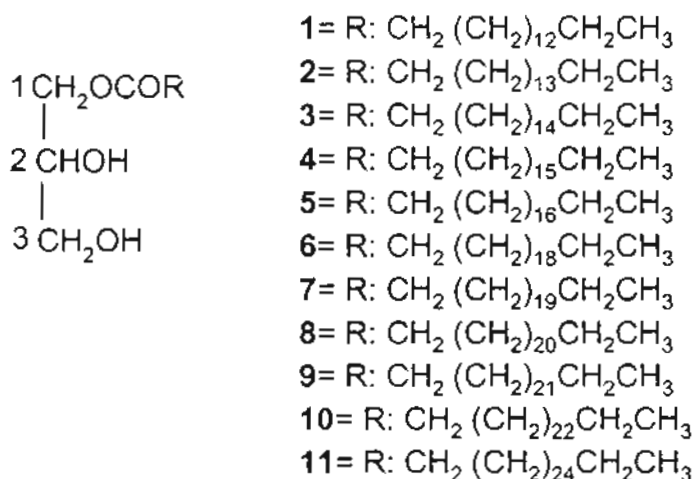


Figura 14. Estructuras de los compuestos del 1-11.

La separación mediante CC de la FP9 produjo 5 fracciones secundarias, incluyendo la fracción activa FS1 con 16 compuestos (1-16). Nuestros resultados revelan que la mezcla de los compuestos 1-11 (MG) y del 12-16 (AG) administrados de manera individual no muestran efecto hipoglucémico. Sin embargo, en el estudio donde los compuestos del 1-11 y del 12-16 fueron administrados de manera conjunta (75 mg/kg de cada uno) vía ip, a ratones con diabetes experimental, se observó disminución significativa de la glucemia al minuto 240 (Tabla 11 y Figura 19)

Tabla 11. Efecto sobre la glucemia producido por la administración ip de aceite de maíz y de la mezcla de AG y MG de la FS1 de la raíz de *I. sonorae* en ratones con diabetes experimental.

GRUPO	DOSIS	Glucemia mg/dl ( $\bar{X} \pm \text{EEM}$ )		
		0 min	120 min	240 min
Control (Aceite de maíz) (n=12)	4 ml/kg	392.2 $\pm$ 13.3	525.0 $\pm$ 20.7	416.3 $\pm$ 12.0
AG (n=6)	75 mg/kg	390.7 $\pm$ 35.3	392.4 $\pm$ 32.9	452.5 $\pm$ 75.3
MG (n=6)	75 mg/kg	402.8 $\pm$ 28.4	418.0 $\pm$ 35.0	487.8 $\pm$ 12.0
AG y MG (n=6)	75 mg/kg	413.8 $\pm$ 28.1	521.5 $\pm$ 26.6	303.2 $\pm$ 31.8*

\*Diferencia significativa con respecto a la glucemia inicial:  $p < 0.05$ .

Varios ácidos grasos han sido propuestos que poseen actividad biológica obtenidos de plantas medicinales, tales como *Alstonia spatulata* (Apocynaceae), *Centaurea seridia* (Asteraceae), *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae), *Cornus*

*officinalis* (Cornaceae), *Bryonia alba* (Cucurbitaceae), *Euphorbia prostate* (Euphorbiaceae), *Calamintha macrostema* (Lamiaceae), *Calamintha umbrosa* (Lamiaceae), *Mesona procumbens* (Lamiaceae), y *Orthosiphon grandiflorus* (Lamiaceae) (Marles y Fansworth., 1995). Los ácidos grasos y los monoglicéridos poseen efecto bactericida (Bergsson y col., 2002). También los monoglicéridos muestran actividad inhibitoria para Lp-PLA<sub>2</sub> (Song y col., 2005) y previenen la hiperplasia prostática (Shimada y col., 1997). Previos estudios fitoquímicos reportaron que la raíz de esta especie presenta las kinoinas glucosídicas A, B y C (Achenbach y col., 1993; Weckert y col., 1993). No obstante, hasta ahora estos compuestos no han sido reportados que tengan actividad hipoglucemiante.



## 7. CONCLUSIONES

- Los extractos acuoso, metanólico y liofilizado del jugo obtenido de la raíz de *I. sonorae* poseen actividad hipoglucemiante en ratones sanos, a dosis de 600 mg/kg.
- El extracto de diclorometano obtenido de la raíz de *I. sonorae* tiene efecto hipoglucémico notable en ratones sanos y con diabetes experimental.
- El extracto de diclorometano obtenido de la raíz de *I. sonorae* corresponde al índice toxicológico nivel 3 (moderadamente tóxico).
- La administración diaria del extracto diclorometánico a ratas diabéticas aumenta el peso corporal y reduce los niveles de glucosa y triglicéridos, sin efectos tóxicos aparentes.
- El fraccionamiento químico biodirigido del extracto diclorometánico de la raíz de *I. sonorae* condujo al aislamiento y caracterización de dos grupos de compuestos con actividad hipoglucemiante: once monoglicéridos y cinco ácidos grasos.
- El efecto hipoglucémico producido por los extractos, fracciones y mezcla de compuestos derivados de la raíz de *I. sonorae* permite fundamentar el uso medicinal en el control de la diabetes mellitus tipo 2 que la población mexicana le atribuye a *I. sonorae*.

## 8. PERSPECTIVAS

- Implementación de programas biotecnológicos dirigidos a la conservación de la especie.
- Propagar la planta en condiciones óptimas para homogeneizar el contenido de la mezcla de ácidos grasos y monoglicéridos aquí identificados.
- Establecer un terreno experimental con material obtenido por micropropagación y evaluar la actividad hipoglucemiante de las raíces generadas.
- Realizar un estudio toxicológico de administración crónica de la mezcla de compuestos en preparaciones estandarizadas.
- Dilucidar los mecanismos de acción de la actividad hipoglucemiante de la mezcla de compuestos en preparaciones estandarizadas.
- Diseñar un estudio clínico con la mezcla de compuestos estandarizado de *I. sonorae* en el que se evalúe el efecto del fitofármaco en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hassan IA, Abdel-Barry JA, Tariq-Mohammeda S. 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 71: 325-330.
- Achenbach H, Horn K, Domínguez A, Rombold C, Gomez L. 1993. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochemistry*; 33: 437-445
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 253 p.
- Alarcón-Aguilar FJ, Román-Ramos R y Flores-Sáenz JL. 1993. Plantas medicinales usadas en el control de la diabetes mellitus. *Ciencia.* 44: 363-381.
- Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Gonzalez-Paredes B, Flores-Saenz JL. 1997. Effects of three mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 55: 171-177.
- Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Perez-Gutierrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores-Saenz JL. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.* 61: 101-110.

- Alarcon-Aguilar FJ, Campos-Sepulveda AE, Xolalpa-Molina S, Hernandez-Galicia E, Roman-Ramos R. 2002<sup>a</sup>. Study of the hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonorae* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharm. Biol.* 40: 570–575.
- Alarcon-Aguilar FJ, Hernandez-Galicia E, Campos-Sepulveda AE, Xolalpa-Molina S, Rivas-Vilchis JF, Vazquez-Carrillo LI, Roman-Ramos R. 2002<sup>b</sup>. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 82:185-189.
- Alarcon-Aguilar FJ, Banderas-Dorantes T, Gutierrez-Leon A, Vazquez-Carrillo LI, Flores-Saenz JL and Roman-Ramos R. 2003. Study of the anti-hyperglycemic effect of anti-diabetic plants in rabbits with impaired glucose tolerance. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 46: 148-152.
- Ali-Ajabnoor M. 1990. Effect of aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* 28: 215-220.
- Ali L, Azad-Khan AK, Rouf-Mamun MI, Mosihuzzaman M, Nahar N, Nur-e-Alam- M, Rokeya B. 1993. Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. *Planta Med.* 59: 408-412.
- Alpizar-Salazar M, Sotomayor-Gallardo A, Castro-Ramos MA, Zarate-Aguilar A, Madrazo-Navarro M, 1998. Diabetes mellitus, prioridad institucional. *Salud comunitaria* 2: 31-35.
- Alpizar-Salazar M, Pizaña-Barba JA, Zárate-Aguilar A. 1999. La diabetes mellitus en el adulto mayor. *Rev. Med. IMSS* 37: 117-125.

Análisis de la efectividad de los medicamentos en el tratamiento de la diabetes mellitus

- American Diabetes Association (ADA). 2000. Pancreas transplantation for patients with type 1 Diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 23 (Suppl. 1): S117-S119.
- American Diabetes Association (ADA). 2005. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus (Position Statement). *Diabetes Care* 28 (Suppl. 1): S37-S42.
- Andrade A, Wiedenfeld H, Revilla MC, Islas S. 2000. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 72: 129-33.
- Atkinson MA, Maclaren NK. 1990. Origen de la diabetes. *Investigación y Ciencia* 168: 38-46.
- Bailey J, Day C. 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-54.
- Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel RG, Elgue G, Larsson R, Nilsson B, and Korsgren O. 1999. Incompatibility between human blood and isolated islets of langerhans. *Diabetes* 48: 1907-1914.
- Bergsson G, Steingrimsson O, Thormar H. 2002. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylory*. *Int. J. Antimicrob. Agents*: 20: 258-262
- Castillo-Velázquez ML. 1988. Plantas con valor potencial hipoglucémico de uso tradicional en Nuevo León, estudio etnobotánico, farmacognosia y farmacología. Tesis profesional (UANL, Nuevo León, México).

- Clinical Toxicology of Comercial Products. Acute poisonig. 1995. Williams and Wilkins. 5 edition. USA. 1781.
- Committee Report. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 23: S5–S19.
- Contreras-Weber CC. 2005. Actividad hipoglucemiante de *Psacalium peltatum* H.B.K. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Div. CBS, UAM-I. México. 136 p.
- DCCT Research Group. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long–term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 329: 977-986.
- De Smet Peter AGM. 1997. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in health care. Drugs 54: 801-840.
- Del Amo RS. 1979. Plantas medicinales del estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. 279p.
- Díaz JL. 1976. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II, IMEPLAM. México. 329 p.
- Encarnación–Dimayuga R, Agundez J. 1986. Traditional medicine of Baja California Sur (México) I. J. Ethnopharmacol. 17: 183–193.
- Encarnación–Dimayuga R, Fort–Murillo R, Luis–Pantoja M. 1987. Traditional medicine of Baja California Sur (México) II. J. Ethnopharmacol. 20: 209–222.
- Engelgau MM, Venkat NK, Herman WH. 2000. Screening for type 2 diabetes. Diabetes Care 23: 1563-1579.
- Escobedo de la Peña J, Arreola F, Castro-Martínez MG, Fiorello S, Islas-

Andrade S, Lifshitz A, Méndez-Francisco JD, Partida-Hernández G, Revilla-Monsalve M, Vázquez-Estupiñán F. 1996. Diabetes mellitus en México-americanos. Rev. Med. IMSS 34: 495-499.

- Frei B, Baltisberger M, Sticher O, Heinrich M. 1998. Medical ethnobotany of the zapotecs of the isthmus-sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. J. Ethnopharmacol. 62: 149-165.
- Hammouda Y, Amer SM. 1960. Antidiabetic effect of tecomine and tecostanine. J. Pharmaceu. Scien. 55: 1452-1454
- Hammouda Y., R.A. Kader y A.M. Samir. 1964. Hipoglycemic properties of tecomine and tecostanine. J. Pharm. Pharmacol. 16: 833-834.
- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA. 1996. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. Ed. McGraw-Hill, Interamericana, 1589-1590 p.
- Herman-William H. 1999. Glycaemic control in diabetes. Br. Med. J. 319: 104-106
- Hernandez-Galicia E, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaria L, Roman-Ramos R, Chavez-Miranda AA, Garcia-Vega LM, Flores-Saenz JL, Alarcon-Aguilar FJ. 2002<sup>a</sup>. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. Proc. West. Pharmacol. Soc. 45: 118-124.
- Hernandez-Galicia E, Campos-Sepulveda AE, Alarcon-Aguilar FJ, Vazquez-Carrillo LI, Flores-Saenz JL and Roman-Ramos R. 2002<sup>b</sup>. Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice. Proc. West. Pharmacol. Soc. 45: 42-43.

- Hernández-Valencia M. 2005. Aspectos básicos en el control de la diabetes gestacional. *Rev. Med. Inst. Mex. Seg. Soc.* 43 (5): 419-423.
- Inzucchi SE. 2002. Oral antihyperglycemia therapy for type 2 diabetes. *JAMA* 287: 360-372.
- Jayasooriya AP, Masanobu-Sakono, Chizuko-Yukizaki, Mikio-Kawano, Kyosuke-Yamamoto, Nobuhiro-Fukuda. 2000. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *J. Ethnopharmacol.* 72: 331-336.
- Karunanayake EH, Welihinda J, Sirimanne SR, Gowri Sinnadorai. 1984. Oral Hypoglycaemic activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *J. Ethnopharmacol.* 11: 223-231.
- Karunanayake EH, Jeevathayaparan S, Tennekoon KH. 1990. Effect of *Momordica charantia* fruit juice on streptozotocin induced diabetes in rats. *J. Ethnopharmacol.* 30: 199-204.
- Kawagishi H, Miyazawa T, Kume H, Arimoto Y, Inakuma T. 2002. Aldehyde dehydrogenase inhibitors from the mushroom *clitocybe clavipes*. *J. Nat. Prod.* 65: 1712-1714.
- Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S, Sakuda S, Nagasawa H, Schimizu M. 2004. Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. *Br. J. Pharmacol.* 143: 379-387.
- Lawrence-Roberts V. 1999. Tratamiento farmacológico actual de la diabetes tipo 2: sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa



y tiazolidinedionas. *Diabetes Care* (Suppl. En Español): 16-19.

