

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCION DE POSGRADO



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD  
HIPOGLUCEMIANTE DE *Phoradendron tomentosum*  
(DC) Engelm, SOBRE UN MODELO DE RATAS  
DIABÉTICAS DE EXPERIMENTACION

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
con especialidad en  
QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Presenta:  
BIOL. GLORIA AGUILAR CUESTAS

Monterrey, N. L.

Febrero de 2001



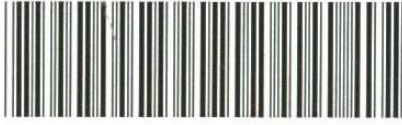
TM

Z532

FCB

2001

A3



1020145355

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCION DE POSGRADO**



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD  
HIPOGLUCEMIANTE DE *Phoradendron tomentosum*  
(DC) Engelm, SOBRE UN MODELO DE RATAS  
DIABÉTICAS DE EXPERIMENTACION**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
con especialidad en  
QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

**Presenta:  
BIOL. GLORIA AGUILAR CUESTAS**

**Monterrey, N. L.**

**Febrero de 2001**



FONDO  
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE  
DE *Phoradendron tomentosum* (DC) Engelm, SOBRE UN  
MODELO DE RATAS DIABÉTICAS DE  
EXPERIMENTACIÓN

## TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS  
con especialidad en  
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Presenta:

BIOL. GLORIA AGUILAR CUESTAS

Monterrey, N.L.

Febrero de 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE  
*Phoradendron tomentosum* (DC) Engelm, SOBRE UN MODELO DE  
RATAS DIABÉTICAS DE EXPERIMENTACIÓN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS  
con especialidad en  
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Presenta:

BIOL. GLORIA AGUILAR CUESTAS

COMISION DE TESIS:

DIRECTOR:

  
M.C. Carmina Calzado Flores

CO-DIRECTOR:

  
Dra. María Julia Verde Star

SECRETARIO:

  
Dra. Azucena Oranday Cardenas

VOCAL:

  
Dra. Leticia Hauad Marroquin

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Experimental de la División de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, (UANL).



## AGRADECIMIENTOS.

A la M.C. Carmina Calzado Flores por dirigir este trabajo de tesis, por su apoyo, paciencia, dedicación, confianza y amistad para concluir este trabajo.

A mi Honorable Comisión de Tesis.

Dra. María Julia Verde Star.  
Dra. Azucena Oranday Cárdenas.  
Dra. Leticia A. Hauad Marroquín

Quienes con su experiencia profesional y acertados comentarios colaboraron conmigo, para realizar este trabajo.

Al auxiliar de Laboratorio Sr. José Luis Paz Cantú por brindarme su amistad.

Al encargado del Bioterio M.C. Gerardo Lozano Garza por su siempre buena disposición para facilitarme el área de trabajo y ayudarme a marcar y disectar a las ratas.

Al M.C. Ricardo M. Cerda Flores por su apoyo en el análisis estadístico de este trabajo de Investigación.

A Karla, Alejandro y Sr. Francisco Reséndiz cuidadores del Bioterio.

Al Dr. Antonio Luna de la Rosa y Francisco Treviño González por su excelente trabajo de Fotografía.

A los compañeros Q.B.P Miguel Echavarrí y el Sr. Oscar López por su buena disposición para ayudarme a colector la planta motivo de este estudio.

Al Químico Guillermo González Quiroga, Rogelio, Karla Norma .Irma y Adrián por brindarme su amistad.

A todas aquellas personas que hicieron que mi estancia en el CIBIN fuera agradable y a todas aquellas que omito y que alguna manera colaboraron para llegar al término de mi trabajo, GRACIAS.

Piensa en un sueño  
ese que nunca has podido lograr  
tan sencillo de platicar y tan  
difícil de realizar,  
mira las aves  
no se preocupan por que comerán,  
ni tampoco si frío tendrán  
pues muy bien saben  
Dios les dará,  
extiende tus alas  
levanta el vuelo  
llega tan alto como tú quieras.

Jiram.

Nada te turbe  
nada te espante  
todo se pasa  
Dios no se muda  
la paciencia  
todo lo alcanza  
quien a Dios tiene  
nada le falta  
sólo Dios basta

Santa Teresita del Niño Jesús

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	I
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1. Diabetes Mellitus.....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
1. Medicina Alópata.....	3
2. Medicina Tradicional.....	3
3. <i>Phoradendron tomentosum</i> .....	4
4. Características Botánicas.....	4
5. Clasificación Taxonomica.....	5
6. Hábitat o Localización.....	5
7. Usos en Medicina Tradicional.....	5
8. Estudios Fitoquímicos.....	6
9. Características Fitoquímicas.....	7
<b>HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>JUSTIFICACION</b> .....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
1. Objetivo General.....	10
2. Objetivos Específicos.....	10
<b>MATERIAL Y METODO</b> .....	11
1. Inducción Experimental de la Diabetes Mellitus.....	11
2. Determinación de la Dosis Optima Diabetogénica de EZT.....	11
3. Medición de los Niveles de Glucosa Sanguínea y Urinaria.....	12
4. Extracción de <i>Phoradendron tomentosum</i> .....	13
5. Efecto Hipoglucemiante de <i>Phoradendron tomentosum</i> .....	14
6. Estudio Comparativo de la Actividad Hipoglucemiante de <i>Phoradendron tomentosum</i> con Drogas Hipoglucemiantes Reconocidas: Glibenclamida y Fenformina.....	15

7. Hipoglucemiantes Orales Empleados por la Población.....	15
8. Análisis Estadístico.....	16
9. Pruebas Fitoquímicas de Reacciones Coloridas para la Detección de Metabolitos Activos en la <i>Phoradendron tomentosum</i> .....	17
10. Métodos Cromatográficos.....	19
<b>REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>35</b>

## LISTA DE TABLAS Y FOTOGRAFÍAS

Tabla 1. Niveles de Glucosa Sanguínea (mg/dl) en Ratas (Sprague-Dawley) que Recibieron i.p. Diferentes Dosis de Estreptozotocina (EZT).....	25
Tabla 2. Efecto del Extracto Acuoso Obtenido de <i>P. tomentosum</i> sobre los Niveles De Glucosa sanguínea en Ratas Diabéticas y Ratas no Diabéticas.....	26
Tabla 3. Efecto del Extracto Acuoso obtenido de <i>P. tomentosum</i> sobre los Niveles Glucosa sanguínea en Ratas Diabéticas y no Diabéticas.....	27
Tabla 4. Niveles de Glucosa (mg/dl) en Ratas Diabéticas y no Diabéticas que Recibieron los Tratamientos de Extracto acuoso de <i>P. tomentosum</i> y Agua a Diferentes Tiempos.....	28
Tabla 5. Niveles de Glucosa Sanguínea (mg/dl) en Ratas No Diabéticas Tratadas con Extracto Acuoso de <i>P. tomentosum</i> y Glibenclamida.....	29
Tabla 6. Niveles de Glucosa Sanguínea (mg/dl) en Ratas Diabéticas tratadas con Extracto Acuoso de <i>P. tomentosum</i> y con Clorhidrato de Fenformina.....	30
Tabla 7. Resultados de las Pruebas Fitoquímicas realizadas con <i>P. tomentosum</i> .....	31
Tabla 8. Factor de Retardo (Rf) de las Manchas Observadas de los Metabolitos Secundarios de las Cromatografías Practicadas al Extracto metanólico de <i>P. tomentosum</i> .....	32
Figural.....	38
Fotografía 1.....	39
Fotografía 2.....	39
Fotografía 3.....	40
Fotografía 4.....	40
Fotografía 5.....	41
Fotografía 6.....	42
Fotografía 7.....	42
Fotografía 8.....	43
Fotografía 9.....	44
Fotografía 10.....	44



## ABREVIATURAS

β	beta
bd	bidestilada
°C	grados centígrados
cm	centímetro
CIBIN	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
CH <sub>3</sub> Cl	cloroformo
DM	diabetes mellitus
DMID	diabetes mellitus insulino dependiente
DMNID	diabetes mellitus no insulino dependiente
DMSO	dimetilsulfóxido
EZT	estreptozotocina
EtOH	etanol
HGO	hipoglucemiantes orales
hr.	hora
HP	caballos de fuerza
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
i.p.	intraperitoneal
l	litro
MeOH	metanol
mg/dl	miligramo por decilitro
mg/kg	miligramo por kilo de peso
min	minuto
ml	mililitro
pH	pH o potencial de hidrógeno
RPD	retinopatía diabética proliferativa
Kg	kilogramo
Rf	factor de retardo

## RESUMEN

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que afecta a un elevado porcentaje de la población que se encuentra en la etapa productiva, es por eso que el Sector Salud la ha considerado como uno de los problemas nosológicos de atención prioritaria. La DM es un conjunto de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y anatómicas que integran un síndrome que corresponde a una alteración de la homeostasia de la glucosa, secundaria a una deficiencia de la secreción de insulina por las células Beta del páncreas [1].

Dentro de la Medicina Tradicional en México existen diversas plantas utilizadas por la población para combatir la DM, algunas plantas que pertenecen a la familia de las Loranthaceae han sido empleadas empíricamente en el norte de nuestro país para tratar esta enfermedad, de ahí la importancia de llevar a cabo la evaluación farmacológica de la planta medicinal *Phoradendron tomentosum* (*P. tomentosum*) pues pensamos que posee propiedades hipoglucemiantes favorables para el control de la glicemia de los pacientes diabéticos.

El Objetivo planteado para este estudio de investigación es el siguiente: Determinación de la actividad hipoglucemiante de *Phoradendron tomentosum* (DC)Engelm, en un modelo de animales diabéticos (ratas Sprague Dawley) inducido experimentalmente.

Se localizó e identificó la planta en estudio (*P. tomentosum*), se procedió a su recolección e inmediatamente se llevó al laboratorio de botánica para su correcta clasificación taxonómica. Subsecuentemente se sometió a un proceso de desecado y se pulverizó. Con este material se preparó una infusión acuosa (50 g/L de agua). Para este estudio se emplearon 25 ratas machos Sprague-Dawley con un peso promedio de 334 g las cuales se distribuyeron de manera aleatoria en cinco jaulas en grupos de cinco ratas cada uno, se llevó un registro de sus valores de glucosa y peso antes y durante el tiempo de estudio. Cada uno de los grupos recibieron i.p. diferentes dosis de estreptozotocina (EZT): 10-50 mg/kg en un volumen de 0.5 ml. El grupo testigo recibió igual volumen de agua bidestilada. Después de obtener un grupo de animales con una diabetes moderada (170-300 mg/dl de glucosa) se procedió a administrarles el extracto acuoso preparado con la planta en estudio y determinar su actividad hipoglucemiante. Finalmente se hizo un estudio comparativo entre el extracto acuoso de *P. tomentosum*, agua y 2 drogas hipoglucemiantes conocidas: glibenclamida y fenformina. Para este estudio se manejaron 20 animales, los cuales se dividieron en diabéticos y no diabéticos, se les hizo determinación de peso y glucosa a 3 diferentes tiempos para tratar de determinar los compuestos presentes en el estudio del extracto metanólico.

Resultados y Conclusiones: una dosis única de 35 mg/kg de EZT fue suficiente para obtener nuestro modelo de animales moderadamente diabéticos. Los niveles de glucosa de éstos disminuyeron después de 45 días de tratamiento con el extracto acuoso de *P. tomentosum*. Posteriormente el estudio comparativo con los diferentes tratamientos: extracto acuoso de la planta, fenformina y agua no produjo ningún cambio en los niveles de glucosa sanguínea de los animales diabéticos en cambio, estos mismos tratamientos administrados a los grupos de animales no diabéticos produjeron una marcada disminución de los niveles de glucosa de los grupos de animales que recibieron ya sea el extracto acuoso de *P. tomentosum* o la glibenclamida. Las cromatografías y las reacciones coloridas del extracto metanólico de la planta revelaron que este contiene: saponinas esteroidales y sesquiterpenlactonas

## **INTRODUCCIÓN.**

### **1.- Diabetes Mellitus.**

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que afecta a un elevado porcentaje de nuestra población principalmente aquella que se encuentra en la etapa productiva. Por eso es que el Sector Salud de nuestro país la ha considerado como uno de los problemas nosológicos de atención prioritaria. La DM es un conjunto de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y anatómicas que integran un síndrome que corresponde a una alteración de la homeostasia de la glucosa secundaria a una deficiencia en la secreción de insulina por las células Beta del páncreas [1].

Una de las clasificaciones más aceptadas en relación a esta enfermedad comprende los grupos siguientes [2]:

- Tipo I: Diabetes mellitus insulino dependiente (DMID);
- Tipo II: Diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID).
- Tipo III: Diabetes asociada a otros procesos y síndromes.
- Tipo IV: Diabetes mellitus gestacional.

En la Diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), una insulino penia importante, el paciente requiere de la aplicación de insulina para vivir y tiene una tendencia a la cetosis. La DMID se puede presentar a cualquier edad pero, con mayor frecuencia en los jóvenes.

La Diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), sin tendencia a la cetosis y asociada a la obesidad, puede presentarse en las familias con rasgos genéticos autosómicos dominantes y, se puede presentar a cualquier edad pero, con mayor frecuencia en los adultos y puede requerir de la aplicación de insulina para su control. La diabetes tipo II está asociada a otros procesos o síndromes [3].

Las complicaciones de la DM las podemos clasificar en agudas y crónicas.

- A) Complicaciones agudas: hiperglucemia severa, cetoacidosis, coma hiperosmolar con una visión borrosa transitoria (debido a variaciones bruscas de glucosa intraocular que cambia el índice de refracción del humor acuoso) [4].
- B) Complicaciones crónicas: retinopatía diabética, que puede conducir a la ceguera, padecimientos cardiovasculares como hipertensión arterial, enfermedad isquémica del miocardio, neuropatía periférica, nefropatías, microangiopatías que origina la retinopatía y el pie diabético [5-9].

Dentro de las múltiples complicaciones de la DM, una de las más frecuentes corresponde a la retinopatía, la cual puede llegar a producir incapacidad visual total e irreversible. La retinopatía diabética proliferativa (RDP) es la primera causa en nuestro medio del hemovítreo o sangrado de la cavidad vítrea del ojo. Se sabe que esta complicación es la causa de ceguera en 1 de cada 100 000 habitantes. El hemovítreo también puede ser originado por otras causas tales como: desgarros retinianos,

desprendimiento posterior del vítreo, oclusión de la vena central de la retina, enfermedad de células falciformes, enfermedad de Eales, anomalías congénitas de los vasos retinianos y trauma ocular [10].

En la consulta de los Servicios de Endocrinología en el Hospital Regional de Especialidades N0. 25 del IMSS en esta ciudad, se presentan frecuentemente pacientes con diferentes grados de complicación de la DM, por lo que el éxito de este estudio no sólo representaría un beneficio para toda aquella población derechohabiente

El estudio de los productos naturales ha sido importante desde la época precortesiana en la que productos de origen vegetal y animal eran utilizados con fines medicinales. Su uso empírico ha perdurado hasta nuestros días y se ha convertido en la fuente principal de información para la producción de nuevos medicamentos en la industria farmacéutica.

De aquí la importancia de realizar la evaluación farmacológica de la planta *Phoradendron tomentosum* utilizada de manera empírica por la población del norte de nuestro país.

## **ANTECEDENTES**

### **1. Medicina Alópata**

El manejo inicial de los pacientes con diabetes mellitus no dependiente de insulina DMNID consiste en una restricción calórica y ejercicio regular, si posterior a ocho semanas con estas medidas no se logra un buen control de su glicemia, se indica el tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes orales (HGO) como son: las sulfonilureas y las biguanidas [11].

Entre las sulfonilureas más utilizadas se encuentran la tolbutamida, clorpropamida y glibenclamida sin embargo, estos medicamentos presentan efectos adversos importantes como la hipoglucemia que puede ser reversible o no reversible, además de que potencian los efectos represores del sistema nervioso central y llegan a producir problemas hematológicos y enfermedades cardiovasculares.

Las biguanidas son agentes hipoglucemiantes efectivos en enfermos con DMNID obesos o no obesos, se pueden utilizar en forma aislada o en combinación con las sulfamidas.

En los Estados Unidos estos fármacos se retiraron del mercado porque se ha observado que pueden provocar acidosis láctica. A este grupo pertenecen la metformina y la fenformina [11].

Moore y Cols. Afirman que la prescripción médica cuidadosa y la educación de los pacientes con DM por el médico responsable, reduce el riesgo de los efectos adversos del tipo accidental y no accidental que se presentan por ingerir una sobredosis de estos medicamentos lo cual también represente un problema clínico frecuente [12].

### **2. Medicina Tradicional**

Desde la aparición del hombre sobre el planeta se ha podido constatar la importancia de las plantas, las cuales se han utilizado ya sea como alimento, vivienda, vestido, ornato y medicamentos.

Los primeros antecedentes que se tienen sobre el modo de vida y uso de las plantas por parte de las tribus que habitaron la región norte del país datan del año 1649, en los relatos del cronista Capitán Alfonso de León: "Relación y Discurso del Descubrimiento de la Población y Pacificación de este Nuevo Reino de León, Temperamento y Calidad de la Tierra"; en este relato se menciona el uso del peyote en las reuniones festivas o mitotes, relatando lo siguiente: beben el peyote molido y su desecho en agua, esta bebida embriaga;



de manera que les hace perder el sentido, y se quedan, del movimiento y del vino en el suelo como muertos.

Los españoles contribuyeron también a la herbolaria local trayendo plantas medicinales de origen europeo como fue el caso de la manzanilla (*Matricaria recutita*), la ruda (*Ruta chalepensis*), y el romero (*Rosmarinus officinalis*) entre otras.

Hace más de 100 años que el insigne Dr. José Eleuterio González (Gonzalitos), citaba en su cátedra de Farmacia más de una docena de plantas medicinales originarias de Nuevo León. Entre ellas figuran la hierba de las almorranas (*Teucrium cubense*), el gordolobo (*Gnaphalium obtusifolium*), el cenizo (*Leucophyllum frutescens*), el estafiate (*Artemisia mexicana*) y el toloache (*Datura* spp). [13].

La importancia de las plantas medicinales en el proceso de obtención de nuevos medicamentos, es un hecho aceptado por la ciencia médica hace más de ciento cincuenta años. Un número importante de los fármacos utilizados en la medicina contemporánea son obtenidos de plantas o de subproductos en el aislamiento, purificación, determinación de estructuras, identificación, síntesis y correlación entre la acción fisiológica y estructura de los principios activos contenidos en las plantas (metabolitos secundarios) sometidos a diversos niveles de transformación química [14].

### **3. *Phoradendron tomentosum* (*P. tomentosum*)**

#### **4. Características Botánicas:**

La *P. tomentosum* es una planta parásita, frecuentemente de *Prosopis* sp. (mezquite) que se encuentra distribuida en zonas de matorral xerófito, se asocia con acacia (huizache) y yuca (izote), así como a variadas especies de arbustos, es una planta no bifurcada, de ramas rígidas, cortas en catáfilos y dioicas. Entrenudos cortos densamente aterciopelados de 1.5 a 4 cm de largo, con hojas de 1.5-3.5 cm, orbiculares con peciolo corto, inflorescencia estaminada con 2 a 6 segmentos al igual que la inflorescencia pistilada, el fruto es una baya blanca (fotografía 1).

Se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Baja California, Coahuila, Chihuahua, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas [15-16].

### 5. Clasificación Taxonómica:

Reino.....Vegetal  
 Subreino.....Spermatophyta  
 Clase.....Angiospermae  
 Subclase.....Dicotyledoneae  
 Familia.....Loranthaceae  
 Subfamilia.....Loranthoidae  
 Género.....*Phoradendron*  
 Especie.....*tomentosum* (DC) Engelm.

### 6. Hábitat o Localización:

Es una planta parásita que se desarrolla en árboles caducos principalmente en los frutales y álamo de Europa, en México la *P. tomentosum* (DC) Engelm. Pertenece a la familia loranthaceae, recibe los nombres comunes de injerto de mezquite (Coahuila, Guanajuato, Nuevo león y Zacatecas), liga (Estado de México), Silmo (Sinaloa) y visco cuercino, hierba de la cruz, lignum vía (Estado de México) (fotografía 2) [15-17].

### 7. Usos en Medicina Tradicional Herbolaria:

El muérdago es conocido como la planta bajo cuya sombra la gente se besa en Navidad, es un arbusto parásito que crece en los árboles, enraizándose dentro de su corteza. Hipócrates prescribió su uso para trastornos o enfermedades del bazo. Un libro médico francés en 1682 recomendó al muérdago para el mal de las caídas (epilepsia)[17].

El texto ecléctico del siglo XIX, Kings American Dispensatory, recomienda tanto el muérdago europeo como el americano para enfermedades de epilepsia, fiebre tifoidea, hidropesía, insuficiencia cardíaca congestiva y padecimientos histéricos (ginecológicos), cólicos menstruales, inducción de la menstruación y alivio de la hemorragia puerperal.

El Kings también advirtió que en grandes cantidades, el muérdago posee propiedades tóxicas. Se han reportado vómitos, catarsis, espasmos musculares, coma, convulsiones y muerte por comer las hojas y los frutos. [17].

Hace muchos siglos los druidas establecieron que el muérdago (*Viscum album*) podía ser empleado para curar el cáncer: de un extracto de muérdago se han aislado once fracciones proteínicas con marcada actividad antitumoral [13].

Pese a la creencia tradicional de que los muérdagos europeo y americano tienen acciones opuestas, estudios científicos han reportado que tienen efectos químicos activos

útiles para regular la presión sanguínea alta así como un estimulante del sistema inmunológico, además en el tratamiento para el cáncer [17]

En 1993, David Obatomí y Cols. de la facultad de Medicina en Ciencias de la Universidad de Nigeria, reportaron las propiedades antidiabéticas de extractos acuosos preparados con hojas de esta planta parásita (*P. tomentosum*) a partir de diferentes árboles hospederos para su comparación: a) limón (*Citrus lemon*), b) guayaba (*Psidium guajava*) y, sangre de drago (*Jatropha curcas*) [3].