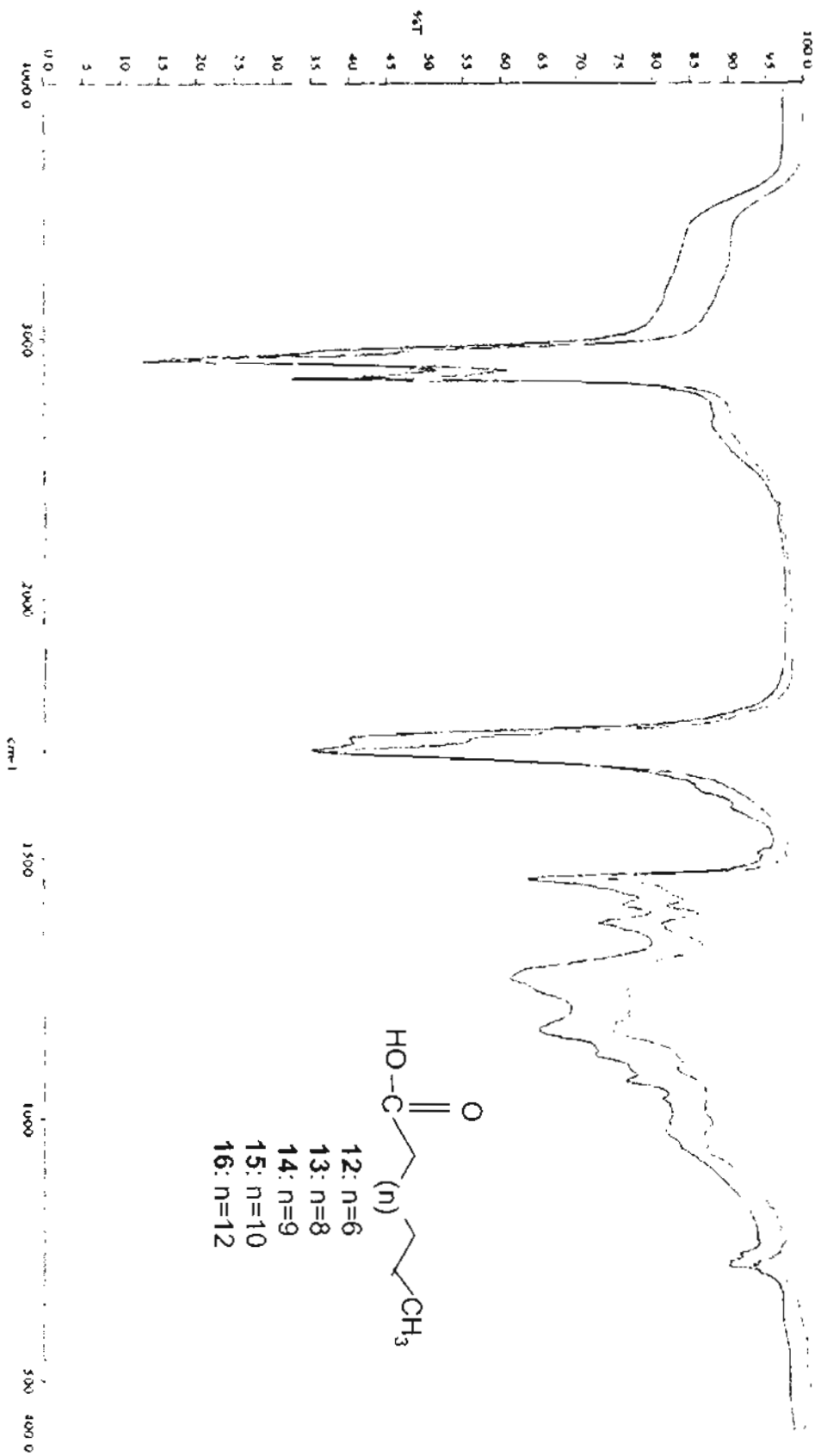
- Lerman IG. 1998. Atención integral del paciente diabético. 2ª edición. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. México D.F. 3-10 p.
- Litchfield JT, Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 96: 99-113.
- López R, Hinojosa A. 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Universidad de Sonora, Hermosillo Son, México. 133p.
- Lozoya X, Aguilar A, Camacho JR. 1987. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. Med.* 25: 283–291.
- Marles RJ y Farnsworth R. 1994. Plants as sources of antidiabetic agents. En Wagner H, Farnsworth NR (eds.). *Economic and Medicinal Plants Research* 6, London Academic Press.
- Marles RJ, Farnsworth NR. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137-189.
- Martínez M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas medicinales. Editorial Fondo de Cultura Económica, 1247 p.
- Mata R, Calzada F, Navarrete A, Del Río F and Delgado G. 1991. Long-Chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 34: 147-154.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, 113-160.
- Official Methods of analysis of AOAC International. 1995. Published by AOAC International. 16 th edition. Vol. II chapter 41, p 1-28.

- Perez GRM, Ocegueda ZA, Muñoz JL, Avila AJG and Morrow WW. 1984. A study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants. *J. Ethnopharmacol.* 12: 253-262.
- Perez GRM, Pérez GC, Zavala SMA, Pérez GS. 1998<sup>a</sup>. Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud Pública de México* 40: 354–358.
- Perez GRM, Zavala SMA, Perez GS, Perez GC. 1998<sup>b</sup>. Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicine* 5: 55-75.
- Perez RM, Cervantes H, Zavala MA, Sanchez J, Perez S and Perez C. 2000<sup>a</sup>. Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine.* 7: 25-29.
- Perez RM, Perez C, Zavala MA, Perez S, Hernandez H and Lagunes F. 2000<sup>b</sup>. Hypoglycemic effects of lactucin-8-O-methylacrylate of *Parmentiera edulis* fruit. *J. Ethnopharmacol.* 71: 391-394.
- Rerup CC. 1970. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cell. *Pharmacol. Rev.* 22: 485-517.
- Robertson PR, Davis C, Larson J, Stratta R, Sutherland DF. 2000. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 23: 112-116.
- Rodriguez H, Perez RM, Muñoz H, Perez C, Miranda, R. 1975. Inducción de diabetes en ratón por medio de aloxana. *Acta Medica* XI: 33-36.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Partida-Hernández G, Lara-Lemus A, Alarcon-Aguilar F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Med.* 22: 87–93.

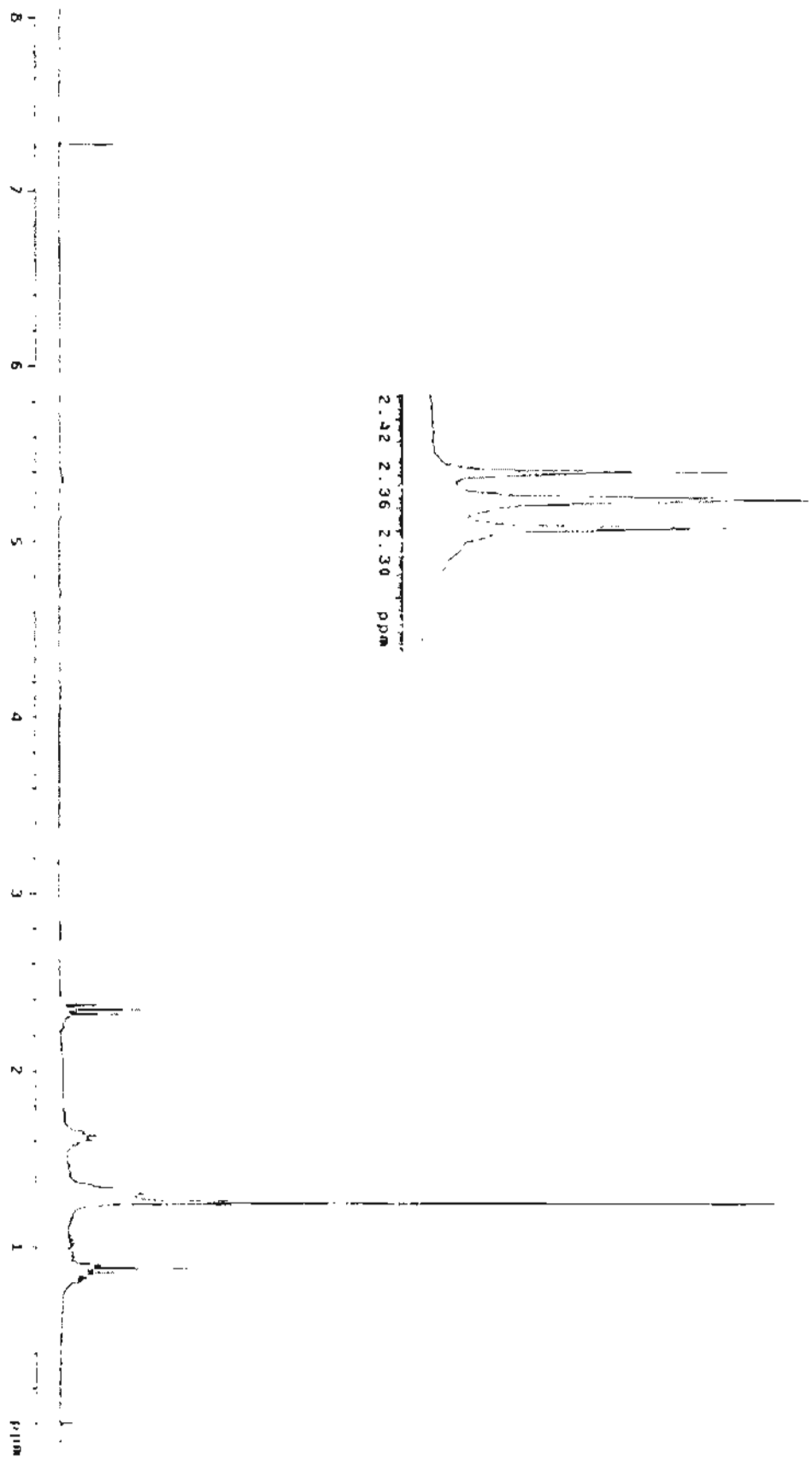
- Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar F, Lara-Lemus A and Flores-Saenz JL. 1992<sup>a</sup>. Hypoglycemic effect of plant used in Mexico as antidiabetics. Arch. Med. Res. 23: 59–64.
- Roman-Ramos R, Lara-Lemus A, Alarcon-Aguilar F, Flores-Saenz JL. 1992<sup>b</sup>. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. Arch. Med. Res. 23: 105–109.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Alarcon-Aguilar FJ. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. J. Ethnopharmacol. 48: 25–32.
- Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gomez-Perez FJ, Olaiz G. 2005. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. Arch. Med. Res 36: 188-196.
- Saudek CD, Duckworth LUC, Giobbie HA, y col. 1997. Bomba implantable de insulina frente a múltiples dosis de insulina para la diabetes mellitus no insulino dependiente. JAMA 5: 152-158.
- Scheen AJ. 1997. Drug treatment of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the 1990s. Drugs 54: 355-368.
- Scheen AJ, Lefebvre PJ. 1998. Oral antidiabetic agents. Drugs 55: 225–236.
- Shimada H, Tyler VE, McLaughlin JL. 1997. Biologically active acylglycerides from the berries of Saw-Palmetto (*Serenoa repens*). J. Nat. Prod. 60: 417-418.
- Singh SN, Vats P, Suri S, Shyam R, Kumria MML, Ranganathan S, Sridharan K. 2001. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 76: 269-277.

- Smith CM, Reynard AM. 1998. Farmacología. Ed. Médica panamericana. 705-706 p.
- Song-Lee W, Jeong KM, Beck Y, Park YD, Jeong TS. 2005. Lp-PLA2 inhibitory activities of fatty acid glycerols isolated from *Saururus chinenses* roots. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 15: 3573-3575.
- Stahl E. 1969. Thin-Layer chromatography, A Laboratory Handbook. Seg. edición. Springer-Verla. New York. 861-874.
- Stanely P, Mainzen P, Venugopal PM. 2000. Hypoglycemic and other related actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 70: 9-15.
- Steel R, Torrie J. 1989. Bioestadística, principios y procedimientos. México. McGraw-Hill. 662.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, Van TH. 2005. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-1346.
- Tennekoon KH, Jeevathayaparan S, Angunawala P, Karunanayake EH, Jayasinghe KSA. 1994. Effect of *Momordica charantia* on key hepatic enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 44: 93-97.
- Vázquez-Martínez JL, Gómez-Dantés H, Fernández-Cantón S. 2006. Diabetes mellitus en población adulta del IMSS: Resultados de la encuesta nacional de salud 2000. *Rev. Med. Inst. Mex. Seg. Soc.* 44(1): 13-26.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York. 301-304.

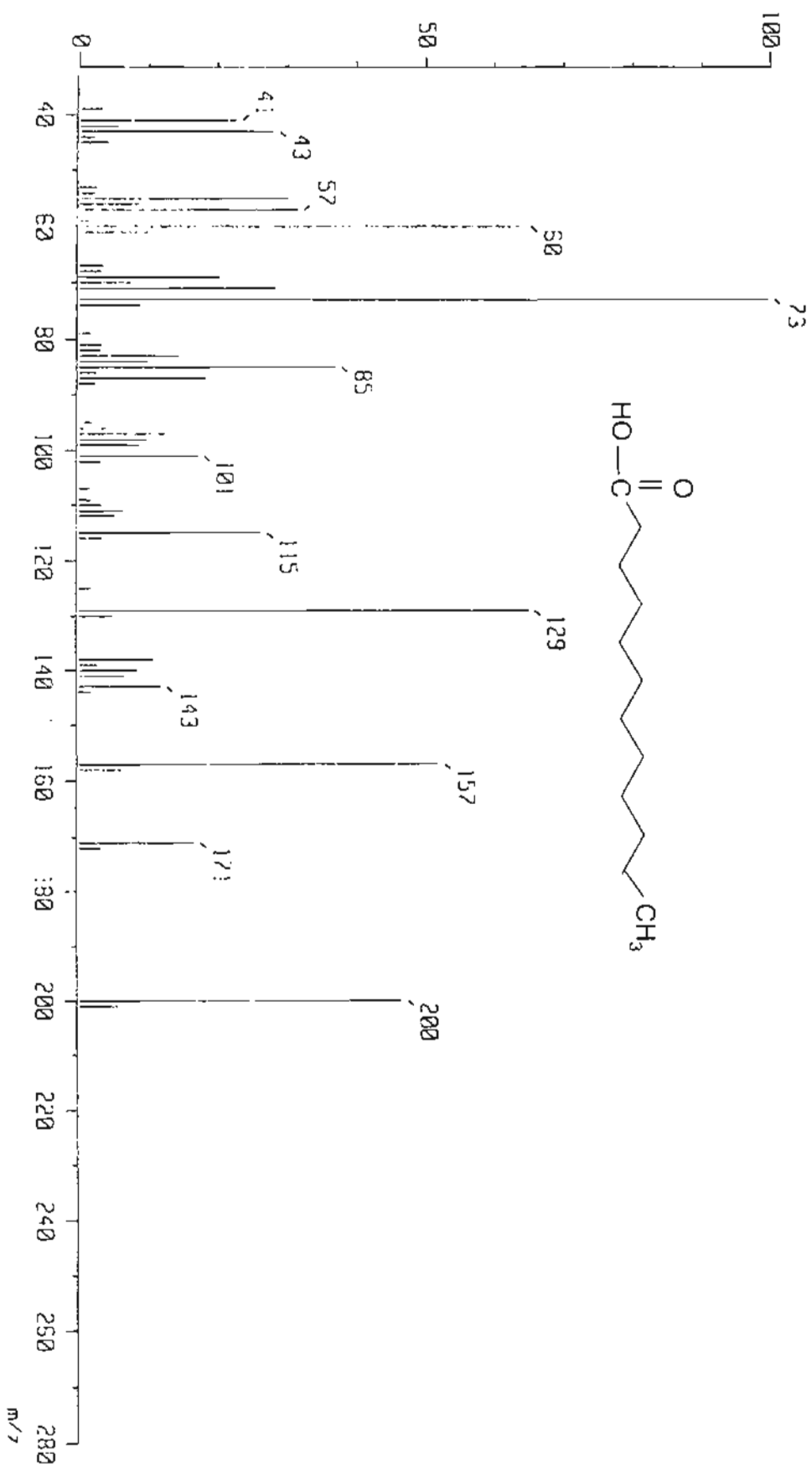
- Welihinda J, Karunanayake EH. 1986. Extra-pancreatic effects of *Momordica charantia* in rats. J. Ethnopharmacol. 17: 247-255.
- Winkelman M. 1986. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. J. Ethnopharmacol. 18: 109–131.
- Weckert E, Hummer K, Domínguez A, Horn K, Achenbach H. 1993. Absolute configuration of kinoin C. Phytochemistry 133: 447-448.
- Wood SL, Sauve R, Ross S, Brant R, Love EJ. 2000. Prediabetes and perinatal mortality. Diabetes Care 23: 1752-1754.
- Xolalpa MS. 1994. Flora Medicinal Mayo de la región de El fuerte y Choix, Sinaloa. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Flora Medicinal Indígena de México. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista, México. pp. 363-411.
- Zamora Martinez MC and Nieto de Pascual Pola C. 1992. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, México. J. Ethnopharmacol. 35: 229–257.
- Zuñiga GS. 1995. Etiología, fisiopatología clínica y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1. Mundo Médico 252: 11-21.



Anexo 1. IR de la mezcla de AG.