Las infusiones o extractos preparados se administraron en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (EZT) y en ratas no diabéticas por un período de 28 días. Las infusiones preparadas con las plantas parásitas del árbol de limón y de la guayaba disminuyeron los niveles de glucosa en el suero de los animales diabéticos ( $p < 0.001$ ) y de los no diabéticos ( $p < 0.05$ ) en comparación con la infusión preparada con la planta parásita del árbol de sangre de drago que no tuvo ningún efecto hipoglicémico en su modelo de estudio [3].

González Ferrara M. M., en 1998, describió algunas propiedades de la *P. tomentosum*, y reportó el uso de las hojas como tratamiento para las várices, el mal de orín, dismenorrea y como antidiabético [18].

## 8. Estudios Fitoquímicos:

La familia Loranthaceae está constituida por plantas semiparásitas distribuidas principalmente en Europa y América. Se divide en dos subfamilias (Viscoideae y Loranthoidae), que abarcan 40 géneros en donde se clasifican alrededor de 1350 especies.

El género más abundante de la familia Viscoideae es el *Phoradendron* con 300 especies. Los estudios químicos realizados en él no son muy extensos, reportándose sin embargo la presencia de aminoácidos (tiramina), proteínas tóxicas (foratoxina), y alcaloides (rubrina C). En el Estado de Coahuila se utilizan las hojas secas de *Phoradendron juniperum* para curar en los caballos las lesiones producidas por el uso de la silla de montar, fuera de este caso no hay ningún otro reporte del uso de este género dentro de la medicina popular.

De los otros géneros de la subfamilia el más estudiado es el *Viscum* y dentro de él, la especie *Viscum album* conocido con el nombre vulgar de mistletoe. En esta especie se han encontrado triterpenos ( $\beta$ -amirina, lupeol, inositol y ácido oleanólico, flavonoides, aminoácidos y una proteína denominada viscotoxina. Los estudios realizados en varias especies de la subfamilia Loranthoidae señalan la presencia de quercitina (un flavonoide) y del alcohol melissílico. Únicamente se han aislado triterpenos (lupeol y loranthol) de *Loranthus grewinkii* [20].

Respecto a los estudios fitoquímicos realizados con *P. tomentosum*, Mellstrand y Samuelson en 1973 y 1974 reportaron el aislamiento de una proteína a partir de una planta completa colectada en Suecia: la foratoxina y algunos estudios sobre sus propiedades (4-6). Posteriormente, Thunberg en 1983 aisló de la parte aérea de la *P. tomentosum* colectada en el mismo país una nueva proteína: la foratoxina B [7].

En Texas, otros investigadores encontraron que el fruto de el género europeo *Viscum album* contiene sustancias mucilaginosas llamadas viscina y viscosina, aceite esencial, poca cantidad de taninos y entre las sales minerales predominan los sulfatos de calcio, potasio y oxalato de calcio [19].

### 9. Características Fitoquímicas:

A) Saponinas. El término saponinas se aplica a dos grupos de glucósidos vegetales que forman soluciones acuosas coloidales, productoras de espuma jabonosa cuando se sacuden o agitan. Las saponinas tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos de la sangre [21].

De la hidrólisis de las saponinas se obtiene un carbohidrato y una aglicona, llamada sapogenina de tipo triterpeno como la  $\beta$ -amirina y la tipo lupeol [22].

Dentro de los miembros más estudiados del grupo de las saponinas esteroidales se encuentran los contenidos en las semillas de la digital acompañando a los glucósidos activos sobre el corazón, es decir, las saponinas denominadas digitonina, gintonina y trigonina [21].

Las saponinas son sustancias muy polares, y se pueden extraer ya sea en caliente o también en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular [22].

B) Sesquiterpenlactonas. Estos compuestos químicos poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metil-butadieno 1,3) cabeza, cola y algunos productos de trasposición [22].

Las sesquiterpenlactonas se han encontrado principalmente en extractos de flores o en las partes aéreas de los compuestos además, se ha observado que poseen acción citotóxica, analgésica y amebicida. Son sustancias amargas, polares, insolubles en agua, éter de petróleo, solubles en éter etílico y en cloroformo [22].

C) Esteroles. Estos compuestos son derivados del hidrocarburo tetracíclico, ciclopentanoperhidrofenantreno o sea que poseen un núcleo cíclico semejante al fenantreno (anillos A, B y C) y a este se unen un anillo ciclopentano (anillo D) [23]. Los esteroles difieren en el número y en la posición de sus dobles enlaces, en el tipo, localización y número de grupos funcionales sustituyentes y en la configuración (alfa y beta), de los

enlaces entre los grupos sustituyentes y el núcleo; y en la configuración que adopta los anillos entre sí, ya que el hidrocarburo originario posee seis centros de asimetría.

Los principales puntos de sustitución son el C3 del anillo A, el C11 y el C17 del anillo D. Los anillos son generalmente alifáticos, los lineales como los verticales unidos a la posición [18 y 24] representan grupos metilo angulares [22].

En los vegetales se pueden encontrar libres como ésteres o como glicósidos, se han encontrado en todos los órganos de las plantas principalmente en las semillas [22]. La mayoría de los esteroides se han aislado de fuentes naturales y como tal se encuentran en la conformación con forma de silla que es la más estable [22-28].

Estos compuestos tienen una gran aplicación dentro de la actividad biológica: las hormonas esteroidales se localizan en la corteza suprarrenal las cuales se derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno. Cada una de las hormonas esteroidales se producen en una zona específica de la corteza suprarrenal, aquellas son: glucocorticoides de la zona fascicular, mineralocorticoides de la zona glomerular y corticosteroides de la zona fascicular [23].

Además las hormonas adrenocorticales se emplean en el tratamiento de enfermedades neoplásicas; estimulan y controlan la proliferación y el funcionamiento de ciertos tejidos, incluyendo las glándulas mamarias y prostáticas [23].



## HIPÓTESIS

Puesto que en Medicina Tradicional se utiliza un extracto acuoso de la *Phoradendron tomentosum* (DC) Engelm para tratar la DM, consideremos que el contenido fitoquímico de la misma debe de poseer uno o varios principios activos que tengan actividad hipoglucemiante sobre nuestros modelos de animales diabéticos establecidos inducidos experimentalmente para este estudio que además sean factibles de identificarse.

## JUSTIFICACION

En la actualidad, la Diabetes mellitus se considera uno de los principales problemas de salud pública de México, debido a su elevada prevalencia, así como a la grave y variada morbilidad que acompaña a esta enfermedad [25].

Actualmente la DM es la tercera causa de muerte en México y, aunque no se conoce el número exacto de personas afectadas por esta enfermedad se calcula que el 32% de la población la padece [26].

## 1. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinación de la actividad hipoglucemiante de *Phoradendron tomentosum* (DC)Engelm, en un modelo de animales diabéticos (ratas Sprague-Dawley) inducido experimentalmente para este estudio de investigación

## 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Identificar, coleccionar y preparar el extracto o infusión acuosa a partir de la planta en estudio (*Phoradendron tomentosum* (DC) Engelm).
- 2.- Obtener un modelo de diabetes experimental empleando para ello ratas de la raza *Sprague-Dawley*.
- 3.- Determinar la actividad hipoglucemiante del extracto acuoso obtenido a partir de la planta *P. tomentosum* sobre el modelo de diabetes en animales de experimentación (ratas Sprague-Dawley) implementado específicamente para este estudio.
- 4.- Realizar los estudios fitoquímicos y cromatográficos de la *P. tomentosum* para de identificar el o sus principios activos.

## MATERIAL Y METODO

### 1. Inducción Experimental de la Diabetes Mellitus.

**Animales Utilizados:** Se emplearon ratas jóvenes de la raza Sprague- Dawley, del sexo masculino con un peso promedio de 334 g los cuales fueron proporcionados para este estudio por el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), del IMSS.

Estos animales se manejaron en dicho Bioterio dentro de jaulas de acero inoxidable. Estas jaulas se encuentran instaladas en un cuarto con iluminación en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y una temperatura de 23° C. La dieta de los animales, consistió en alimento para roedores de laboratorio No. 5001 marca PMI Food Inc. con una presentación comercial de croquetas.

El agua que bebieron se tomó directamente de la llave y con ella se llenaron biberones de vidrio de una capacidad de 500 ml. Estos biberones tenían un tapón de hule horadado en el cual a través de un tubo de vidrio se permitió libremente o *ad libitum* el paso del agua requerida por los animales. También el alimento fue proporcionado *ad libitum*

### 2.- Determinación de la Dosis Optima Diabetogénica de EZT:

Un grupo de 25 ratas se distribuyeron de manera aleatoria en 5 jaulas en grupos de cinco animales cada uno y, se marcaron mediante una perforación en la oreja izquierda según el código numérico empleado para este fin en los Bioterios para su correcta identificación (figura y fotografía 1).

Posteriormente se pesaron utilizando una balanza granataria con canastilla especial para esta finalidad con capacidad de 2610 g marca Triple Beam No. 41068 lo cual permitió llevar el control de su peso durante el tiempo de estudio.

Para la inducción de la diabetes cada grupo de animales recibió diferentes dosis de estreptozotocina (EZT) vía intraperitoneal (i.p): 50, 30, 20, 10 mg/kg de peso disuelta en agua bidestilada (bd). El grupo testigo recibió el mismo volumen (0.5 ml) de agua bd.

Se preparó una solución madre de 50 mg/kg de EZT (Sigma Chemical) disuelta en agua bd. A partir de ella se hicieron, diluciones con agua bd para obtener las concentraciones de 30, 20 y 10 mg/kg de EZT las cuales, posteriormente se esterilizaron haciéndolas pasar a través de membranas Gelman estériles con poro de 0.45  $\mu\text{m}$  hacia tubos de vidrio pyrex estériles con tapón de rosca de 16 x 125 mm los cuales se forraron con papel aluminio para protegerlos de la luz y evitar su descomposición. Inmediatamente después de la preparación de las diferentes concentraciones de la EZT estas, fueron administradas vía i.p. a cada uno de los animales de su grupo correspondiente en un volumen de 0.5 ml utilizando para ello jeringas estériles de plástico para insulina con aguja de 27 x 13 mm marca Becton-Dickinson.

El pH de las soluciones de EZT se midió antes y después de su utilización para observar si cambiaba en el tiempo transcurrido entre su preparación y uso.

### **3.- Medición de los Niveles de Glucosa Sanguínea y Urinaria.**

A) Determinación de los niveles de glucosa sanguínea. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron utilizando el micrométodo de glucosa-oxidasa. Para esto se empleó un equipo glucómetro marca Sure-Step de Lifescan asegurándonos siempre que el número de programa utilizado corresponda con el de las tirillas empleadas para la colocación y la lectura de la muestra.

La determinación de la glucosa sanguínea se realizó individualmente en cada uno de los animales de cada grupo después de haber permanecido de 4-5 hr en ayunas (sin alimento). Se tomó el animal y se introdujo manualmente en una jaula de policarbonato diseñada para inmovilizarlo cuidando de dejar afuera la cola del mismo, la cual, se limpió con una torunda impregnada de alcohol etílico y con ayuda de una lanceta metálica estéril se hizo una punción en la vena caudal de la cola del animal para exponer una gota de su sangre sobre una tirilla reactiva especial para la determinación, la cual inmediatamente se corrió sobre el desplazador de pruebas del equipo glucómetro (fotografía 4).