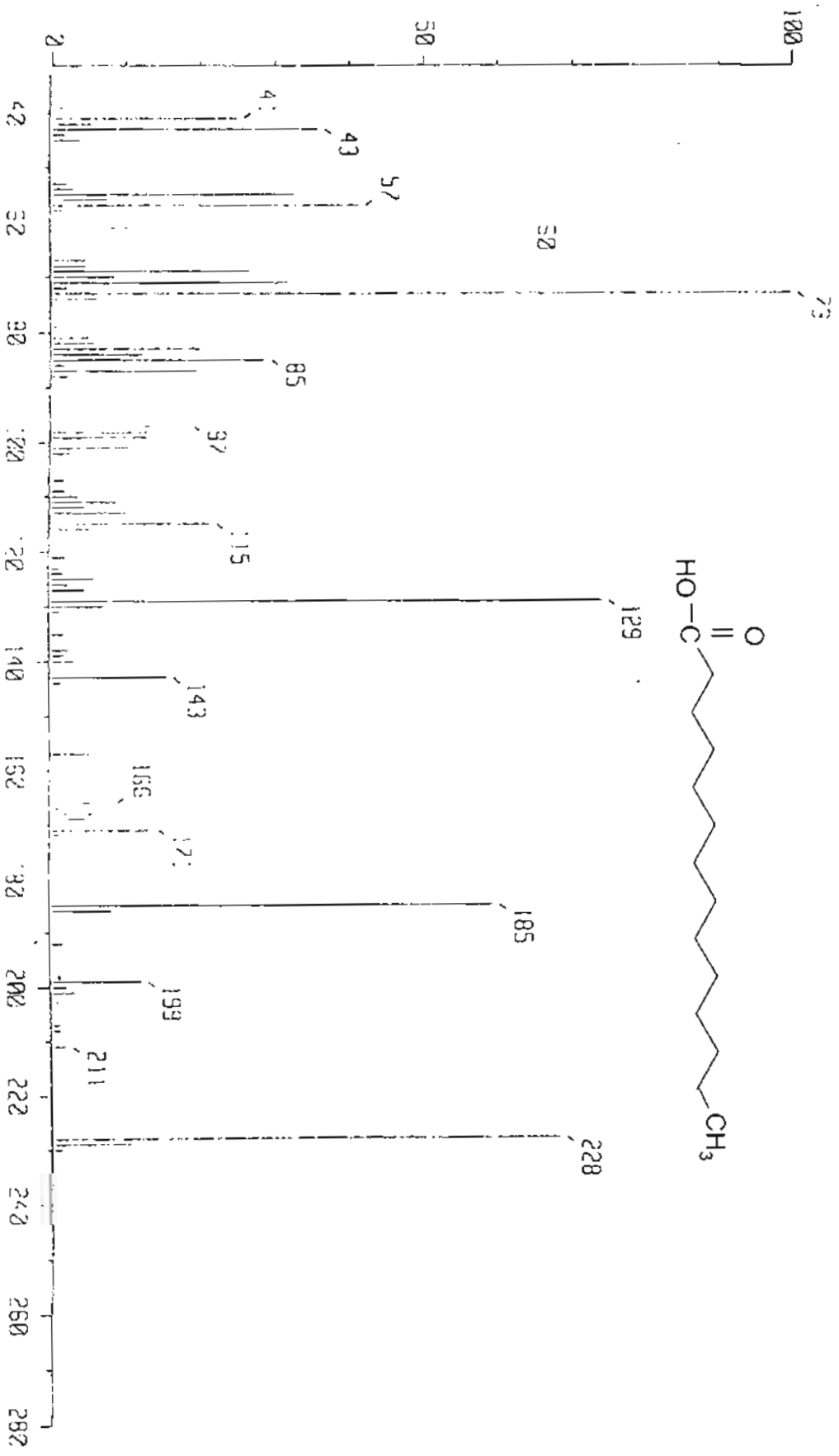


Arexo 2. RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de AC

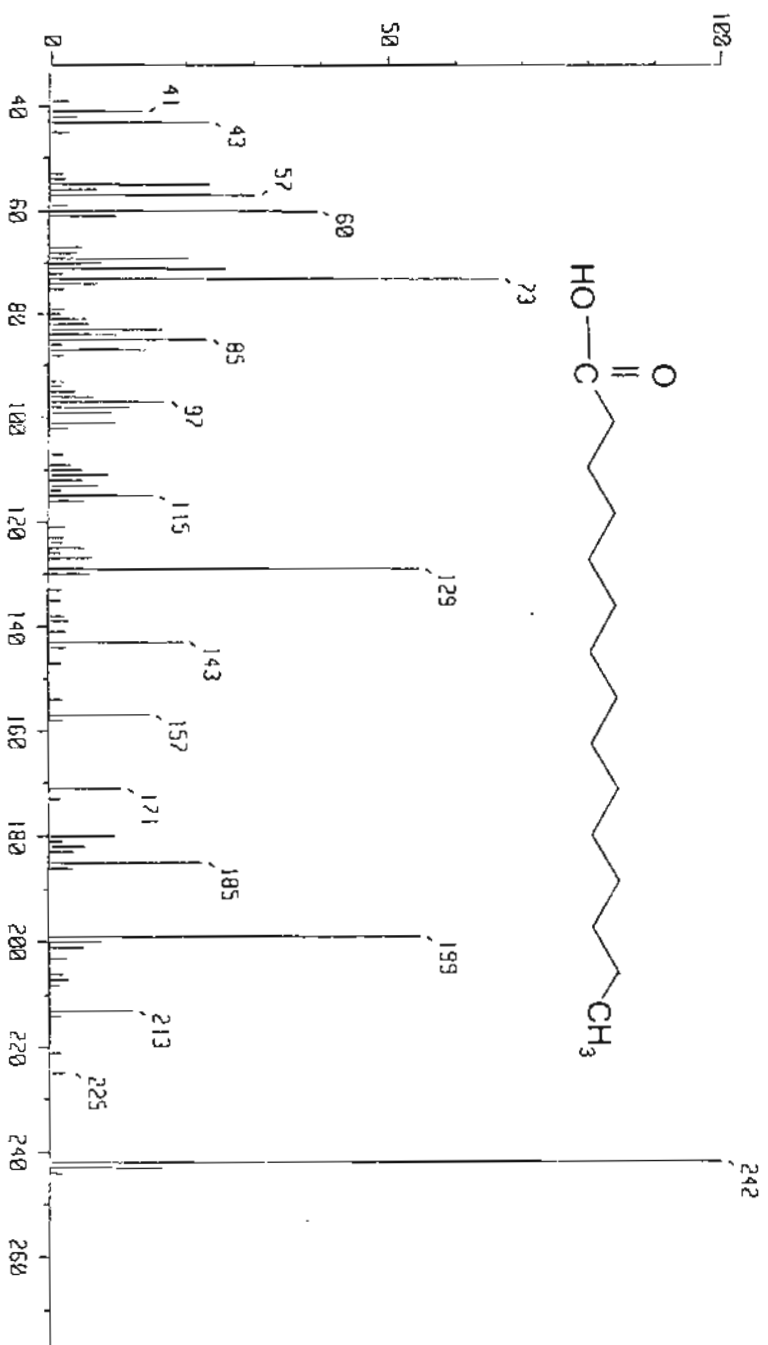


Anexo 3. EMIE del ácido laúrico.

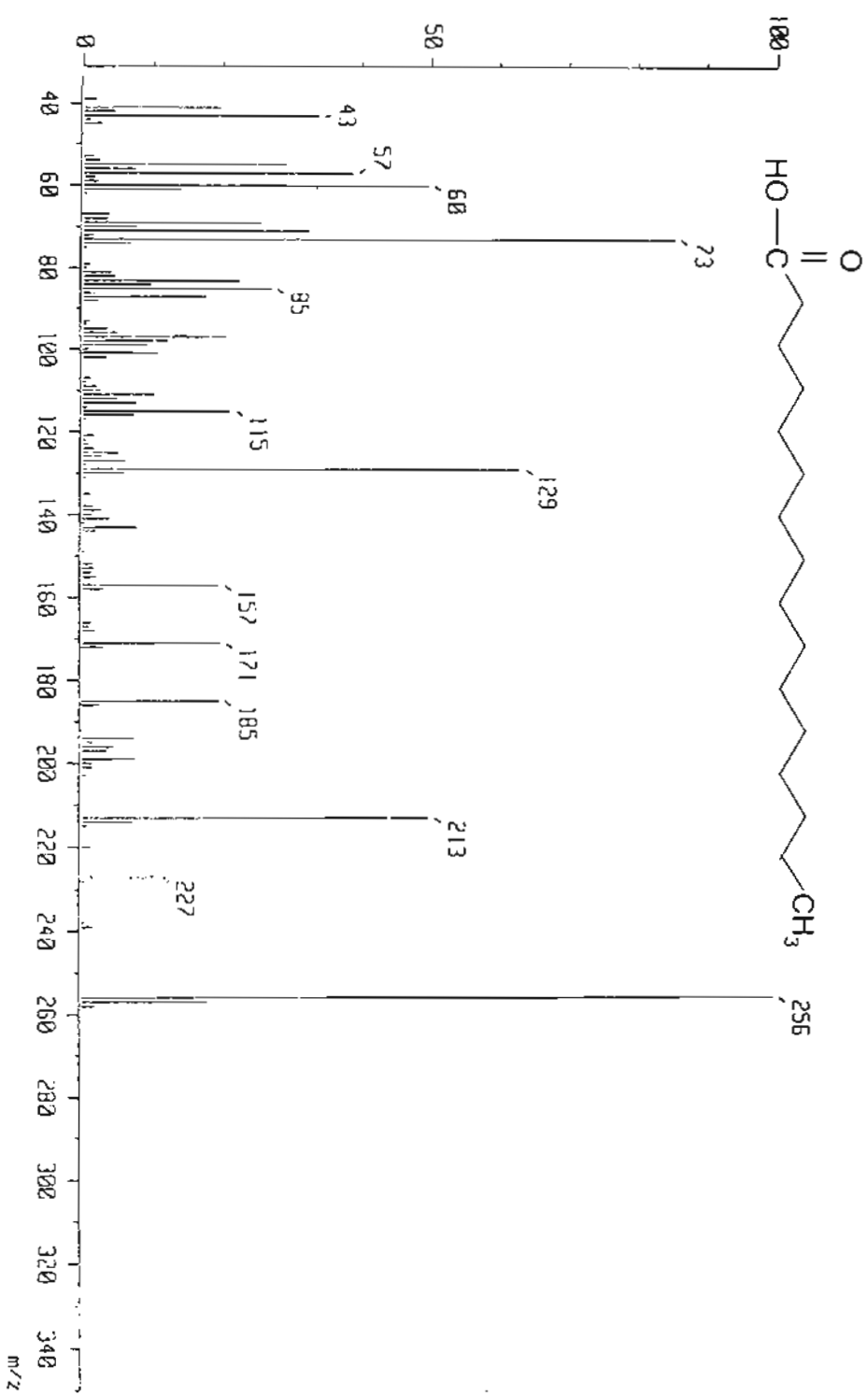




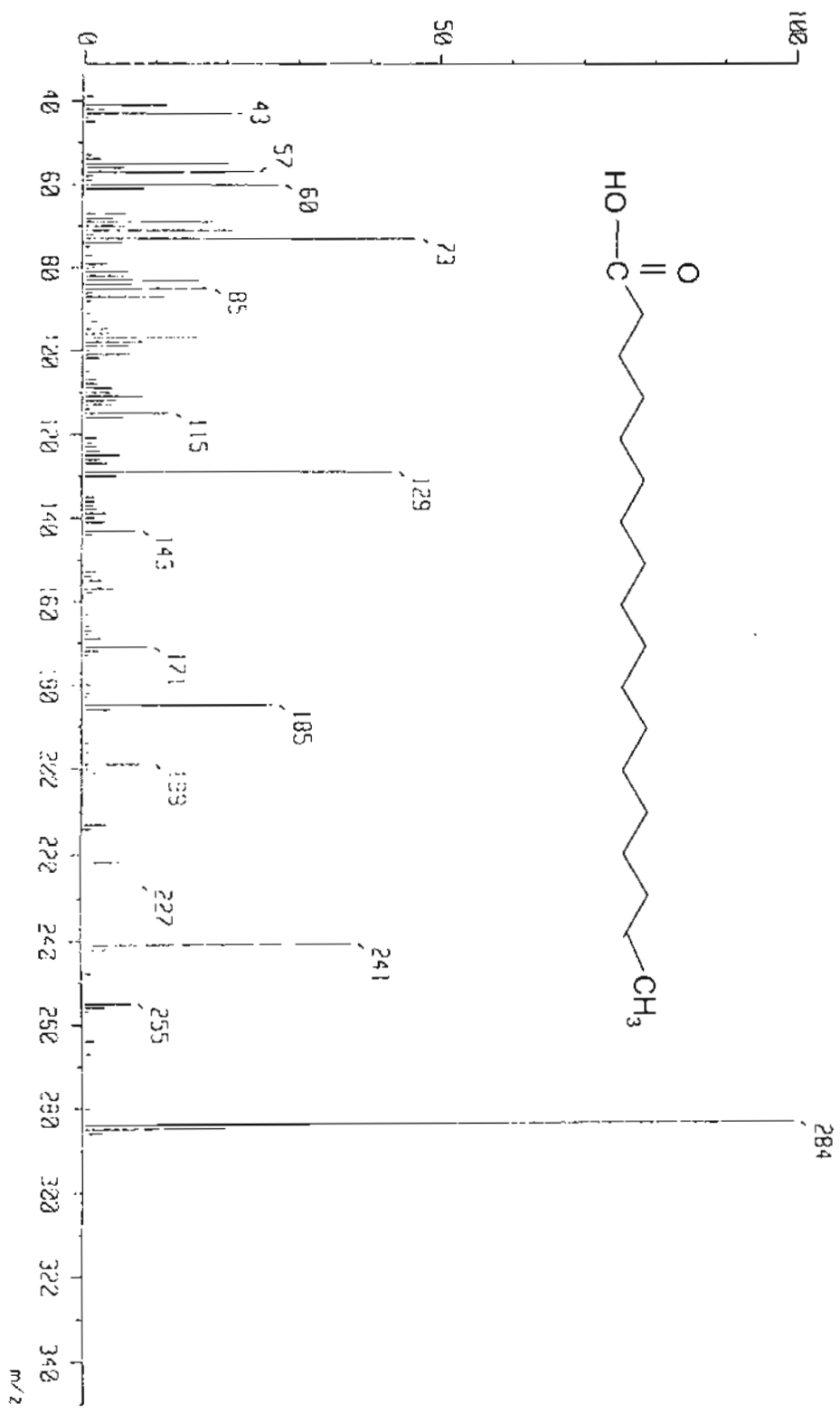
Anexo 4. EMIE del ácido mirístico.



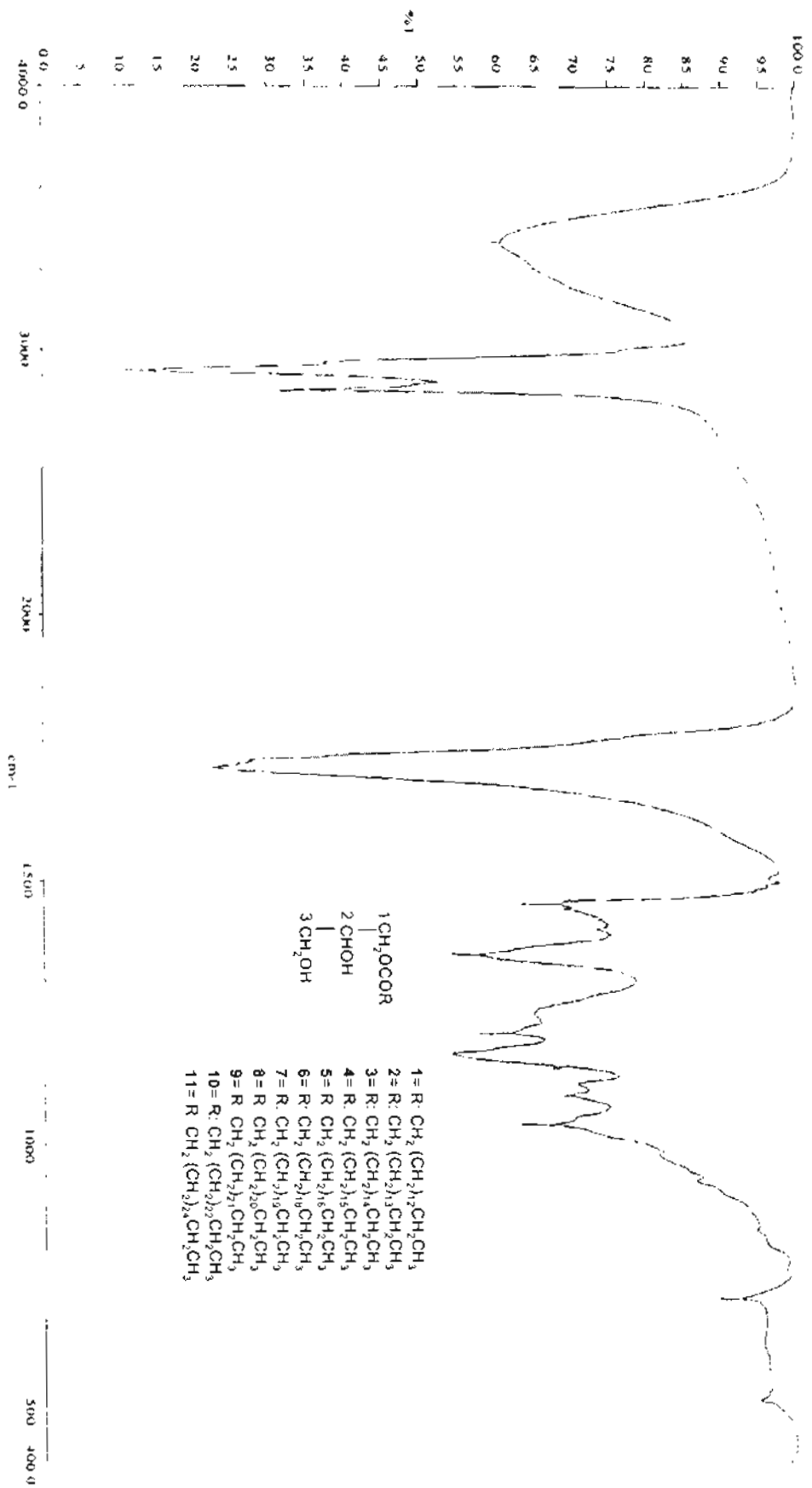
Anexo 5. EMIE del ácido pentadecanoico.



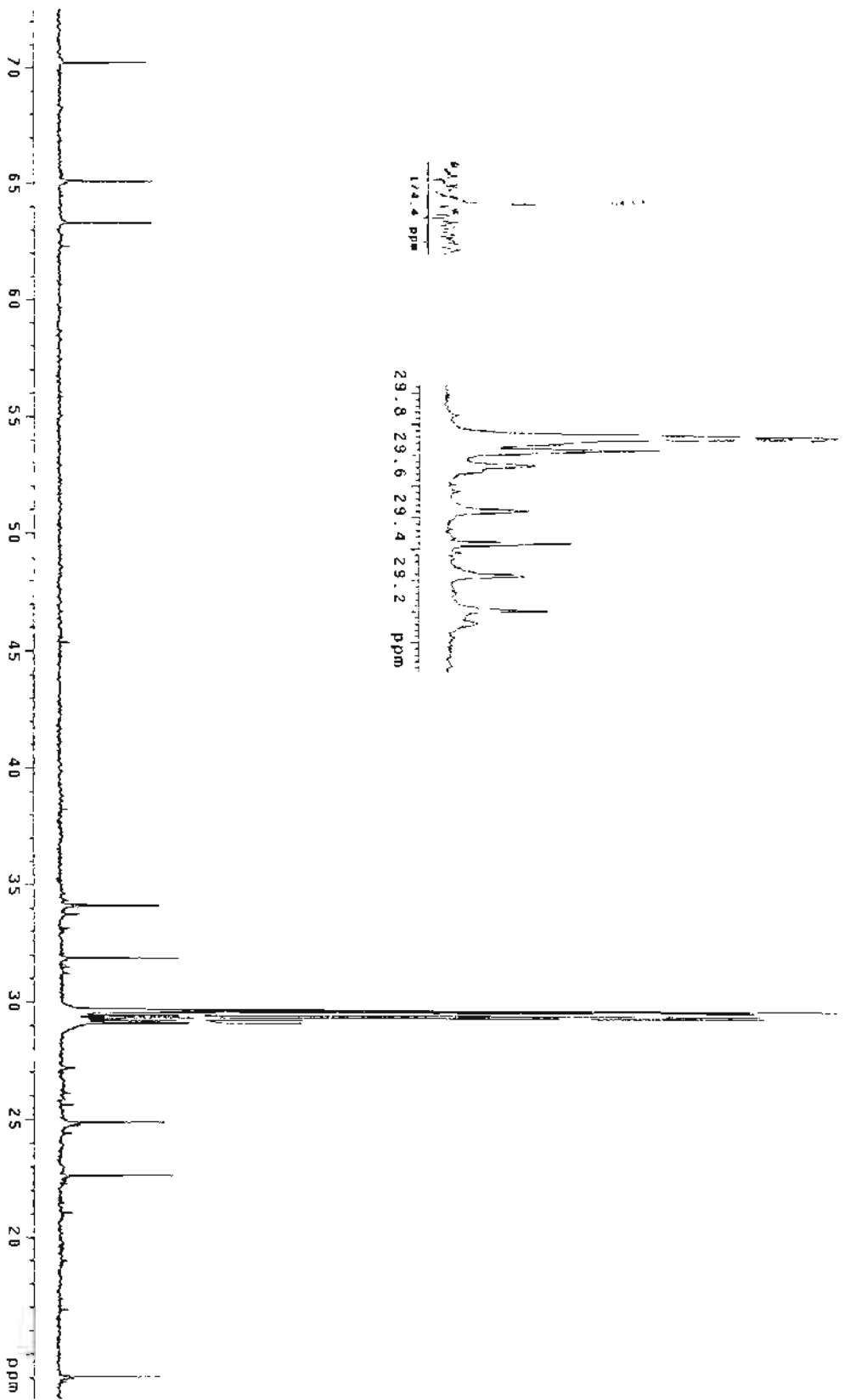
Anexo 6. EMIE del ácido palmítico.



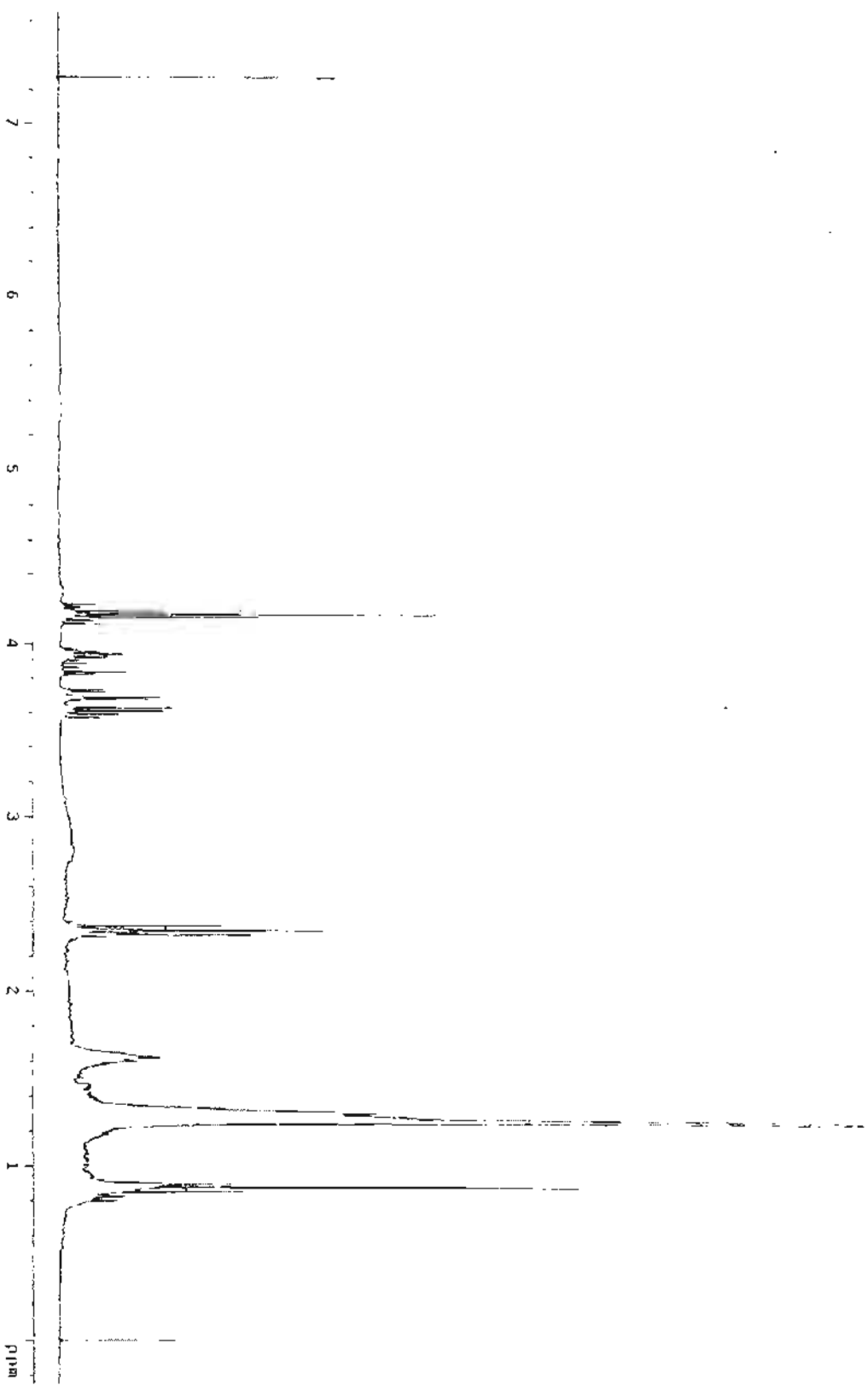
Anexo 7. EMIE del ácido estearico.



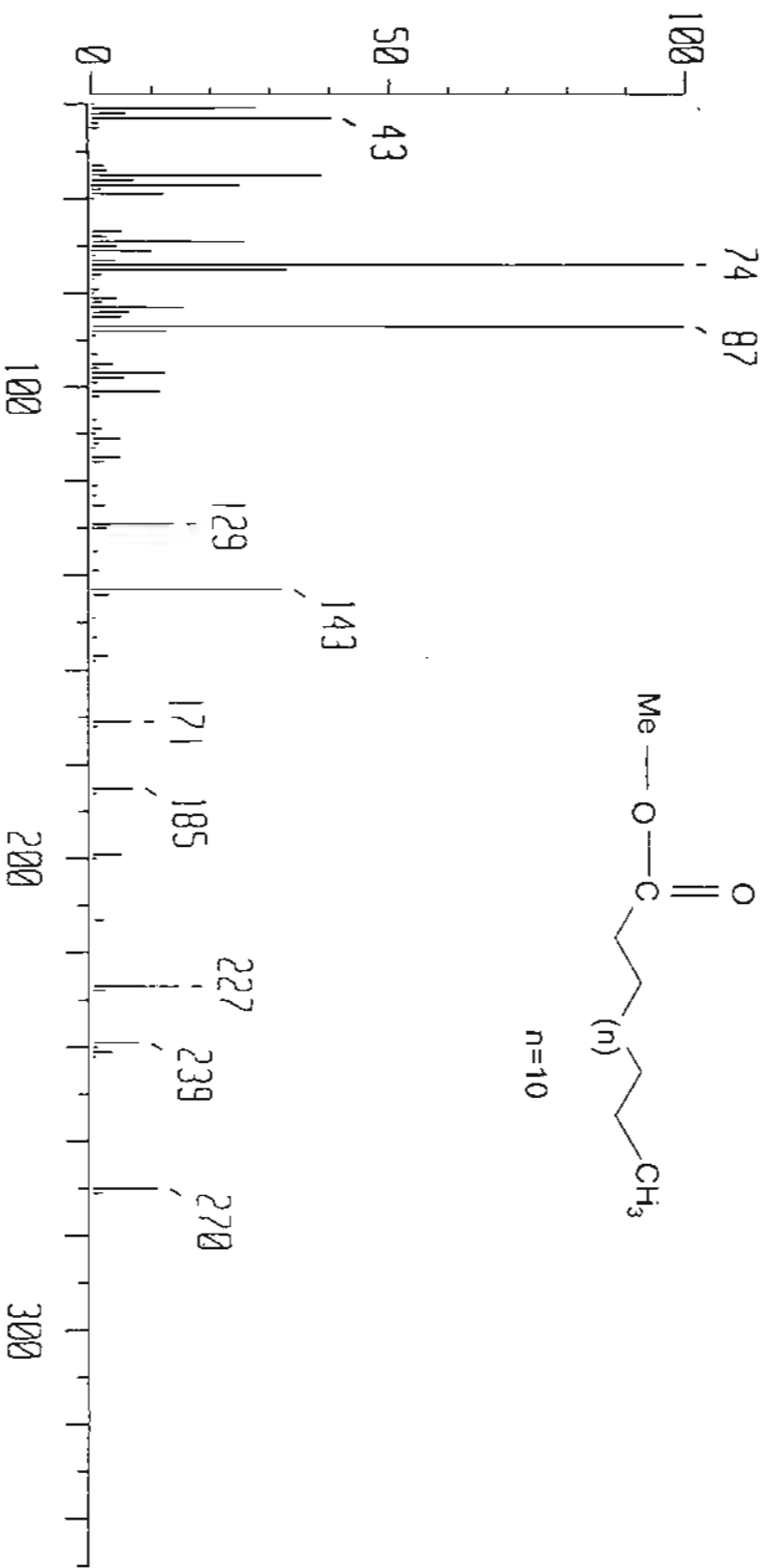
Anexo 8. IR de la mezcla de MG.



Anexo 9. RMN $^{13}\text{C}$  de la mezcla de MG.

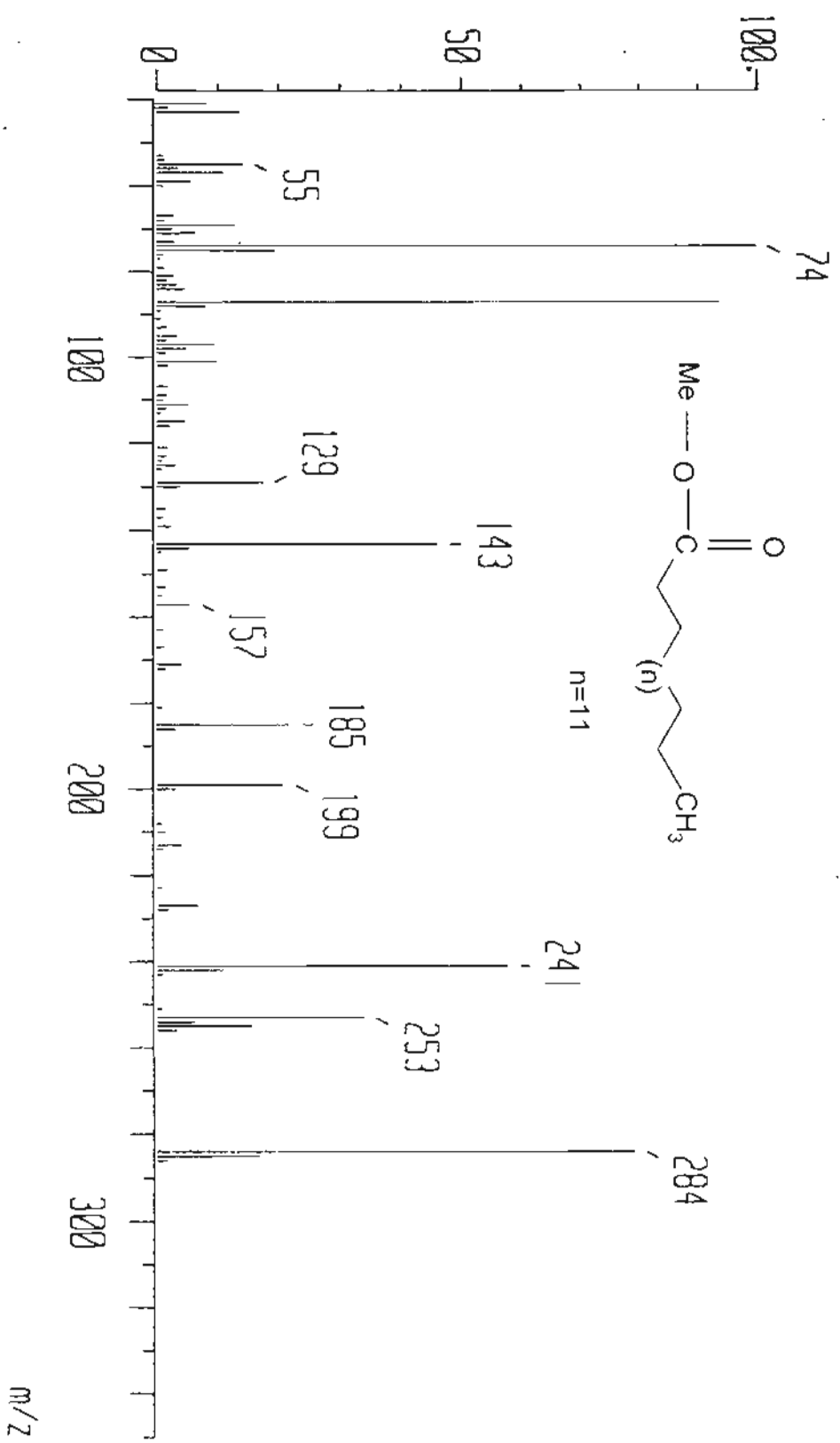


Anexo 10. RMN<sup>1</sup>H de la mezcla de MG.