B) Determinación de los Niveles de Glucosa Urinaria. Para la determinación de los niveles de glucosa urinaria se utilizó el método de tirillas reactivas especiales para uroanálisis *in vitro* (URS-10, Teco Diagnóstico). Este es un método semi-cuantitativo y cualitativo para la detección de: glucosa, bilirrubina, cetonas, gravedad específica, sangre, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos y leucocitos en orina. Estos resultados nos pueden proveer de información respecto al metabolismo de los carbohidratos, de la función renal, del funcionamiento del hígado y del estado de equilibrio ácido-base.

Para coleccionar la muestra urinaria de los animales en experimentación se utilizaron jaulas metabólicas individuales equipadas con un colector especial para orina y otro para heces fecales que evita que estas se mezclen y contaminen. Las ratas se acomodaron individualmente en estas jaulas previa identificación e inmediatamente se sometieron a un ayuno de 6 a 7 horas. Durante este tiempo en los colectores urinarios se juntó la cantidad suficiente de orina para llevar a efecto el estudio de uroanálisis el cual consistió en: humedecer todas las áreas de la tirilla reactiva introduciéndola en el colector conteniendo la muestra de orina, inmediatamente después, esta se retiró para evitar que las áreas reactivas se mezclen dando falsos resultados, y se colocó sobre un papel absorbente para retirar el exceso de orina y por último, se comparó cada área reactiva de la tirilla con su color correspondiente en la carta de colores impresa en la etiqueta de la botella leyéndolas en los tiempos especificados y los resultados se obtuvieron por comparación directa con dicha carta de colores.

#### 4. Extracción de *Phoradendron tomentosum*

A) Extracto Acuoso: Este extracto o infusión acuoso se preparó para su estudio posterior como hipoglucemiante oral en nuestro modelo de animales (ratas Sprague-Dawley) diabéticos de experimentación. La planta se identificó dentro de la ciudad de Monterrey, Nuevo León como parasito del árbol de mezquite observándose que los árboles antiguos eran más factibles de estar infectados con este muérdago. Se colectó de las ramas altas empleando para ello, una podadora de tijera y sierra metálica con extensión de un alcance de 2 m.

Posteriormente el material de la planta en estudio se llevó al laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su correcta identificación y marcaje. Un ejemplar se incluyó dentro de una prensa botánica para donarlo al Herbario de la Facultad y el resto de la planta se llevó al laboratorio de Biología Experimental del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del IMSS para su preparación y uso posterior.

El material de la planta se secó a 37 ° C, dentro de una estufa marca MAPSA durante una semana (fotografía 5). Posteriormente se molió utilizando un molino eléctrico (marca El Rey de 1 HP de potencia, fotografía 6) y el material seco y molido se guardó en frascos oscuros los cuales se rellenaron con algodón para disminuir el oxígeno y así evitar que se oxiden y evaporen los metabolitos activos.

Para preparar el extracto o infusión acuosa de la planta se pesaron 50 g de su material seco y molido (fotografía 7), se colocaron en un matraz erlenmeyer con capacidad de 4 L, se les añadió un litro de agua y, se dejó reposar toda una noche. Al día siguiente se llevó a ebullición por 10 min. (fotografía 8), ya pasado este tiempo se dejó enfriar y el extracto acuoso obtenido se guardó en refrigeración (4 °C) en frascos de plástico con una capacidad de 1 galon para su uso posterior para su estudio como hipoglucemiante oral en nuestro modelo de animales diabéticos de experimentación (fotografías 9 y 10).

B) Extracto Metanólico. Este extracto fue empleado en la realización de las pruebas fitoquímicas realizadas a nuestra planta en estudio para dilucidar su contenido fitoquímico.

Se pesaron 600 g del material seco y molido de *P. tomentosum* los cuales posteriormente, se distribuyeron dentro de sobrecitos de papel filtro con un contenido de 10 g cada sobre.

Posteriormente el número de sobres que contenían los 600 g del material de la planta ya empaquetado se introdujo con cuidado en el interior de un extractor tipo soxhlet, el cual se montó con el resto del equipo de extracción (baño de agua, destilador, matraz



bola, etc) y, se le añadió aproximadamente 600 ml de metanol (MeOH) para su extracción con este solvente. Se prendió el baño de agua para calentar el metanol e iniciar con la extracción la cual se llevó a cabo de manera continua durante 7 días hasta que se completó la extracción del material de la planta con este solvente.

El extracto metanólico obtenido según el procedimiento descrito en el párrafo anterior se llevó posteriormente a concentrar a presión reducida empleando para ello un equipo rotaevaporador (marca Buchi Laboratoriums-Technik, AG-CH 9230, Flawil/Schweiz) con vacío obteniéndose así nuestro extracto metanólico libre de solvente.

El extracto metanólico obtenido se sometió a pruebas fitoquímicas de reacciones coloridas para tratar de determinar mediante la coloración el o los compuestos presentes

#### **5. Efecto Hipoglucemiante de *Phoradendron tomentosum*.**

Después de determinar que 35 mg/kg de EZT es la concentración óptima para producir una diabetes tipo moderada (170-300 mg de glucosa/dl) en los animales de experimentación se procedió a la prueba de la planta en estudio (*P. tomentosum*) para tratar de controlar la DM de estos animales.

Planteamiento del experimento. Se trabajó con un grupo de 20 animales de los cuales 10 se inyectaron i.p. con 35 mg/kg de EZT para inducirles la diabetes. Aproximadamente un mes después teníamos dos grupos: Animales no-diabéticos (n=10) y Animales diabéticos (n=10). Posteriormente cada uno de estos grupos se subdividieron de manera aleatoria en dos subgrupos de 5 animales cada uno dando por resultado los siguientes 4 grupos:

4) Grupo No-Diabético (n=5) los cuales recibieron de beber *ad libitum* agua de la llave. Grupo

5) No-Diabético (n=5) los cuales recibieron de beber *ad libitum* el extracto o infusión acuosa preparada con la *P. tomentosum*.

6) Grupo Diabético (n=5) los cuales recibieron de beber *ad libitum* agua de la Llave.

7) Grupo Diabético (n=5) los cuales recibieron de beber *ad libitum* el extracto o infusión acuosa preparada con la *P. tomentosum*.

A estos cuatro grupos de animales de experimentación se les realizó un seguimiento del peso, niveles de glucosa urinaria y sanguínea, estado físico y comportamiento conductual antes y, durante el tiempo del estudio.

## **6. Estudio Comparativo de la Actividad Hipoglucemiante de *Phoradendron tomentosum* con Drogas Hipoglucemiantes reconocidas: Glibenclamida y Fenformina**

Después de obtener los resultados con el tratamiento de la infusión o extracto acuoso obtenido a partir de la *P. tomentosum* se procedió a hacer otro estudio donde se pudiera comparar el efecto del extracto acuoso de nuestra planta de interés con el de drogas hipoglucemiantes empleadas por los pacientes diabéticos para el control de su enfermedad.

Se manejó un grupo de 20 animales (10 diabéticos y 10 no-diabéticos) cada uno de los cuales recibió a través de una sonda endogástrica de acero inoxidable calibre 16 una dosis única de:

Grupo 1: Animales no-diabéticos (n=2) los cuales recibieron 2.5 ml de agua bd. como control.

Grupo 2: Animales no-diabéticos (n=4) los cuales recibieron 2.5 ml del extracto acuoso de la *Phoradendron tomentosum* concentrado (2 g/kg)

Grupo 3: Animales no-diabéticos (n=4) los cuales recibieron 2.5 ml de la glibenclamida (3 mg/kg).

Grupo 4: Animales-diabéticos (n=2) los cuales recibieron 2.5 ml de agua bd. como control.

Grupo 5: Animales-diabéticos (n=4) los cuales recibieron 2.5 ml del extracto acuoso de la *Phoradendron tomentosum* concentrado (2 g/kg)

Grupo 6: Animales-diabéticos (n=4) los cuales recibieron 2.5 ml de fenformina (50 mg/kg).

## **8. Hipoglucemiantes Orales Empleados por la Población Diabética.**

A) Glibenclamida (Spectrum Quality Products, Inc.) Hipoglucemiante oral que pertenece al grupo de las sulfonilureas. Se emplea en el manejo de la DM estable sin tendencia a la cetosis, tipo II (no-insulinodependiente) Administrada por vía bucal su absorción es casi total a nivel intestinal, a nivel pancreático en presencia de actividad funcional del tejido insulínico posee efecto betacito que favorece la síntesis y la liberación

de insulina endógena lo que favorece la reducción de la hiperglicemia se utiliza para disminuir los niveles de glucosa en suero de los pacientes diabéticos produciendo una eficaz secreción de insulina.

El tratamiento se inicia con 2.5 mg y si los resultados no son satisfactorios se incrementa la dosificación de 2.5 mg en 2.5 mg hasta 10 mg como dosis única diaria. Su administración oral es rápida y total y se alcanza el nivel máximo en suero en 1-2 h. La vida media sérica es de 1.3-2.6 h.

B) Fenformin. Esta droga es un hipoglucemiante oral que pertenece al grupo de las biguanidas, cuya acción, al parecer, es mixta ya que puede actuar en ausencia de insulina y de páncreas funcionando, no es insulina ni estimula las células betapancreáticas para la secreción de insulina. Se emplea principalmente en la DM estable del adulto.

Administrada en cápsulas de liberación prolongada (debeone d.t.) el medicamento se libera en un periodo de 8 h y produce una ligera y sostenida disminución de azúcar en sangre durante 12 a 14 h. Es efectivo en un alto porcentaje de pacientes con diabetes estable del adulto, con una dosis de 50 hasta 150 mg por día. Administrada por vía oral se absorbe bien por mucosa gastrointestinal. En pacientes diabéticos con alimento en el estómago, el efecto hipoglucémico se inicia de 1-2 h después de su administración, su efecto máximo lo alcanza aproximadamente de 4-6 h y persiste de 6-14 h. La vida media de eliminación total es de aproximadamente de 24 h, por lo que puede ser empleada en una sola toma al día.

## 9. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de nuestro experimento se procesaron utilizando el método de "t" de student para muestras pareadas y no pareadas y para corroborar los resultados, estos fueron sometidos a un mixed model de ANOVA, incluido en el paquete estadístico minitab versión 10.0

## 9. Pruebas Fitoquímicas de Reacciones Coloridas para la Detección de Metabolitos Activos en *Phoradendron tomentosum* [27]:

### A) Prueba para Esteroles (Reacción de Liebermann-Burchard):

Se preparó el reactivo, mezclando 1 ml de anhídrido acético, 1 ml de cloroformo y una gota de ácido sulfúrico concentrado, luego en un pozo de una placa de porcelana se depositó una pequeña muestra de la planta seca y molida, se disolvió en cloroformo y se le añadió unas cuantas gotas del reactivo anteriormente preparado, se observaron los cambios de coloración a los 1, 2, 5, 20 y 60 minutos. La prueba es positiva cuando hay variaciones de color, para los esteroides generalmente se observan colores verde, azul, rojo o naranja. El fundamento de la reacción es el siguiente: el anhídrido acético puede reaccionar con los hidroxilos (por ejemplo los del carbono de la posición número 3 de los esteroides) para producir el éster correspondiente. Si el esteroide original tiene una insaturación en la posición 5 ocurrirá una epimerización y una deshidratación con la formación de su color característico.