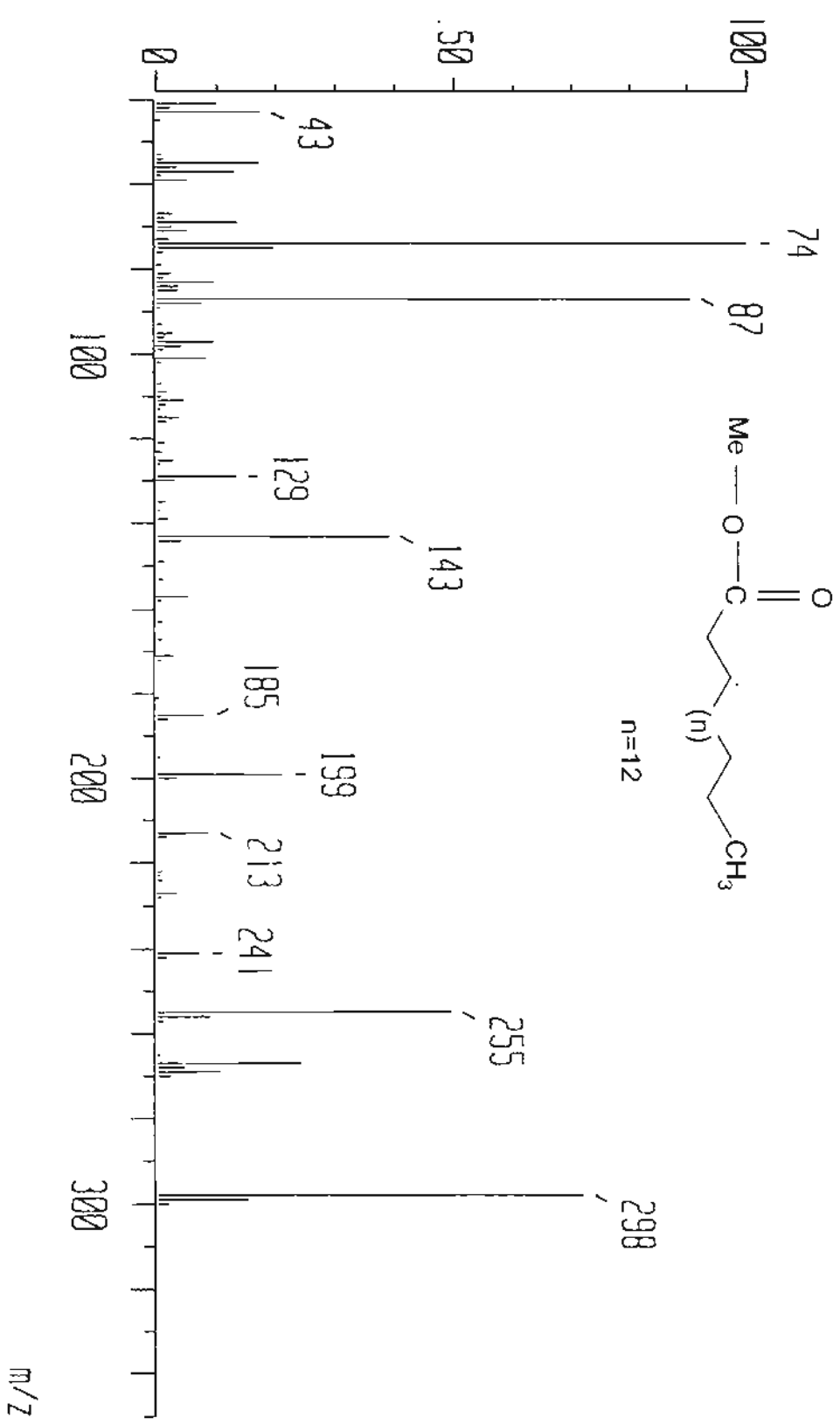


Anexo 11. CG-EM del palmitato de metilo.

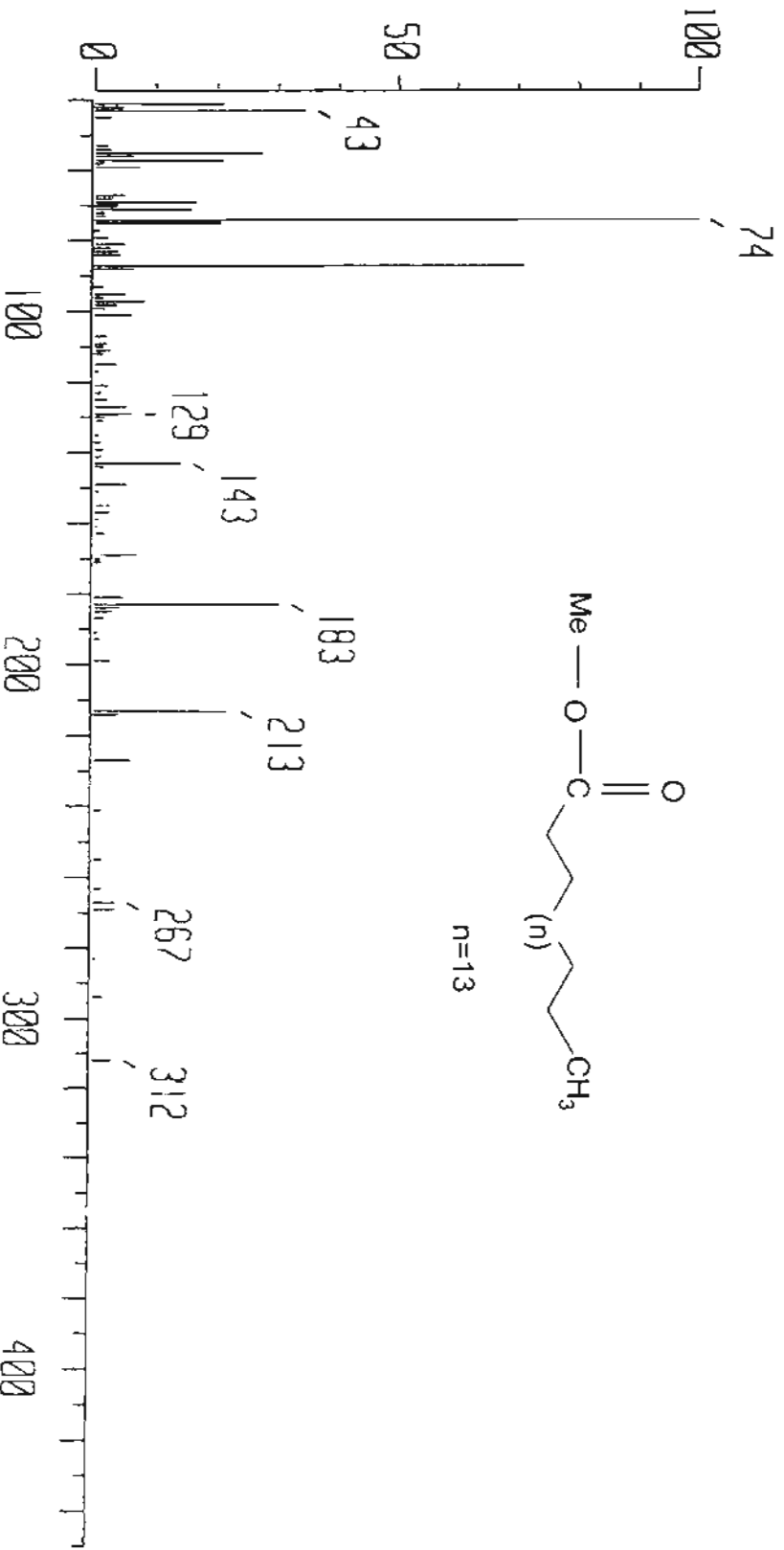




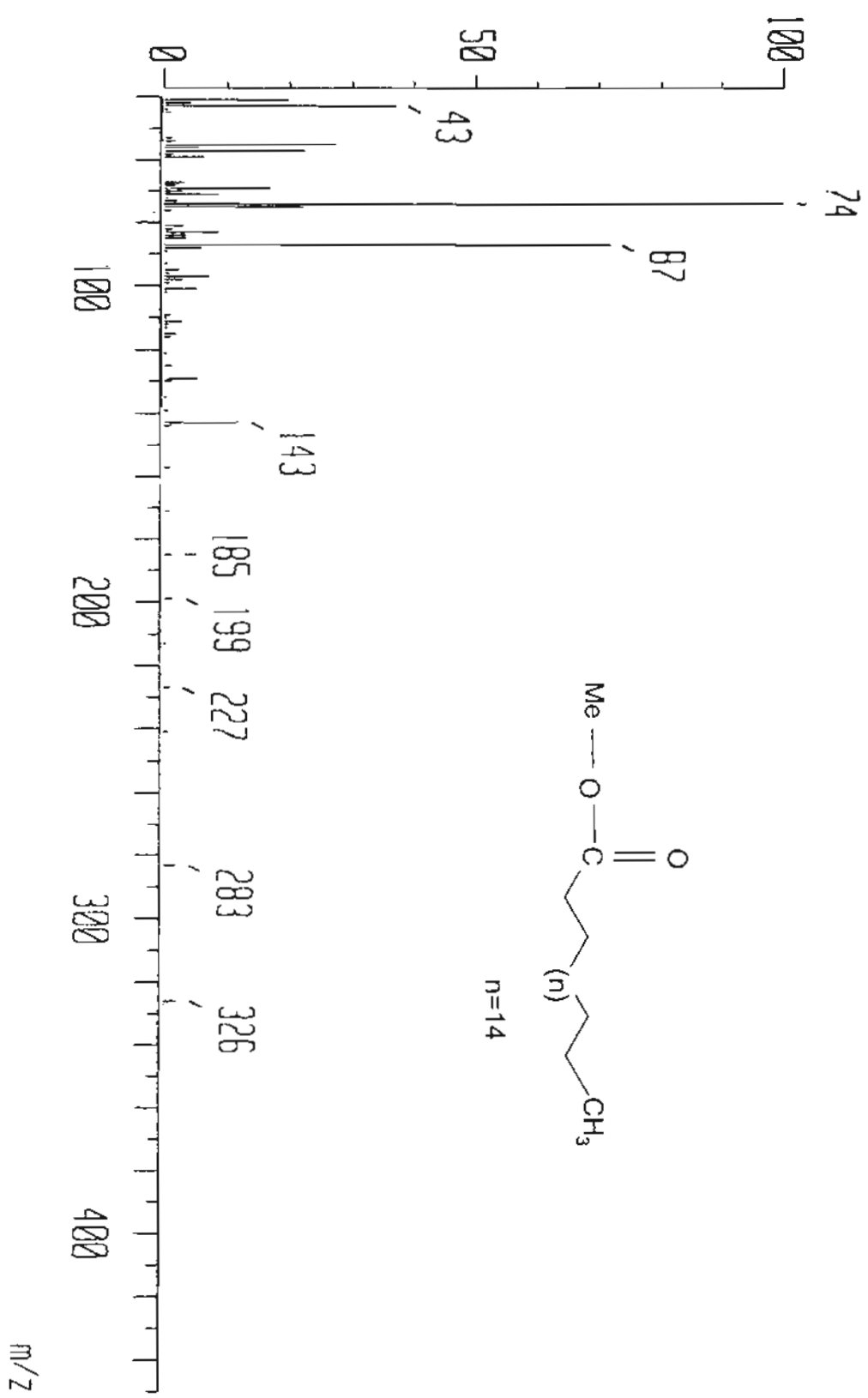
Anexo 12. CG-EM del margarato de metilo.



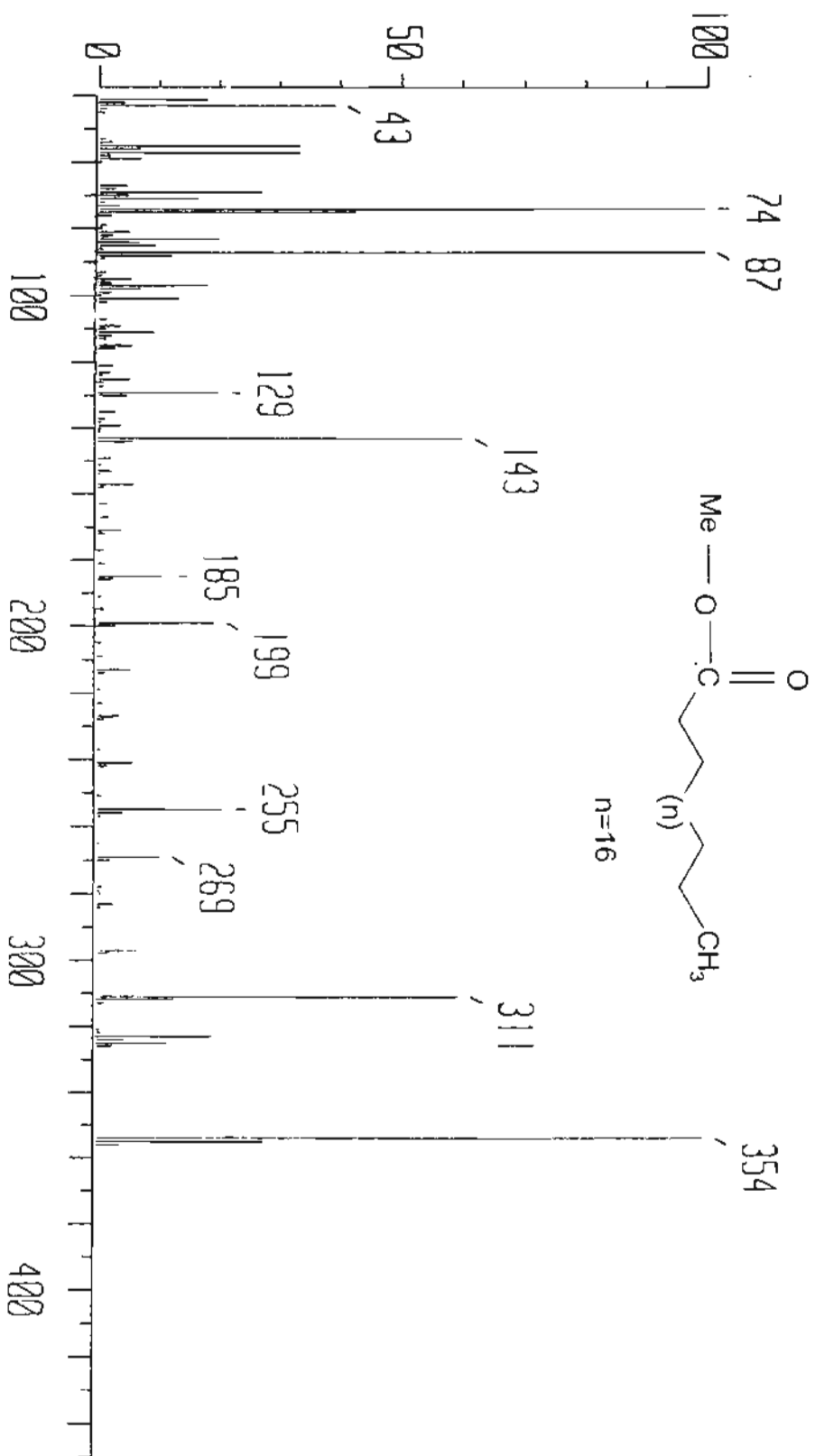
Anexo 13. CG-EM del estearato de metilo.