### B) Prueba para Glucósidos Cianogénicos:

En un tubo de ensayo se colocan 2-3 g de planta seca y molida, se agrega 1 ml de cloroformo, en la parte superior del tubo de ensayo se coloca una tira de papel filtro previamente empapado con una solución de picrato de sodio (1 g de carbonato de sodio y 100 mg de ácido picrico más 10 ml de agua) el tubo con la muestra se coloca a temperatura de 30-35 ° C por tres horas aproximadamente. Si el papel vira a color rojo la prueba se considera positiva para glucósidos cianogénicos.

### C) Prueba para Fenoles:

Se deposita una muestra del extracto metanólico de la *P. tomentosum* en uno de los pozos de una placa de porcelana, se le añade alcohol etílico hasta su completa disolución y posteriormente se agregan unas gotas de una solución acuosa de cloruro férrico al 5%. La prueba se considera positiva si inmediatamente se produce una coloración de color verde, azul o violeta.

Prueba del reactivo de Tollen's. Esta es otra prueba para detectar fenoles, en ella se utiliza el reactivo de Tollen's el cual se obtiene mezclando en un tubo de ensayo unos gramos de la muestra de la planta en estudio con nitrato de plata, hidróxido de sodio y amoníaco. La aparición de un espejo de plata en el fondo y las paredes del tubo indica un resultado positivo para fenoles.

### D) Detección de Flavonoides:

Prueba de Shinoda: En un pozo de una placa de porcelana se deposita una muestra del extracto metanólico de la *P. tomentosum*, se le agrega un trocito de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La prueba se considera positiva para flavonas,

isoflavonas y para flavonoles si inmediatamente se produce una coloración naranja-rojo-azulosa, rojo-violeta o café-anaranjado. Las antocianinas dan una coloración azul

E) Detección de Leucoantocianidinas:

En un pozo de una placa de porcelana se pone 1 g del extracto metanólico de la planta en estudio y se deja evaporar a sequedad, el residuo se redisuelve con una solución formada por ácido clorhídrico 2N en propanol 1. La aparición lenta de una coloración roja o violeta se considera como prueba positiva

F) Detección de Alcaloides.

Prueba de Dragendorff: Este reactivo lo forman 2 soluciones: la primera la preparamos mezclando 8 g de nitrato de bismuto con 20 ml de ácido nítrico (al 30%) y la segunda contiene 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se mezclan las soluciones una y dos y se dejan reposar 24 hrs. Esta mezcla se filtra y afora a 100 ml con agua bd. Se agregan unas cuantas gotas de este reactivo a la muestra de la planta la cual se encuentra depositada en un tubo de ensayo, la prueba se considera positiva si se forma un precipitado color naranja-marrón.

Prueba de Mayer: El reactivo del mismo nombre está formado por 2 soluciones, una de ellas contiene 1.36 g de cloruro de mercurio III en 60 ml. de agua y la otra contiene 5 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua. Se juntan las dos soluciones y se afora a 100 ml con agua bd. En un tubo de ensayo se pone una muestra del extracto metanólico de la planta en estudio y se le agregan unas gotas del reactivo anteriormente preparado, si aparece un precipitado de color marrón es indicador de un resultado positivo.

Prueba de Wagner: Para preparar el reactivo de Wagner se disuelven 1.27 g de yodo resublimado y 2 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua. Para efectuar la prueba se agrega 1 ml del reactivo anteriormente preparado en un pozo de porcelana en la cual previamente se añadió una muestra de extracto metanólico de la planta. La prueba se considera positiva si se forma un precipitado floculento de color marrón.

Prueba de Erdmann: Para preparar el reactivo de Erdmann se mezclan 10 gotas de ácido nítrico concentrado en 100 ml de agua y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se deposita una muestra del extracto metanólico de la P. tomentosum en un pozo de una placa de porcelana y se agregan 10 gotas de reactivo de Erdmann. Se forma un precipitado color negro en caso de que la prueba sea positiva.

G) Detección de Sesquiterpenlactonas:

Prueba de Legal: En un tubo de ensayo se deposita una muestra de extracto metanólico de la planta, se le agregan 3 gotas de piridina, una gota de nitroprusiato de sodio al 5% y

cuatro gotas de hidróxido de potasio 2N, las lactonas alfa y beta insaturadas dan positiva esta prueba con la aparición de un color rosa. Pueden darla también las gama lactonas, así como las metilcetonas.

**Prueba de Baljet:** El reactivo de Baljet consta de dos soluciones las cuales se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse; la solución A contiene 1 g de ácido picrico en 100 ml de etanol. La solución B contiene 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. En un tubo de ensayo se pone una muestra del extracto metanólico de la planta y unas gotas del reactivo de Baljet. Observamos una reacción positiva si aparece una coloración anaranjada a roja oscura.

#### H) Detección de Saponinas:

**Prueba de Lieberman Burchard:** En un tubo de ensayo se mezclan 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfrían a 0 °C y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Se agregan unas gotas del reactivo a la muestra metanólica del extracto de la planta que previamente fue depositada en pozo de una porcelana. La prueba es positiva cuando hay formación de colores azul, verde, roja o anaranjado.

#### I) Detección de Insaturaciones [14].

**Prueba de Bromo:** En un tubo de ensayo se disuelven 0.2 mg del extracto metanólico de la planta con 1 ml de tetracloruro de carbono y se agrega gota a gota una solución de bromo en tetracloruro de carbono al 2%. La prueba se considera positiva si en el lapso de 1 minuto la solución de bromo se decolora.

**Prueba de permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>):** En un tubo de ensayo se disuelve 0.2 mg del extracto metanólico de la planta en 1 ml de agua, acetona o metanol y se agrega gota a gota la solución de KMnO<sub>4</sub> previamente preparada. La prueba es positiva si hay decoloración en el reactivo lo que indica la presencia de dobles enlaces

### 10. Métodos Cromatográficos.

**Cromatografía en Capa Delgada (ccd):** Este método cromatográfico es comúnmente utilizado en la separación y purificación de los principios activos de las muestras de plantas (extractos, fracciones etc.) en los cuales se desee conocer su contenido. En este método se emplean cámaras de vidrio, con una cubierta móvil y en cuyo fondo o parte inferior se recubren con papel filtro con el fin de mantener las instauraciones de los vapores del eluyente utilizado. Las dimensiones de las cámaras empleadas son variables en función del número de muestras que se deseen correr.

**Preparación de Placas para Cromatografía en Capa Delgada (ccd):** 10 g de silica gel (G, Powder, J.T. Baker) se disolvieron con 30 ml de agua bd mezclándose con cuidado para que no se formen grumos o burbujas y, esta mezcla la dejamos reposar durante 2 minutos.

alcohol para retirar trazas de polvo o grasa. En estas placas limpias se vacía una cantidad considerable de la silica preparada en el párrafo anterior, deslizándose sobre la misma cuidando que quede una capa de silica uniforme, se dejan reposar 30 minutos y posteriormente se activaron o secaron dentro de una incubadora marca MAPSA.

Antes de correr nuestras muestras en las placas de ccd se hizo una prueba de solubilidad de la planta en diferentes solventes: acetona, hexano, cloroformo, metanol, etanol, agua bidestilada y dimetilsulfóxido (DMSO). En un vaso de precipitado de 10 ml, se puso por separado 8 ml de cada uno de los solventes con una pequeña muestra del extracto metanólico obtenido de la planta en estudio, se dejó reposar aproximadamente 30 min mezclando la muestra con el solvente correspondiente durante intervalos de tiempo cortos.

Después de determinar que el cloroformo, metanol y el DMSO son buenos disolventes para nuestro extracto metanólico se procedió, a correr las ccd de este extracto disuelto en metanol. En la parte inferior (aproximadamente 0.5 cm del límite inferior) de una placa preparada con silica de 5 x 10 cm se marcó a lápiz una línea horizontal. Sobre de esta línea se colocaron con capilares preparados para este fin tres muestras de nuestro extracto metanólico de la planta en estudio disueltas cada una de ellas por separado en 10 ml de metanol, cloroformo y DMSO. Este procedimiento se repitió varias veces depositando la muestra en el mismo punto donde se depositó por primera vez para obtener así una muestra saturada en nuestra placa y facilitar el deslizamiento. Posteriormente la placa se lleva a incluir dentro de la cuba de vidrio que ya contiene el sistema de eluentes correspondiente al o los compuesto(s) que por referencia pensamos que contiene nuestra muestra y que nos interesa separar y se tapa con su cubierta de vidrio. Se deja correr el tiempo necesario sin permitir que suba por completo (aprox. 0.5 cm del extremo superior), la retiramos de la cubeta de vidrio y se deja secar en una plancha con calor.

Se lleva a una cámara de luz ultravioleta para observar las manchas que se formaron, durante el corrimiento de nuestra muestra en el sistema de eluentes empleado. Cuando no se aprecia muy claro entonces, podemos introducir nuestra placa en una cámara que contiene cristales de yodo, para que a través de los vapores que estos desprenden nos ayuden a revelarla y podamos observar mejor las manchas que produjo la muestra.

Por último se midió la relación de frente ( $R_f$ ) en la placa y en base a este valor determinar el tipo de compuesto(s) que posee nuestra muestra.

La polaridad de los sistemas de los eluentes empleados está en relación directa con la composición de la muestra que se va a correr en la cromatografía en ccd.

Los sistemas de eluentes mas utilizados en ccd son los siguientes y se expresan en una relación (v:v) [27]:

A) Para separar Saponinas:

butanol-ácido acético-agua (4:1:1)

hexano-acetato de etilo (1:1)

cloroformo-etanol (95:5)

cloroformo-metanol (9:1)

n-hexano-acetato de etilo(1:1)

B) Esteroles:

Benceno-acetato de etilo (4:1)

Benceno-cloroformo (9:1)

C) Sesquiterpenlactonas:

Cloroformo-metanol (9:1)

Éter etílico-cloroformo (1:4)

Benceno-acetato de etilo (1:1)

Como agente cromogénico se emplearon vapores de yodo.



## REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS

### 11. Material Biológico:

- 1.- Ratas macho raza Sprague-Dawley

### 12. Material Químico:

- 1.- Estreptozotocina (EZT) , marca CALBIOCHEM, No. Catálogo No.B28580.
- 2.- Glyburide (Glibenclámda), marca SPECTRUM Quality Products inc. No. 08901
- 3.- Fenformin
- 4.- Silica gel 7 G, Powder, J.T. Baker
- 5.- Yodo
- 6.- Metanol (MeOH)
- 7.- Cloroformo
- 8.- Dimetilsulfóxido (DMSO)

### 13.- Equipo Empleado:

- 1.- Balanza Granataria, hasta 2610 g, Triple Beam Balance, OHAUS, Florham Park, N.J. 079032, U.S.A.
- 2.- Equipo de extracción tipo soxhlet, Buchi Laboratoriums-technik AG CH-9230 Flawil/SG
- 3.- Rotaevaporador-El, Buchi Laboratoriums-technik AG CH-9239 Flawil/Schweiz.
- 4.- Incubadora MAPSA, Comercial de abastos CDA, serie 9874-1.
- 5.- Molino eléctrico, Molino del Rey 1 HP.
- 6.- Glucómetro, One Touch, Sure Step, Lifescan, Johnson and Johnson Company.
- 7.- Podadora telescópica con sierra, Village Blacksmith, No. 7087.
- 8.- Computadora Oliveti M 7000 DT, 750 series.
- 9.- Matraz Erlenmayr 4 litros, Pyrex.
- 10.-Jaula de restricción, Flat bottom rodent restrainers, No A4578-5.
- 11.- Membranas  $\Phi$ .45  $\mu$ m, Gelman Science. 18883-66-4
- 12.- Jeringas para insulina 0.3 ml (0.3 cc) Becton Dickinson-Plastipak, No. 60173
- 13.- Lanceta desechable estéril, Disquim S.A.
- 14.- Vasos de precipitado Pyrex
- 15.- Tirillas reactivas para orina (Urine Reagent Strips for Urinalysis) No. A20057
- 16.- Jaula metabólica Nalgene 6500100

## RESULTADOS

### Inducción Experimental de Diabetes.

Para obtener nuestro modelo de animales diabéticos se administró a cada uno de los grupos de animales diferentes dosis (10-50 mg/kg) de estreptozotocina (EZT) por vía i.p., de las cuales la dosis de 35 mg/kg EZT resultó ser la dosis efectiva diabetogénica, pues a los 45 días de tratamiento, el grupo al cual se le había administrado esta dosis presentó una concentración de glucosa sanguínea de 256 mg/dl (Tabla 1).