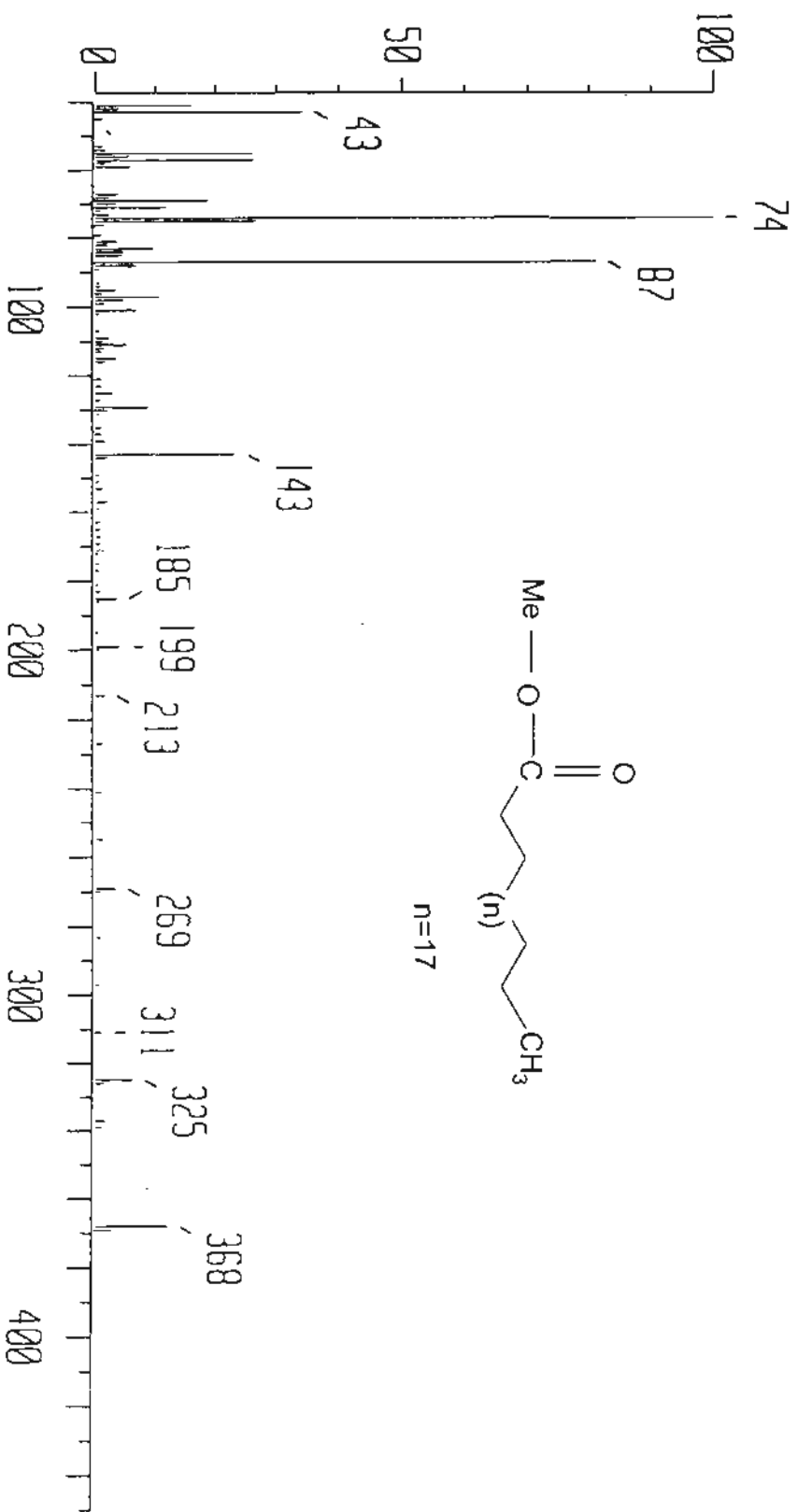
Anexo 14. CG-EM del nonadeciato de metilo.



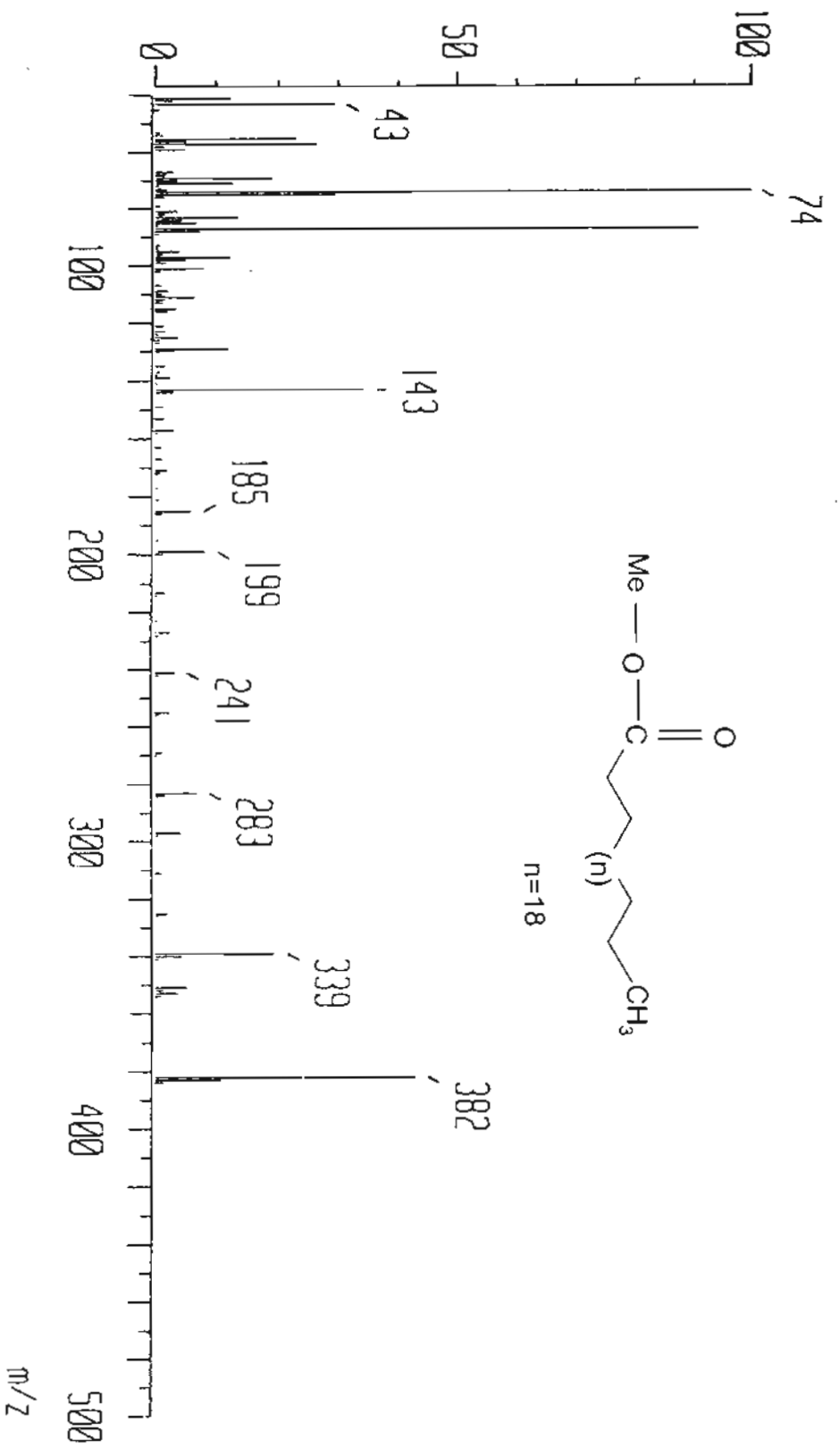
Anexo 15. CG-EM del araquidato de metilo.



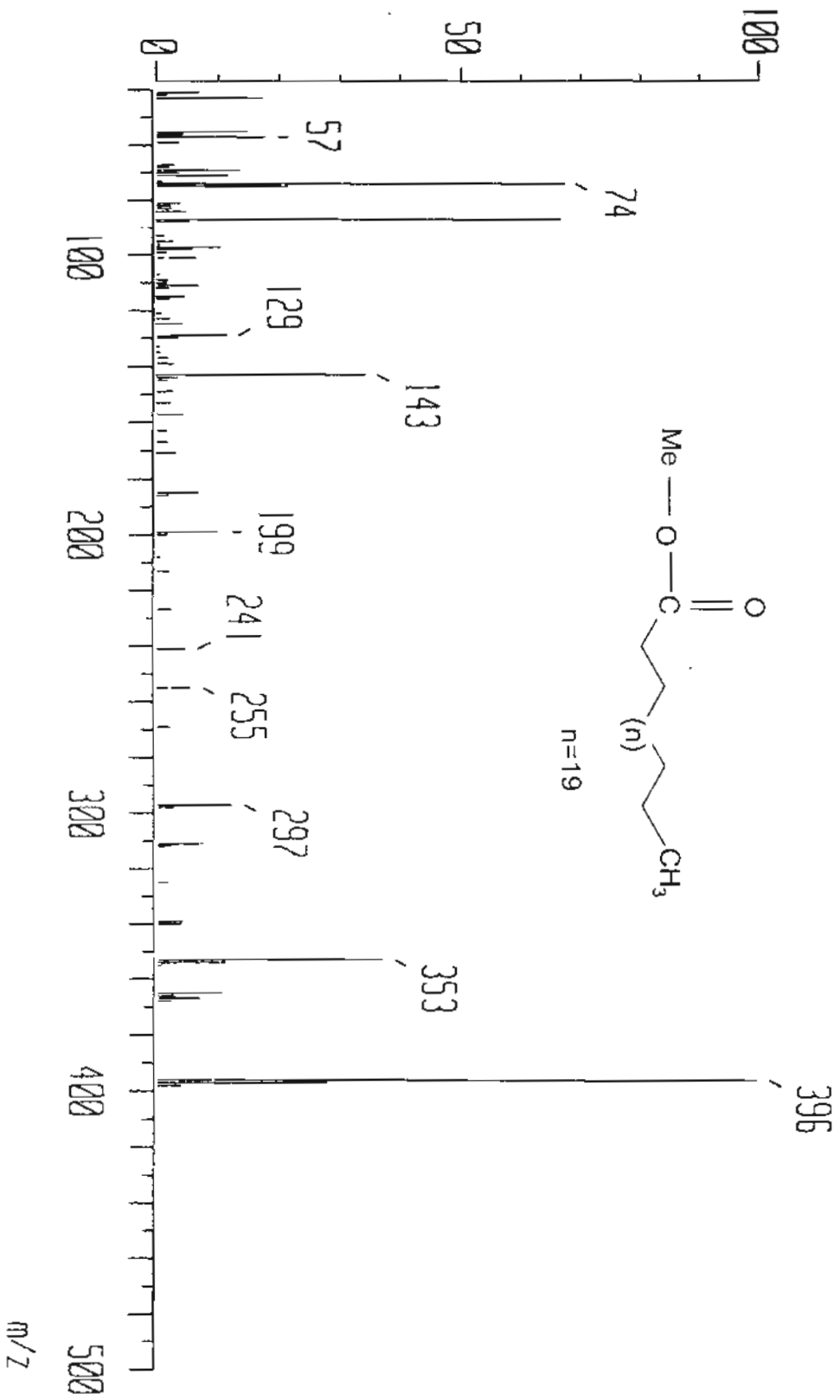
Anexo 16. CG-EM del behenato de metilo.



Anexo 17. CG-EM del tricosanoato de metilo.

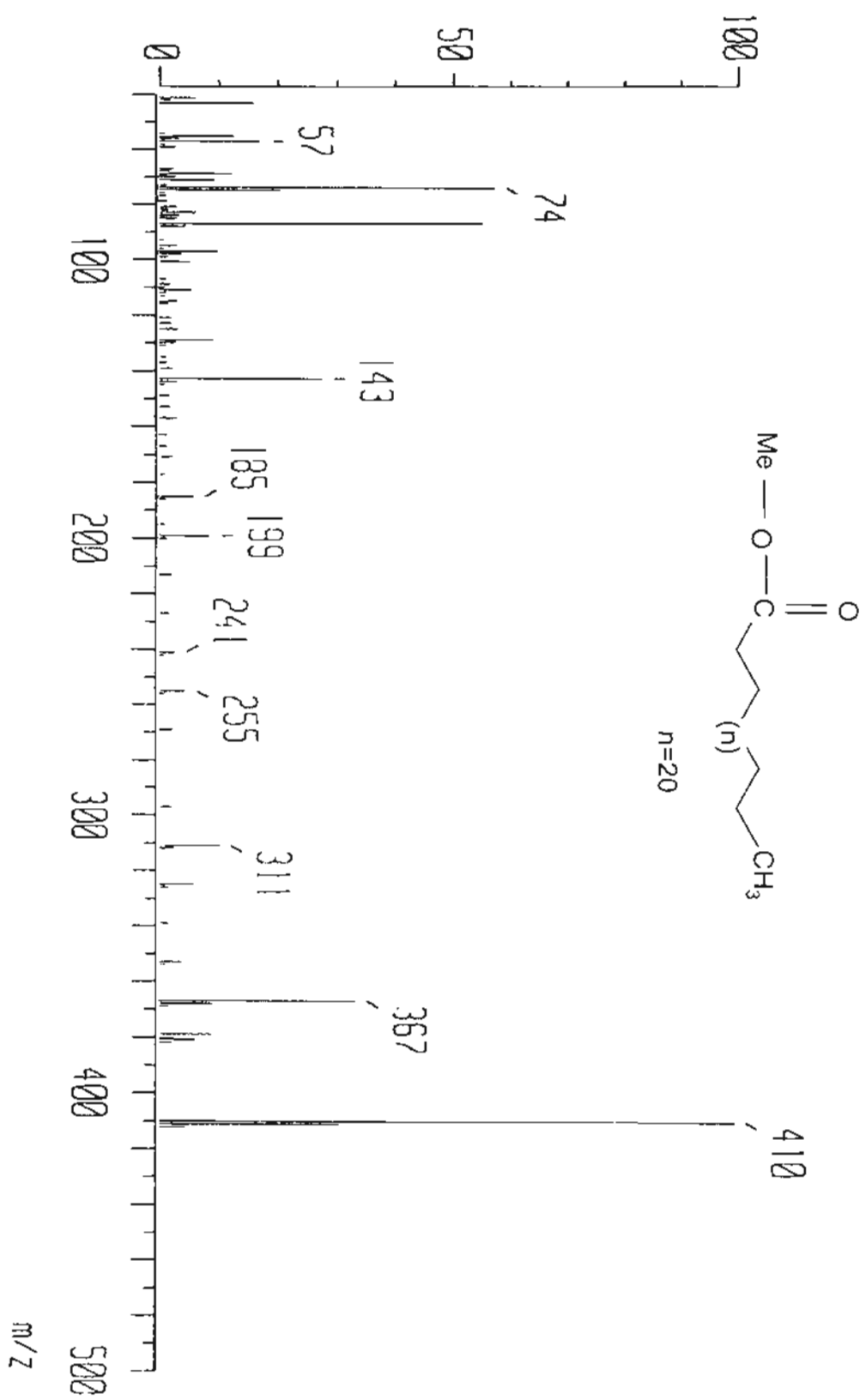


Anexo 18. CG-EM del tetraacosanoato de metilo.