Posteriormente nuestro lote de animales se dividió en 2 grupos: animales diabéticos y animales no-diabéticos los cuales, a su vez, se subdividieron en dos subgrupos cada uno. Uno de ellos recibió como tratamiento el extracto acuoso de la *P. tomentosum* como única fuente de líquidos y el otro recibió agua como control. Posteriormente se determinaron sus niveles de glucosa sanguínea al inicio del tratamiento o  $t_1=0$  y, 45 días después.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de este estudio donde se puede observar una disminución de la concentración de glucosa en los animales diabéticos que recibieron por 45 días el tratamiento con el extracto acuoso de *P. tomentosum*, contrario a lo observado en los animales diabéticos control (agua) los cuales, mostraron niveles altos de glucosa sin ningún cambio significativo en los dos tiempos muestreados. Los grupos formados con las ratas no-diabéticas manejadas con los dos tipos de tratamientos mostraron los niveles de glucosa sin ningún cambio importante en los diferentes tiempos. Aquí, se utilizó el método estadístico de "t" pareada.

Los grupos presentados en la Tabla 3 se distribuyeron de manera similar a los manejados en el estudio representado en la Tabla anterior. En la Tabla 3 observamos también una disminución de los niveles de glucosa de los animales diabéticos tratados con extracto acuoso de *P. tomentosum* al  $t_2=45$  días mientras que los animales diabéticos control (agua) no se observó esta disminución de glucosa sanguínea sino todo lo contrario los niveles de glucosa aumentaron a  $226.0 \pm 29.35$  mg/dl. Los animales no diabéticos que recibieron ya sea el extracto acuoso como los control mantuvieron niveles de glucosa bajos y estables.

La Tabla 4 muestra los niveles de glucosa sanguínea (mg/dl) en las ratas diabéticas que recibieron los tratamientos del extracto acuoso de *P. tomentosum* y el agua a diferentes tiempos. Los valores mostrados presentan una disminución de la concentración de glucosa sanguínea en los animales diabéticos que tomaron el extracto acuoso de la planta en estudio al  $t_2$  en comparación con los animales diabéticos que se trataron con agua.

Lo más relevante es que aquí para hacer el estudio estadístico de estos resultados se consideró el efecto de cada una de las variables por separado o individualmente como salud, tiempo, bebida, rata. Posteriormente se hace la estadística con la combinación de 2 variables (salud-tiempo, etc.) y al final empleando la interacción de 3 variables (salud-

bebida-rata, etc.). Todo esto para demostrar la influencia que ejercen nuestras variables al manejarlas ya individuales o combinadas.

Las Tablas 5 y 6 muestran los resultados obtenidos en un estudio preliminar donde se manejó el efecto de dos hipoglucemiantes orales empleados en la clínica para el control de la diabetes: la glibenclamida y el clorhidrato de fenformina a tiempos cortos (1 y 3 hr). La primera droga se administró al grupo de ratas no-diabéticas (Resultados Tabla 5) y el clorhidrato de fenformina al de las ratas diabéticas (Resultados Tabla 6). Es importante hacer notar que los animales que se manejaron en estos estudios fueron los mismos que los empleados en el estudio anterior.

Las ratas no-diabéticas a tiempos cortos (3 h) mostraron una disminución en sus niveles de glucosa después de la administración de la droga hipoglucemiante conocida como glibenclamida en comparación con los grupos control y el que recibió el extracto de la *P. tomentosum*.

En la Tabla No. 6 se puede observar que de los animales diabéticos que recibieron los tres diferentes tipos de tratamiento (clorhidrato de fenformina, extracto de *P. tomentosum* y agua) solo algunos respondieron disminuyendo sus niveles de glucosa sanguínea (marca con asterisco) pero si los manejamos como grupos no podemos concluir efecto de ninguno de los tres tratamientos esto, probablemente se debe a que los animales tenían ya un buen tiempo de padecer la diabetes y de que además se habían manejado en estudios previos.

La Tabla 7 muestra los resultados de las Pruebas Fitoquímicas realizadas al extracto metanólico de la *Phoradendron tomentosum*. En esta Tabla se pueden apreciar cuales fueron las pruebas que resultaron positivas para los diferentes metabolitos estudiados:

- 1) Lieberman-Burchard para esteroides
- 2) Baljet para sesquiterpenlactonas
- 3) Lieberman-Burchard para saponinas.

Por último en la Tabla 8 se muestran los valores de R<sub>f</sub> (factor de retardo) obtenidos de las manchas o metabolitos separados mediante cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de la *P. tomentosum*.

**Tabla 1.** Niveles de Glucosa Sanguínea (mg/dl) en Ratas (Sprague-Dawley) que recibieron i.p. diferentes Dosis de Estreptozotocina (EZT).

EZT (mg/kg)	Tiempo días (d)	Tiempo días (d)			
		0	15	30	45
0		84	71	85	77
10		71	64	72	66
20		66	69	76	69
30		75	90	106	256
50		80	165	500	500

Los valores son el promedio, n=5

**Tabla 2.** Efecto del Extracto Acuoso obtenido de *Phoradendron tomentosum* sobre los Niveles de Glucosa Sanguinea en Ratas Diabeticas y ratas no Diabeticas.

Grupo	Tratamiento	Glucosa Sanguinea (mg/dl)	
		t <sub>1</sub> = 0 (pre-tratamiento)	t <sub>2</sub> = 45 (45 días post-tratamiento)
<u>Diabético:</u>			
	1) Extracto Acuoso <i>P. tomentosum</i>	293.20±56.56	112.00±35.58
	2) Agua	214.40±88.82	226.00±29.35
<u>No Diabético:</u>			
	1) Extracto Acuoso <i>P. tomentosum</i>	80.60± 27.56	72.60±15.04
	2) Agua	57.00±25.34	65.80±9.26

Valor promedio ± D.E.; n=5 para cada uno de los grupos, prueba de "t" pareada.

Grupo Diabético con tratamiento de Extracto Acuoso de *Phoradendron tomentosum* en tiempo 1 y tiempo 2, P<0.001, "t"= 10.97

Grupo Diabetico con tratamiento de Agua en el t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>. P=0.793, "t"=0.284

Grupo No Diabético con tratamiento de extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* en tiempo 1 y 2, P=0.567, "t"=0.62

Grupo No Diabetico con tratamiento de agua en t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>, P= 0.577

**Tabla 3.** Efecto del Extracto Acuoso obtenido de *Phoradendron tomentosum* sobre los Niveles de Glucosa Sanguínea en Ratas Diabéticas y ratas no-Diabéticas.

Grupo	Tratamiento	Glucosa Sanguínea (mg/dl)	
		t <sub>1</sub> - 0 (pre-tratamiento)	t <sub>2</sub> = 45 (45 días post-tratamiento)
<u>Diabético:</u>			
	1) Extracto Acuoso <i>P. tomentosum</i>	293.20± 56.56	112.00±35.58
	2) Agua	214.40±88.82	226.00±29.35
<u>No Diabético:</u>			
	1) Extracto Acuoso <i>P. tomentosum</i>	80.60±27.56	57.00±25.34
	2) Agua	72.60±15.04	65.80±9.24

Valor promedio ± D.E., n=5 para cada uno de los grupos, prueba "t" no pareada.

Grupo Diabético con extracto acuoso de *P. tomentosum* vs. Grupo Diabético con agua al t<sub>1</sub>.  
P= 0.133, "t"=1.67

Grupo Diabético con extracto acuoso de *P. tomentosum* vs. Grupo Diabético con agua al t<sub>2</sub>.  
P<0.001, "t"= 5.53

Grupo No Diabético con extracto acuoso de *P. tomentosum* vs. Grupo No Diabético con agua al t<sub>1</sub> P= 0.196, "t"=1.41

Grupo No Diabético con extracto acuoso de *P. tomentosum* vs. Grupo No Diabético con agua al t<sub>2</sub> P= 0.414, "t"=0.86

**Tabla 4.** Niveles de Glucosa (mg/dl) de Ratas Diabéticas y no Diabéticas que recibieron los tratamientos de Extracto Acuoso de *Phoradendron tomentosum* y Agua.

Animales	t <sub>1</sub> = 0 días		t <sub>2</sub> = 45 días	
	Extracto Acuoso <i>P. tomentosum</i>	Agua	Extracto Acuoso <i>P. tomentosum</i>	Agua
<u>Diabéticos:</u>	330	193	103	220
	345	350	167	211
	301	150	98	256
	200	250	71	255
	290	129	121	188
<u>No diabéticos:</u>	112	156	71	74
	107	36	79	69
	74	56	77	72
	55	99	48	63

**Cuadro de Análisis de Varianza (ANOVA)**

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Salud	1	202778	202778	112.16	0.000
Tiempo	1	17808	17808	12.54	0.024
Bebida	1	14	14	0.00	0.950
Rata	4	11566	2891	1.96	0.165
Salud-tiempo	1	18148	18148	16.01	0.016
Salud-bebida	1	2690	2690	1.82	0.202
Salud-rata	4	7232	1808	1.23	0.351
Tiempo-bebida	1	27458	27458	18.61	0.001
Tiempo-rata	4	5679	1420	0.96	0.463
Bebida-rata	4	12994	3248	2.20	0.130
Salud-B-T	1	19360	19360	13.12	0.004
Salud-T-R	4	12994	3248	2.20	0.566
Error	12	17707	1476		
Total	39	347966			

**Tabla 5** Niveles de Glucosa Sanguínea (mg/dl ) en Ratas No-Diabéticas tratadas con Extracto Acuoso de *Phoradendron tomentosum* y con Glibenclamida

	<u>Tiempo (hr)</u> 0	1	3
<u>Tratamiento:</u>			
1) Extracto Acuoso de <i>Phoradendron tomentosum</i> :			
Rata No.			
1	74	62	75
2	64	62	44
3	62	53	58
4	87	89	58
	X = 72 ± 9.90	X = 66 ± 13.5	X = 59 ± 10.98
2) Glibenclamida:			
1	78	33	51
2	67	63	47
3	78	69	37
4	74	59	42
	X = 74 ± 4.95	X = 56 ± 13.74	X = 44* ± 5.26
3) Control (agua):			
1	72	72	57
2	71	57	67
	X = 71 ± 0.5	X = 64 ± 7.5	X = 62 ± 5



**Tabla 6.** Niveles de Glucosa Sanguínea (mg/dl ) en Ratas Diabeticas tratadas con Extracto Acuoso de *Phoradendron tomentosum* y con Clorhidrato de Fenformina.