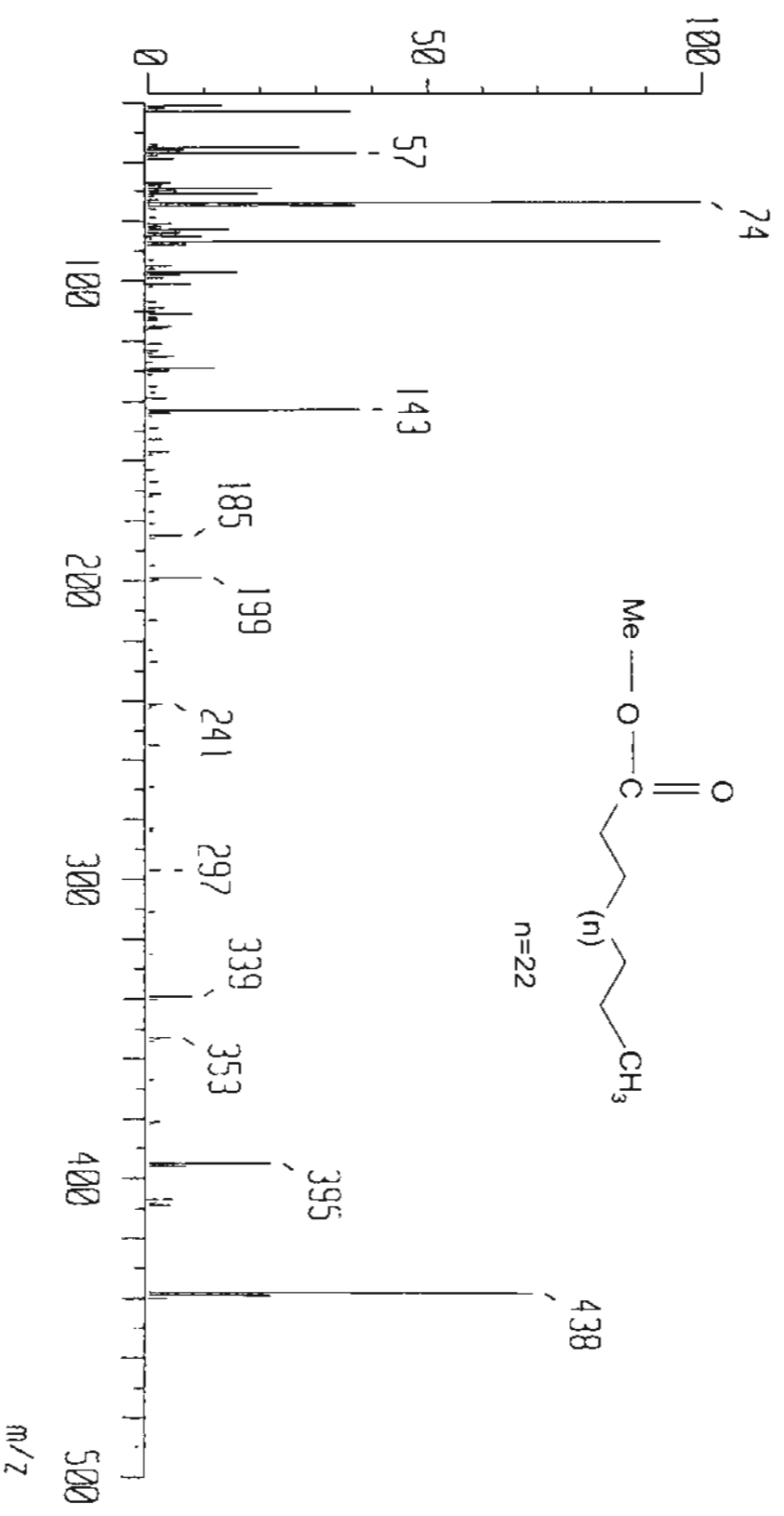


Anexo 19. CG-EM del pentacosanoato de metilo.





Anexo 20. CG-EM del hexacosanoato de metilo.



Anexo 21. CG-EM del octacosanoato de metilo.

# Monoglycerides and Fatty acids from *Ibervillea sonorae* Root: Isolation and Hypoglycemic Activity

Erica Hernández-Galicia<sup>1, 2, 3</sup>

Fernando Calzada<sup>2</sup>

Rubén Roman-Ramos<sup>1</sup>

Francisco J. Alarcón-Aguilar<sup>1</sup>

## Abstract

Eleven monoglycerides (MG), 1-monopalmitin (1), glyceryl 1-monomargarate (2), 1-monostearin (3), glyceryl 1-monononadecylate (4), glyceryl 1-monoarachidate (5), glyceryl 1-monobehe-nate (6), glyceryl 1-monotricosanoate (7), glyceryl 1-monotetra-cosanoate (8), glyceryl 1-monopentacosanoate (9), glyceryl 1-monohexacosanoate (10) and glyceryl 1-monooctacosanoate (11), together with five fatty acids (FA), lauric acid (12), myristic acid (13), pentadecanoic acid (14), palmitic acid (15) and stearic acid (16) were isolated of the root of *Ibervillea sonorae* Greene (Cucurbitaceae). Their structures were determined by spectroscopic and chemical methods as well as GC-MS analysis. The hypoglycemic activity of the dichloromethane (DCM) extract, of fractions (F1–F10 and SF1–SF5), of monoglycerides (MG) and of fatty acids (FA) mixtures obtained of the root from *I. sonorae* was evaluated in normoglycemic and alloxan-induced diabetic

mice. The results showed that by intraperitoneal administration the DCM extract (300 mg/kg), F9 (300 mg/kg) and SF1 (150 mg/kg) significantly reduced glucose levels in both models. For fraction SF1, the hypoglycemic activity was more pronounced than that of tolbutamide (150 mg/kg) used as control. However, neither MG (75 mg/kg) nor FA (75 mg/kg) mixtures isolated from SF1 exhibited a significant hypoglycemic effect. However, when MG and FA were combined in equal proportions (75 mg: 75 mg/kg), their effect was comparable to that of SF1. The observed activity for the DCM extract, F9, SF1 and the MG-FA mixture provides additional support for the popular use of this plant in the treatment of diabetes mellitus in Mexican traditional medicine.

## Key words

*Ibervillea sonorae* · Cucurbitaceae · dichloromethane extract · monoglycerides · fatty acids · hypoglycemic activity

## Introduction

*Ibervillea sonorae* Greene (syn. *Maximowiczia sonorae* S. Wats., Cucurbitaceae) is a perennial dioecious plant distributed in semi-arid areas of the states of Baja California, Sinaloa and Sonora, Mexico. The Mayo, Opata, Yaqui and Seri Indians call this tuber root "wareque" or "guareque" and use the plant for treatment of skin ailments [1]. Other uses include the treatment of

stomach ulcers and as a cathartic [2]. Today, it is considered as an anti-diabetic remedy which is drunk as an aqueous infusion [3]. Due to its popularity, pharmacological studies have been conducted by Alarcón-Aguilar and collaborators since 2002 on *I. sonorae* [4]. In these studies, freeze-dried juice and the crude DCM, the MeOH and the aqueous extracts from *I. sonorae* exerted hypoglycemic activity in normoglycemic and alloxan-diabetic rat and mice [4], [5]. Previous phytochemical reports using the

## Affiliation

<sup>1</sup> División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D.F.

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría, 2° Piso, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F., México

<sup>3</sup> Part of this work was taken from the Ph.D. thesis of Erica Hernández.

## Correspondence

Dr. Fernando Calzada E. Hernández-Galicia · Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales · Hospital de Pediatría · 2° Piso · Centro Médico Nacional Siglo XXI · IMSS · Av. Cuauhtémoc 330 · Col. Doctores · CP 06725, México D.F., México · Phone: +525-627-6900 ext. 22410 · Fax: +525-4761-0952 · E-mail: fercalber@hotmail.com, hergalcer@yahoo.com.mx

Received October 17, 2006 · Accepted January 5, 2007

## Bibliography

Planta Med 2007; 73: 236–240 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
DOI: 10.1055/s-2007-967117 · Published online February 22, 2007  
ISSN 0032-0943

root of this species have shown the presence of knoinos A – C and of knoinos A and B glycosides [2], [6]. Despite an extensive search, there is no knowledge on the chemical nature of its hypoglycemic compounds so far. Therefore, the aim of this work was the isolation and structural characterization of hypoglycemic compounds from *I. sonorae* root. Also, the hypoglycemic effect of the crude DCM extract, of fractions, of MG and of FA obtained from *I. sonorae* was evaluated in normoglycemic and alloxan-induced diabetic mice.

## Materials and Methods

### General experimental procedures

IR spectra were obtained in KBr disks on a Perkin-Elmer 599B spectrophotometer.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz) spectra were registered on a Varian VXR-3005 spectrometer in  $\text{CDCl}_3$  with TMS as internal standard. The chemical shifts are reported in  $\delta$  units (ppm). GC-MS data were recorded with a JEOL SX-102A mass spectrometer connected to a Hewlett Packard 5890-II gas chromatograph. The column was  $30\text{ cm} \times 0.3\text{ mm}$  i.d. phenyl methyl silicone, film thickness  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ . Helium was used as carrier gas. The column oven was temperature-programmed from 180 to 300 °C at 8 °C/min. The injector and detector temperatures were both 300 °C; electron energy 70 eV. Mass spectra parameters were adjusted by running the autotune program available in the Hewlett-Packard software; masses scanned were 33–800 au.

### Plant material

The tuber roots of *Ibervillea sonorae* Greene were purchased in the Sonora Herbal Market in Mexico City. A voucher specimen (14,184) was deposited in the Ethnobotanical Collection of the Herbarium IMSSM of the Mexican Security Social Institute (IMSS).

### Extraction and isolation

The air-dried material (8.7 kg) was ground and extracted exhaustively by maceration at room temperature with dichloromethane (20 L). After filtration, the extract was concentrated under reduced pressure to yield 163.0 g of a brown residue. The active extract (90.0 g) was adsorbed on 112.0 g of silica gel (silica gel G60, 70–230 mesh, Merck; Darmstadt, Germany) and applied to a column of silica gel (500.0 g). A gradient of hexane/ $\text{CHCl}_3$ /EtOAc/MeOH was used to elute the column, collecting 254 fractions of 250 mL each. Fractions were combined into ten pools (F1–F10) according to the similarity of their TLC patterns and evaluated for hypoglycemic activity in mice. Pharmacological testing indicated that F9 (39.5 g, fractions 239–244, eluted with EtOAc:MeOH, 8:2) was the most active fraction. F9 (35.0 g) was further chromatographed on a silica gel column (500.0 g) using  $\text{CHCl}_3$  with increasing amounts of EtOAc and EtOAc gradually enriched with MeOH to yield five secondary fractions (SF1–SF5). According to pharmacological testing, fraction SF1 (2.3 g, fractions 1–111, eluted with  $\text{CHCl}_3$ :EtOAc, 10:0, 9:1) concentrated the hypoglycemic activity. SF1 (1.5 g) was separated by column chromatography (silica gel, 1.9 g) eluting with a  $\text{CHCl}_3$ /EtOAc gradient system to give a mixture of fatty acids (FA, 12–16, 702.7 mg) and a mixture of monoglycerides (MG, 1–11, 348.0 mg).

*I-Monoglycerides mixture* (MG, 1–11): Colorless oil. IR (KBr):  $\nu_{\text{max}} = 3412, 2921, 2850, 1725, 1462, 1365, 1220, 1179, 720\text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ /TMS):  $\delta = 0.88$  (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, terminal  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (br s,  $n\text{CH}_2$ ), 2.33 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ), 3.59 (1H, dd,  $J = 11.5, 6$  Hz, H-3b), 3.70 (1H, dd,  $J = 11.5, 4$  Hz, H-3a), 3.93 (1H, m, H-2), 4.14 (1H, dd,  $J = 11.5, 6$  Hz, H-1b), 4.19 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.9$  Hz, H-1a).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ /TMS):  $\delta = 14.1$  (terminal  $\text{CH}_3$ ), 29.6 ( $n\text{CH}_2$ ), 31.8, 24.8, 22.6 (alkyl chain methylene carbon atoms), 34.1 ( $\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ), 63.3 (C-3), 65.1 (C-1), 70.2 (C-2), 174.3 ( $\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ).

*Fatty acids mixture* (FA, 12–16): White residue (hexane). IR (KBr):  $\nu_{\text{max}} = 3300, 2920, 2850, 1750, 1450, 1240, 720\text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ /TMS):  $\delta = 0.88$  (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, terminal  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (br s,  $n\text{CH}_2$ ), 2.34 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ /TMS):  $\delta = 14.1$  (terminal  $\text{CH}_3$ ), 29.7 ( $n\text{CH}_2$ ), 31.9, 24.6, 22.6 (alkyl chain methylene carbon atoms), 33.9 ( $\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ), 175.3 ( $\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ).  $t_R$  (min), GC-MS (70 eV):  $m/z$  (rel. int.) = (7.55 min), 200 [M12] $^+$  (50), (8.27), 228 [M13] $^+$  (70), (8.58), 242 [M14] $^+$  (100), (8.96), 256 [M15] $^+$  (100), (9.55), 284 [M16] $^+$  (100). All mass spectrum show the characteristic fragmentation pattern of a long chain fatty acid: 60, 43, 41.

*Fatty acid methyl esters mixture* (FAME, 17–27): Colorless oil ( $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr):  $\nu_{\text{max}} = 2923, 2853, 1731, 1463, 1270, 725\text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ /TMS):  $\delta = 0.87$  (3H, t,  $J = 6.7$  Hz, terminal  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (br s,  $n\text{CH}_2$ ), 2.29 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CO}_2$ ), 3.66 (3H, s,  $\text{CO}_2-\text{CH}_3$ ).  $t_R$  (min), GCMS (70 eV):  $m/z$  (rel. int.) = (8.99 min), 270 [M17] $^+$  (13), (9.55), 284 [M18] $^+$  (80), (10.10), 298 [M19] $^+$  (78), (10.62), 312 [M20] $^+$  (5), (11.13), 326 [M21] $^+$  (5), (12.20), 354 [M22] $^+$  (100), (12.79), 368 [M23] $^+$  (13), (13.47), 382 [M24] $^+$  (42), (14.22), 396 [M25] $^+$  (100), (15.13), 410 [M26] $^+$  (100), (17.55), 438 [M27] $^+$  (75). All mass spectrum show the characteristic fragmentation pattern of a long chain fatty acid methyl ester: 74, 43, 41.

### Alkaline hydrolysis of monoglycerides

A solution of the mixture of MG (40 mg) in methanolic NaOH (0.5 N, 2 mL) was refluxed at 45 °C for 5 h. Then,  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{BF}_3$  complex (2.5 mL, Merck) was added and the mixture heated for 15 min. To recover the dry esters, the mixture was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) and extracted with  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 5$  mL). The organic fraction was washed with  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 5$  mL) and dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Removal of solvent gave a mixture of fatty acid methyl esters (FAME, 20 mg) as a colorless oil.