Tiempo (hr)	0	1	3
<u>Tratamiento:</u>			
1) Extracto Acuoso de <i>P. tomentosum</i> :			
Rata No.			
1	93	156	122
2	127	148	70*
3	114	113	91*
4	45	77	63
	X = 95 ± 31.17	X = 123 ± 3.34	X = 86 ± 23
2) Clorhidrato de Fenformina:			
1	145	62	179
2	136	175	73*
3	140	99	82*
4	136	07	14* *
	X = 139 ± 3.69	X = 85 ± 61.04	X = 87 ± 60
3) Control (agua):			
1	101	130	66*
2	149	72	59*
	X = 125 ± 24	X = 101 ± 29	X = 62 ± 3.5

**Tabla 7.** Resultados de las Pruebas Cualitativas Fitoquímicas realizadas con *P. tomentosum* para Determinar su Composición.

COMPUESTO	PRUEBA	RESULTADOS
<u>Pruebas con Planta Seca y Molida:</u>		
Esteroles	Lieberman-Burchard	positivo
Glucosidos	G. Cianogeneticos	negativo
<u>Pruebas con Extracto Metanólico:</u>		
Taninos	Fenoles	negativo
	Tollens	negativo
Flavonoides	Shinoda	negativo
	Leucoantocianidinas	negativo
Alcaloides	Dragendorff	negativo
	Mayer	negativo
	Wagner	negativo
Sesquiterpenlactonas	Legal	negativo
	Baljet	positivo
Saponinas	Lieberman-Burchard	positivo
Insaturaciones	KMnO4	negativo
	Bromo	negativo

**Tabla 8.** Factor de retardo (Rf) determinados en las Manchas o Fracciones observadas de cada uno de los Metabolitos Secundarios de las Cromatografías practicadas al Extracto Metanólico obtenido de la Planta en Estudio (*P. tomentosum*).

Sistema:	Revelado		
	Visible	Ultravioleta	Vapor de Yodo
<u>1. Sesquiterpenlactonas:</u>			
a) Cloroformo-metanol 9:1	amarillo 0.67	naranja 0.84 naranja 0.69	café 0.84 café 0.69
b) Benceno-acetato etilo 1:1	amarillo 0.52	naranja 0.26 naranja 0.40 naranja 0.53	café 0.13 café 0.26 café 0.56
<u>2.- Esteroles:</u>			
a) Benceno-acetato de etilo 4:1	azul 0.52	rojo 0.23 azul 0.75	café 0.23 café 0.83
b) Benceno-cloroformo 4:1	azul 0.59	rojo 0.15 rojo 0.76 azul 0.84 amarillo 0.89	café 0.92 café 0.90 café 0.92
<u>3- Saponinas:</u>			
a) Cloroformo-metanol-agua 63:35:10	azul-verdoso 0.76	rojo 0.85 rojo 0.72 rojo 0.78	café 0.14 café 0.92 café 0.96
b) Hexano-acetato de etilo 1:1	azul-verdoso 0.69	café 0.76 naranja 0.78 naranja 0.62	café 0.83 café 0.90 café 0.13

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La inducción de diabetes en nuestros animales de laboratorio (ratas Sprague-Dawley) se confirmó después de 45 días de la administración i.p. de 35 mg/kg de EZT. Con este tratamiento las ratas presentaron síntomas como: poliuria, polifagia, polidipsia, pelo crespo, disminución de peso y niveles de glucosa alta (Tabla 1). Es interesante hacer notar que las ratas diabéticas bebieron en su totalidad los biberones que se les ofrecieron con el contenido del extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum*, mientras que las ratas del grupo control no consumieron totalmente el agua del biberón esto, confirma, el estado diabético de los animales.

El tratamiento de 45 días con el extracto acuoso de la *P. tomentosum* demostró que fue capaz de disminuir significativamente los niveles de glucosa sanguínea en nuestro modelo de ratas diabéticas en comparación con el grupo diabético control que solo recibió agua de beber  $P < 0.001$  (Tabla 3).

Además al realizar el mixed model ANOVA encontramos que existe una interacción significativa  $P < 0.004$  entre nuestras variables: glucosa, extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* y tiempo, como se puede observar en la Tabla 4.

El mezquite (*prosopis*) es un árbol del cual generalmente solo se aprovecha la madera para obtener leña, y que, a simple vista no es atractivo por lo que no se le da ningún valor decorativo, comercial ni mucho menos medicinal, mas sin embargo, algo muy importante es que es hospedero de una planta parásita conocida como “injerto de mezquite” o *Phoradendron tomentosum* la cual por su uso en Medicina Popular como agente antidiabético motivó el estudio de este trabajo de Tesis.

El Municipio de San Pedro Garza García, N. L. se ha preocupado por cuidar y proteger a este tipo de vegetación, adoptando al mezquite como una de sus plantas representativas, por lo que fácilmente se le puede encontrar como vegetación de ornato decorando plazas comerciales.

El estudio comparativo con hipoglucemiantes orales que se presentó al final de este proyecto fue realizado como un estudio preliminar ya que para desarrollarlo se utilizaron los animales diabéticos que ya habíamos utilizado en la prueba del extracto de la *P. tomentosum* esto, dada la dificultad de proveernos de animales en relación al factor tiempo quisimos aprovecharlos. Probablemente debido al estado de estos animales nuestros resultados no fueron muy significativos ya que solo el grupo de animales no-diabéticos respondió a la acción del hipoglucemiante glibenclámda disminuyendo sus niveles de glucosa sanguínea y no así el grupo de ratas diabéticas las cuales como ya tenían más de cuatro meses de padecer la enfermedad no fueron capaces de responder de una manera concluyente a la acción del extracto acuoso de la planta ni al clorhidrato de fenformina.

Los estudios fitoquímicos realizados utilizando tanto las reacciones coloridas como las cromatografías, revelaron que la *Phoradendron tomentosum* posee los siguientes grupos de metabolitos secundarios: esteroides, saponinas y sesquiterpenolactonas.

Después de analizar estadísticamente nuestros resultados podemos decir que el extracto acuoso de la planta *Phoradendron tomentosum* posee la capacidad de reducir los niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia) en nuestro modelo de animales diabéticos inducidos experimentalmente. Además solo nos restaría separar el extracto en los metabolitos secundarios identificados para determinar posteriormente cual o cuales son los responsables de esta actividad hipoglucemiante.

Tomando en consideración la actividad hipoglucemiante identificada en la *P. tomentosum* pretendemos, en un estudio futuro inmediato (Proyecto de mi Tesis de Doctorado en Ciencias) realizar la evaluación mutagénica de esta planta para que pueda ser aplicada con mayor seguridad como tratamiento en los pacientes diabéticos ayudándoles a reducir sus niveles de glucosa sanguínea y contribuir así al desarrollo de nuevas drogas hipoglucemiantes que resulten activas y no produzcan efectos adversos indeseables en nuestra población diabética.

## BIBLIOGRAFÍA

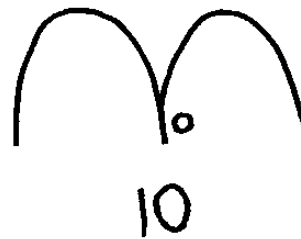
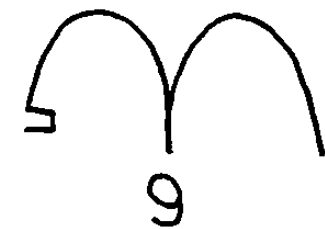
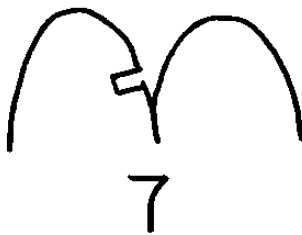
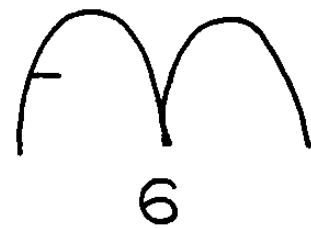
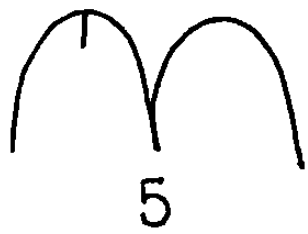
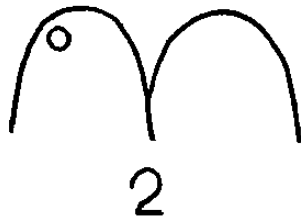
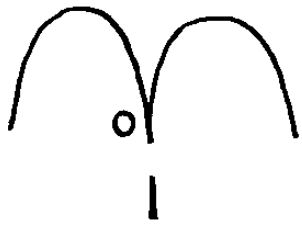
- 1.- Wyngarden, JB: Enfermedades Metabólicas, Tratado de Medicina Interna de Cecil, ed Interamericana, 16ª ed., Madrid España, Cap 10, 1109-1120 (1985).
- 2.- Tresánchez JM: Diabetes Mellitus, Terapeutica en Medicina de Fot S, Erill y Soler C. ed Doyma, Barcelona, España, Cap 169, 783-789 (1983).
- 3.- Obatomi DK, Bikomo E, Temple VJ: Anti-diabetic properties of african mistletoe in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 43: 13-17 (1994).
- 4.- Mellstrand S and Samuelsson G: Phoratoxin, a toxic protein from mistletoe *Phoradendron tomentosum* subsp *Macrophyllum* (Lorantaceae) disulfide bonds. *Acta Pharm Suecica* 11:367- (1974).
- 5.- Rosenstock K: Effect of glycemic control on microvascular complications in patients with type I diabetes mellitus. *Am J Med*: 82:47-53 (1987).
- 6.- Mellstrand ST and Samuelsson G: Phoratoxin, a toxic protein from mistletoe *Phoradendron tomentosum* subsp. *Macrophyllum* (Lorantaceae) improvements in the isolation procedure and further studies on the properties. *Eur J. Biochem* 32:143- (1973).
- 7.-Thunberg E: Phoratoxin B, a protein from mistletoe *Phoradendron tomentosum* subsp *Macrophyllum*. *Acta Pharm Suecica* 20(2):115- (1983).
- 8.- Clements RS: Rapid insulin in non insulin dependent diabetes mellitus *Am. J Med* 82: 415-419 (1987).
- 9.- Van der Merue CF: Blood glucose control on diabetes complications. *Ann Int Med* 106:331- (1987).
- 10.- Tolentino F and Schepens Ch: Ocular condition association with vitreous hemorrhage and current indications for vitreous surgery. *Vitreo Retinal disorders*. WB Saunders Co, Philadelphia 432-528 (1981).
- 11.- Tamez E: Hipoglicemintes Orales. Islas Andrade S y Lishits Guinzberg. *Diabetes Mellitus*. eds Interamericana y McGraw Hill 242-252 (1993).
- 12.- Moore DF, Wood DF, Volans GN: Features, prevention and management of acute overdose due to antidiabetic drugs. *Drug Saf* 9 (3): 218-252 (1993).