### Animals

Male adult CD-1 mice (25–35 g) (Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico), with free access to water and food (Harlan Teklad; Madison, WI, USA), were used. Handling of the laboratory animals was performed in agreement with the statutes of the CICUAL (Institutional Committee for the Care and Use of the Animals) by the Official Mexican Rule [7]. Animals were housed 10 per cage in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative humidity  $55 \pm 3\%$ ) with an automatic light/dark cycle (12 h light: 12 h dark; lights on 08:00–20:00). Experimental diabetes was induced by two intravenous injections of alloxan (alloxan monohydrate (2,4,5,6-(1H,3H)-pyrimidinetetrone; Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA)) at intervals of 48 h ( $2 \times 75\text{ mg/kg}$ ). Glycemia levels were determined seven days after the last

administration. Animals with glycemia values  $\geq 200$  mg/dl were considered diabetic.

### Biological assays

The hypoglycemic activity of the samples was tested using a method previously described [5]. The effect of the DCM extract, of the fractions (F1 – F10 and SF1 – SF5), of MG and of FA mixtures were studied in normoglycemic and alloxan-induced diabetic mice. Mice ( $n = 12$  per group) were treated by the intraperitoneal route (*i.p.*) with each sample: extract (300 mg/kg in 4 mL/kg of corn oil), fractions (300 or 150 mg/kg in 4 mL/kg of corn oil) and compounds (MG or FA; 75 mg/kg in 4 mL/kg of corn oil) or vehicle (control, corn oil, 4 mL/kg). Tolbutamide (Artosin, tablets of 500 mg; Roche; Mannheim, Germany; 150 mg/kg in 4 mL/kg of isotonic saline solution) was used as control anti-diabetic drug. Blood samples were obtained from the tail vein of the animals at  $t = 0, 120,$  and  $240$  minutes after administration of test substances. Whole blood was used to determine glucose concentrations in a glycometer by using reagent strips (Accu-Check Sensor Comfort; Roche Diagnostics).

### Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical evaluation was done using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey-Kramer method of multiple comparisons using the software NCSS. Differences were considered to be significant at  $P < 0.05$  [8].

### Results and Discussion

Repeated column chromatography on silica gel of the DCM extract of *I. sonorae* yielded two mixtures of compounds, one containing monoglycerides (MG) and the second containing fatty acids (FA). The total yield of each mixture was 0.012% and 0.025% of the dry tuber roots, respectively.

Identification of the five FA (12 – 16) was performed by analysis of their MS obtained from GC-MS analysis using computer searches in commercial libraries as follows: lauric acid (12), myristic acid (13), pentadecanoic acid (14), palmitic acid (15) and stearic acid (16). All of them are reported for the first time from *I. sonorae*.

In case of the MG mixture, a white residue was obtained showing a single gray TLC spot by spraying with the 2%  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  solution in 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  reagent. The presence of a strong absorption band at  $1725 \text{ cm}^{-1}$  in the IR spectrum along with a signal at  $\delta_{\text{C}} = 174.3$  ( $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ) in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum suggested the presence of one ester carbonyl in the mixture. The proton signals at  $\delta_{\text{H}} = 4.19$  (1H, dd, H-1a), 4.14 (1H, dd, H-1b), 3.93 (1H, m, H-2), 3.70 (1H, dd, H-3a) and 3.59 (1H, dd, H-3b) and the carbons signals at  $\delta_{\text{C}} = 65.1$  (C-1), 70.2 (C-2) and 63.3 (C-3) are characteristic of a 1-monoglyceride and readily identify the system of glycerol, in agreement with the literature [9], [10]. The complex proton signals at  $\delta_{\text{H}} = 2.33$  (t,  $-\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 1.25 (brs,  $n\text{CH}_2$ ) and 0.88 (t, terminal  $\text{CH}_3$ ) along with carbon signals at  $\delta_{\text{C}} = 34.1$  ( $-\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 29.6 ( $n\text{CH}_2$ ), and 14.1 (terminal  $\text{CH}_3$ ) confirmed that compounds (1 – 11) are a mixture of 1-monoglycerides homologues with long-chain fatty acid esters

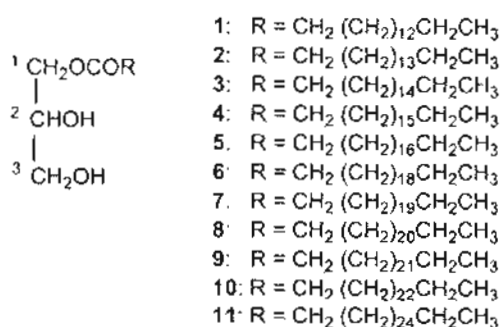


Fig. 1 Structures of compounds 1–11.

The length of the O-acyl chains could be determined by chemical methods. Saponification of the MG mixture followed by methylation of the obtained acids with  $\text{MeOH-BF}_3$  afforded a mixture of fatty acid methyl esters (FAME). The GC-MS of the FAME (17 – 27) mixture exhibited eleven peaks at  $m/z = 270, 284, 298, 312, 326, 354, 368, 382, 396, 410$  and  $438$ , identified as: methyl palmitate ( $\text{C}_{16}\text{O}_2\text{H}_{34}$ ), methyl margarate ( $\text{C}_{17}\text{O}_2\text{H}_{36}$ ), methyl stearate ( $\text{C}_{18}\text{O}_2\text{H}_{38}$ ), methyl nonadecylate ( $\text{C}_{19}\text{O}_2\text{H}_{40}$ ), methyl arachidate ( $\text{C}_{20}\text{O}_2\text{H}_{42}$ ), methyl behenate ( $\text{C}_{21}\text{O}_2\text{H}_{44}$ ), methyl tricosanoate ( $\text{C}_{24}\text{O}_2\text{H}_{48}$ ), methyl tetracosanoate ( $\text{C}_{25}\text{O}_2\text{H}_{50}$ ), methyl pentacosanoate ( $\text{C}_{26}\text{O}_2\text{H}_{52}$ ), methyl hexacosanoate ( $\text{C}_{27}\text{O}_2\text{H}_{54}$ ) and methyl octacosanoate ( $\text{C}_{28}\text{O}_2\text{H}_{58}$ ), respectively. GC-MS analysis of the fatty acid methyl esters showed them to be 31.9% behenate, 21.0% nonadecylate, 20.3% palmitate, 8.1% stearate and 6.2% arachidate. Therefore, compounds 1 – 11 were identified as a mixture of eleven fatty esters of glycerol, of which the fatty acids were of the 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 and 28 carbon type, respectively. On the basis of the above evidence, the structures for MG (1–11) were established as 1-monopalmitin (1), glyceryl 1-monomargarate (2), 1-monostearin (3), glyceryl 1-monononadecylate (4), glyceryl 1-monoarachidate (5), glyceryl 1-monobehenate (6), glyceryl 1-monotricosanoate (7), glyceryl 1-monotetracosanoate (8), glyceryl 1-monopentacosanoate (9), glyceryl 1-monohexacosanoate (10) and glyceryl 1-monooctacosanoate (11), respectively. All of them are reported for the first time from *I. sonorae* (Fig. 1).

Table 1 shows the hypoglycemic effect obtained in normoglycemic and alloxan-induced diabetic mice after administration of the DCM extract, of fractions (F9 and SF1), of MG and of FA mixtures obtained from *I. sonorae*. In the control groups (corn oil), no significant variation in basal glycemia during the testing was observed whereas tolbutamide reduced it at 120 and 240 min ( $P < 0.05$ ) in normoglycemic mice and caused no significant reduction in diabetic mice. Alloxan selectively destroys pancreatic beta cells and in sequentially administered doses, it can produce a model of severe (without  $\beta$ -cells functioning) or moderate (with  $\beta$ -cells functioning) diabetes. On the other hand, the principal mechanism of action of the sulphonylureas (family of hypoglycemic agents of which tolbutamide is a representative member) is the induction of insulin secretion from active beta cells. In our study, tolbutamide did not significantly reduce glycemia because the diabetes induced experimentally can be considered as severe, with scarce functioning of beta cells to exhibit hypoglycemic action. In diabetic mice, the DCM extract at 300 mg/kg

Table 1 Hypoglycemic effect produced by the *i. p.* administration of the DCM extract, fractions (F9 and SF1), MG and FA mixtures obtained from *I. sonorae* in normoglycemic and alloxan-induced diabetic mice (n = 12)

Study	Treatment	Dose	Blood glucose mg/dL (mean ± S.E.M)		
			In fasting	120 min	240 min
1. Normoglycemic mice	Control (corn oil)	4 mL/kg	55.3 ± 2.2	60.3 ± 3.4	53.5 ± 1.6
	Tolbutamide	150 mg/kg	51.6 ± 2.5	32.8 ± 2.6*	36.7 ± 3.0*
	DCM extract	300 mg/kg	65.6 ± 4.2	66.4 ± 4.9	35.0 ± 5.1*
	F9	300 mg/kg	49.3 ± 1.8	36.8 ± 3.1*	17.4 ± 2.4*
	SF1	150 mg/kg	62.2 ± 6.2	18.7 ± 2.9*	15.7 ± 1.4*
2. Alloxan-diabetic mice	Control (corn oil)	4 mL/kg	332.2 ± 37.4	331.0 ± 42.5	311.7 ± 33.8
	Tolbutamide	150 mg/kg	339.0 ± 36.7	312.7 ± 38.7	271.7 ± 37.9
	DCM extract	300 mg/kg	374.0 ± 9.5	184.0 ± 24.6*	63.0 ± 7.6*
	F9	300 mg/kg	332.8 ± 23.2	289.2 ± 85.6	149.0 ± 16.9*
	SF1	150 mg/kg	343.7 ± 9.0	197.2 ± 51.9*	110.0 ± 23.1*
	MG	75 mg/kg	395.5 ± 27.1	439.2 ± 37.8	453.7 ± 25.8
	FA	75 mg/kg	383.3 ± 33.8	391.0 ± 32.5	397.0 ± 44.6
	MG and FA	75 mg; 75 mg/kg	410.5 ± 28.5	516.5 ± 24.0	299.0 ± 30.1*

\*Significantly different from pre-value in fasting P < 0.05

showed a moderate hypoglycemic activity at 120 min; its effect was significant after 240 min. In the case of normoglycemic mice, a hypoglycemic effect was observed at 240 min.

When primary fractions were tested in normoglycemic and alloxan-induced diabetic mice, F9 was the most active, causing significant reduction in the glucose levels at 240 min. The secondary fraction SF1 was the most active in both used models at 120 and 240 min; its hypoglycemic activity was stronger than that of tolbutamide used as anti-diabetic control drug. MG and FA derivatives from SF1 did not cause a hypoglycemic effect in normoglycemic and diabetic mice. In contrast, when MG and FA were combined equally (75:75 mg/kg), this mixture significantly reduced glycemia. At the timepoint t:360 minutes, its effect was comparable to that of SF1.

In this study, a chemical and pharmacological screening was performed with *I. sonorae* root in order to isolate its hypoglycemic components. The hypoglycemic effect detected for the DCM extract is in agreement with previous reports [4], [5]. In previous studies carried out with the traditional preparation (water decoction) and with the DCM extract of *I. sonorae*, we have demonstrated that the acute and chronic hypoglycemic effect of *I. sonorae* root occurs in a dose-dependent manner and lacks toxicity. In these studies, the extracts were administered by oral and intraperitoneal routes, and dose-response studies were also performed. The intraperitoneal mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) for the DCM extract was found to be 425.3 mg/kg, and the oral LD<sub>50</sub> was 2158 mg/kg. The *p. o.* daily administration of the DCM extract (300 mg/kg/day) for 41 days resulted in marked hypoglycemic activity in alloxan-induced diabetic rats and in improvements in triglycerides and GPT levels in comparison to the diabetic control group. Total cholesterol GOT and uric acid levels were not affected, showing, in addition, a clear increase in body weight. Since a reduction in body weight has commonly been used as indicator of adverse effects for drugs, these results suggested that the *p. o.* administration of the DCM extract is well tolerated [5]. The lethal

effects were attributed to the severe hypoglycemia induced by the extract itself because the observed cases of death were due to asphyxia from respiratory arrest during or between convulsions, which were also observed in the animals [4], [5].

Fractionation of the DCM extract yielded 10 primary fractions, including the active EtOAc fraction (PF9). Column chromatography of this fraction yielded five secondary fractions, including the active SF1 fraction containing sixteen compounds 1–16.

Several fatty acids with biological activity have been proposed from medicinal plants, such as *Alstomia spatulata* (Apocynaceae), *Centaurea sendia* (Asteraceae), *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae), *Cornus officinalis* (Cornaceae), *Bryonia alba* (Cucurbitaceae), *Euphorbia prostate* (Euphorbiaceae), *Calamintha macrostema* (Lamiaceae), *Calamintha umbrosa* (Lamiaceae), *Mesona procumbens* (Lamiaceae) and *Orthosiphon grandiflorus* (Lamiaceae) [11]. The fatty acid and monoglycerides possess bactericidal effects [12]. Also, monoglycerides show Lp-PLA<sub>2</sub> inhibitory activity [13] and prevent prostatic hyperplasia [14]. Previous phytochemical studies with the root of this species have shown the presence of kinoin A–C and kinoin A and B glycosides [2], [6]. Nevertheless, these compounds have not been reported to possess hypoglycemic activity.

The hypoglycemic effect demonstrated for extracts, fractions and mixtures of compounds derived from the tuber root of *I. sonorae* supports the use of the above-mentioned plant as an anti-diabetic remedy.

#### Acknowledgements

This research was partially supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, and the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, The Netherlands, through a grant to Francisco Javier Alarcon-Aguilar PhD.

## References

- <sup>1</sup> Aguilar CA, Xolalpa MS. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia* 2002; 53: 24–35.
- <sup>2</sup> Achenbach H, Horn K, Domínguez A, Rombold C, Gomez L. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochemistry* 1993; 33: 437–45.
- <sup>3</sup> Xolalpa MS. *A tu Salud. Rev Med Prev* 2006; 26: 69–71.
- <sup>4</sup> Alarcon-Aguilar FJ, Campos-Sepulveda AE, Xolalpa-Molina S, Hernandez-Galicia E, Roman-Ramos R. Hypoglycemic activity of *Ibervillea sonora* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharm Biol* 2002; 40: 570–5.
- <sup>5</sup> Alarcon-Aguilar FJ, Calzada-Bermejo F, Hernandez-Galicia E, Ruiz-Angeles C, Roman-Ramos R. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* extracts-II. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 447–52.
- <sup>6</sup> Weckerl E, Hummer K, Domínguez A, Horn K, Achenbach H. The absolute configuration of koinin C. *Phytochemistry* 1993; 33: 447–8.
- <sup>7</sup> NOM-062-ZOO-1999 (revised in 2001 Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Mexico. Diario Oficial de la Federación: 6 de Diciembre de 1999; 2001.
- <sup>8</sup> Steel R, Torrie J. *Bioestadística, principios y procedimientos*. México: McGraw-Hill; 1989. 662.
- <sup>9</sup> Kawagishi H, Miyazawa T, Kume H, Arimoto Y, Inakuma T. Aldehyde dehydrogenase inhibitors from the mushroom *Clitocybe clavipes*. *J Nat Prod* 2002; 65: 1712–4.
- <sup>10</sup> Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S et al. Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 379–87.
- <sup>11</sup> Marles KJ, Fansworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; 2: 137–89.
- <sup>12</sup> Bergsson G, Steingrimsdóttir O, Thormar H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 258–62.
- <sup>13</sup> Song-Lee W, Jeong KM, Beck Y, Park YD, Jeong IS. 1p-PLA2 inhibitory activities of fatty acid glycerols isolated from *Saururus chinensis* roots. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 3573–5.
- <sup>14</sup> Shimada H, Tyler VE, McLaughlin JL. Biologically active acylglycerides from the berries of Saw-Palmetto (*Serenoa repens*). *J Nat Prod* 1997; 60: 417–8.