- 13.- Trease GE and Evans WC, Tratado de Farmacognosia, 12ª edición, Nueva editorial Interamericana, SA de CV, México, DF, 654 (1987).
- 14.- González Quintanilla JA, Estudio Químico del *Leucophyllum texanum* (flores y raíz) y *Dalea tuberculata* (aerea y raíz), UANL, (1978).
- 15.- Aguilar Contreras A y Zolla C: Plantas Tóxicas de México. Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria del Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 168-170 (1982).
- 16.- Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 4ª ed Editorial Botas, SA, DF. 472 (1959).
- 17.- Castleman M., Hierbas Curativas (Remedio para mas de 200 enfermedades), 3ª edición, Editorial Diana, SA de CV, México DF. 372-377 (1996).
- 18.- González Ferrara M. M., Plantas Medicinales del Noreste de México, Editorial El Sol, Monterrey, N.L., México, 121 (1998).
- 19.- Yerbario Mexicano ( Cúrese con Plantas y Yervas), Gómez-Gómez Hnos. Editores. 218-219 (1987).
- 20.- Ridaura SVE, Estudio Químico del *Phoradendron gregii*, ITESM, 1970
- 21.- Fieser LF, Fieser M. Química Orgánica. 4ª ed., Editorial Interamericana. (1968).
- 22.- Domínguez XA, Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, (1973).
- 23.- Harper HA, VW Rodwell y PA Mayes. Manual de Química Fisiológica, 4ª ed., Editorial El Manual Moderno, (1980).
- 24.- Bridle P, Stott KG; Timberlake CF. Anthocianins in *Salix* sp. New anthocyanins in *Salix* sp. New anthocyanin in *Salix purpurea*. Bark. Journal of Phytochemistry. 12 (5).
- 25.- Treviño A , Diabetes Mellitus, Ed Trillas, DF 1 (1989).
- 26.- Raisman SH. Management of the Juvenile Diabetes Mellitus. 2ª ed, The CV Mosby Co, Saint Louis. 1-3 (1971).
- 27.- Dominguez XA, Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, México, DF.141 (1988).

- 28.- Rakoff H, Ross NC. Química Orgánica Fundamental, 6ª edición. Editorial Limusa (1978).
- 29.- El-Fiki K, Fiky Mohamed A, Abou-Karam, Afify A: Effect of *Luffa aegyptiaca* (seeds) and *Carissa edulis* (leaves) extracts on blood glucose level of normal and streptozotocin diabetic rats, J of Ethnopharmacology 59 (47-47) 1996.



Fig. 1. Código Utilizado en el Pictorio para la Identificación de  
 Roedores, la Numeración Consiste en Perforaciones y Muecas  
 en la Oreja y Las Patas.



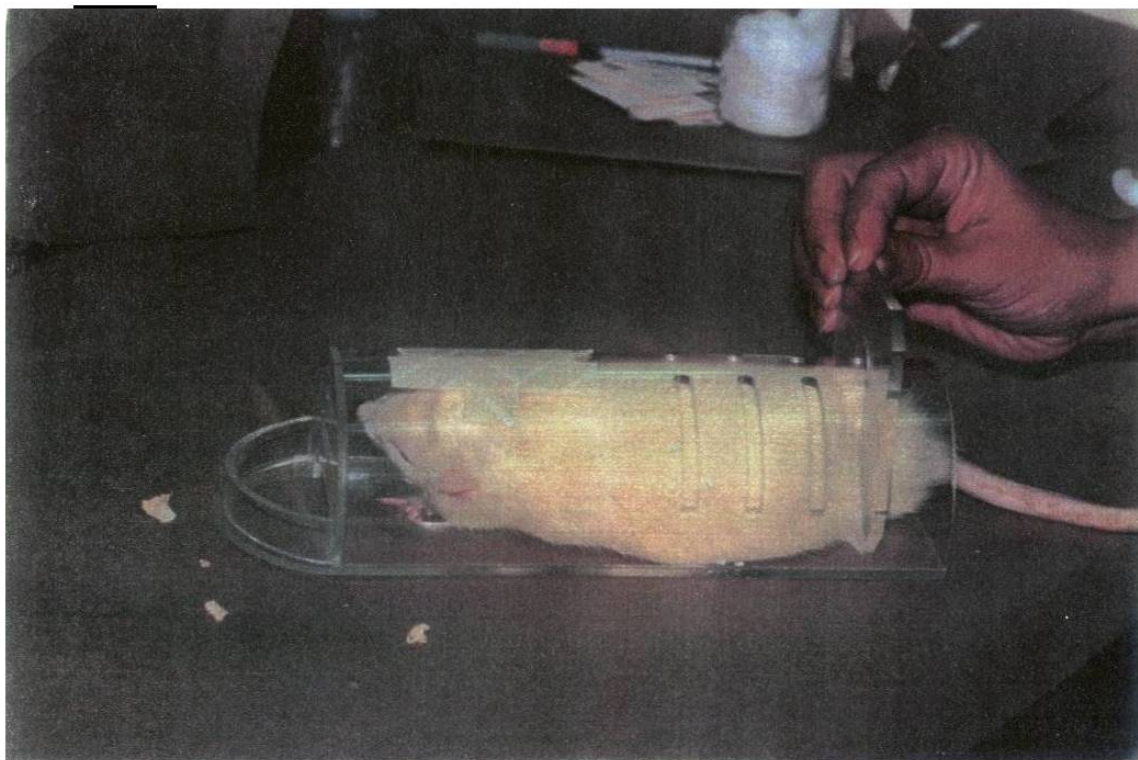


FOTOGRAFIA 1



FOTOGRAFIA 2

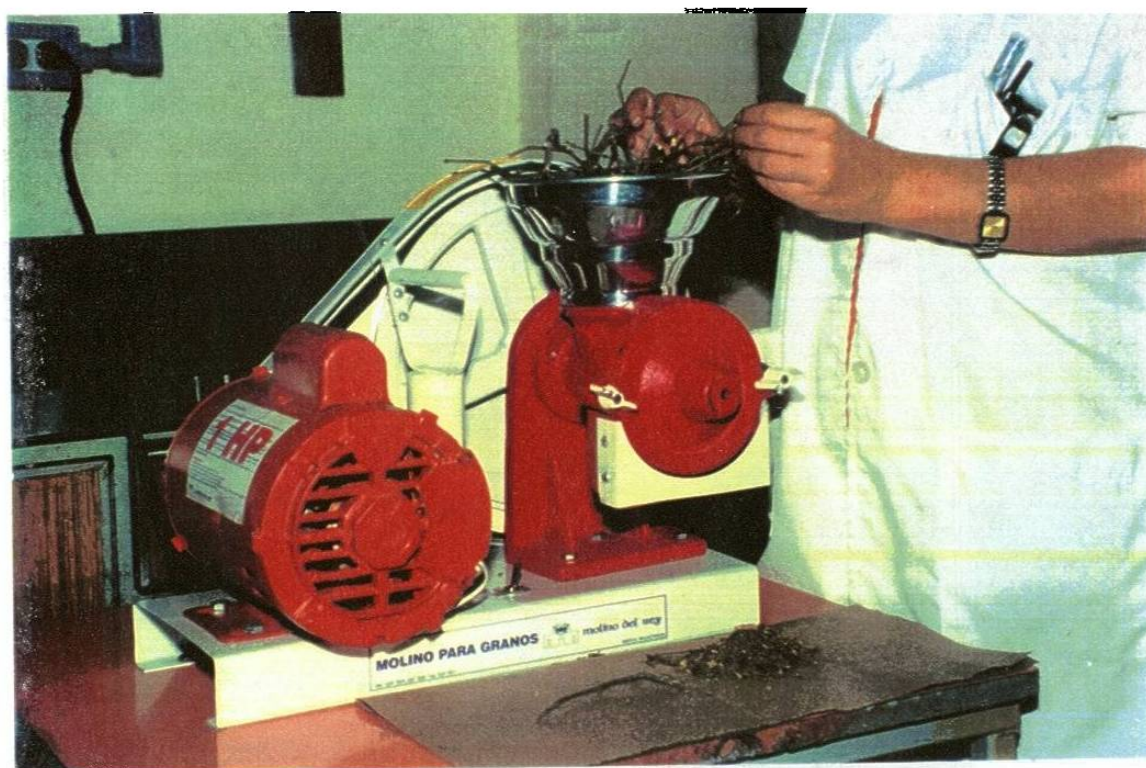




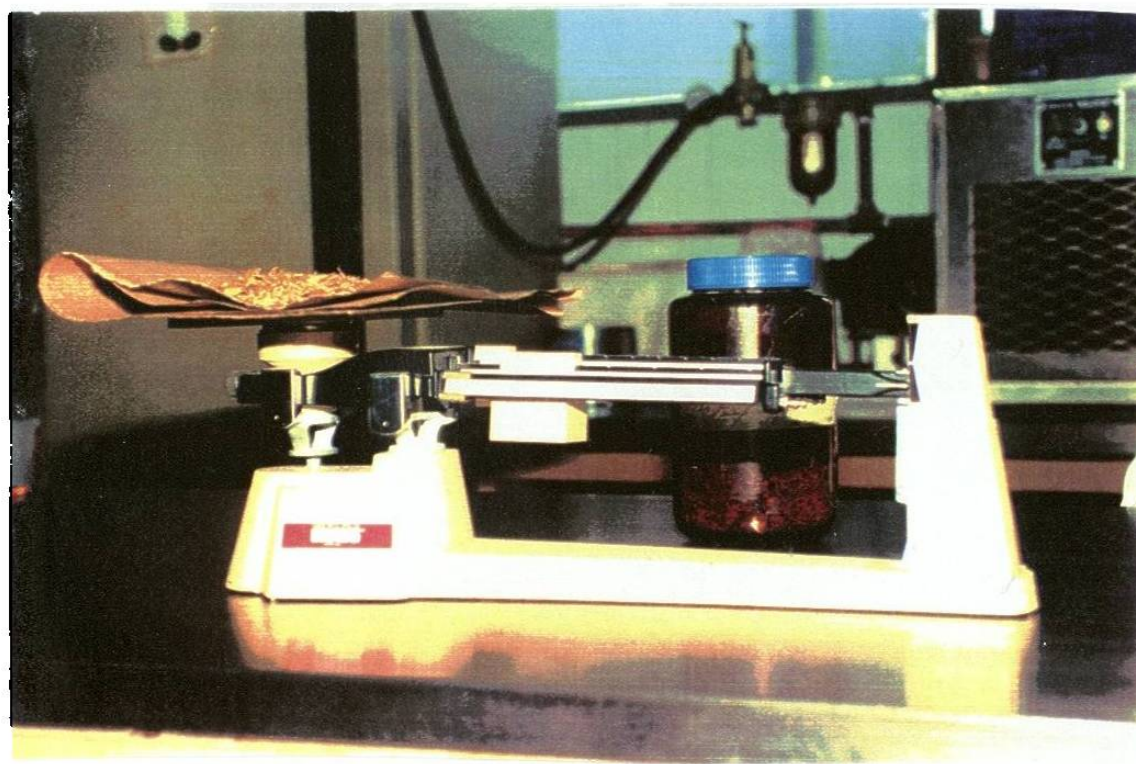


FOTOGRAFIA 5

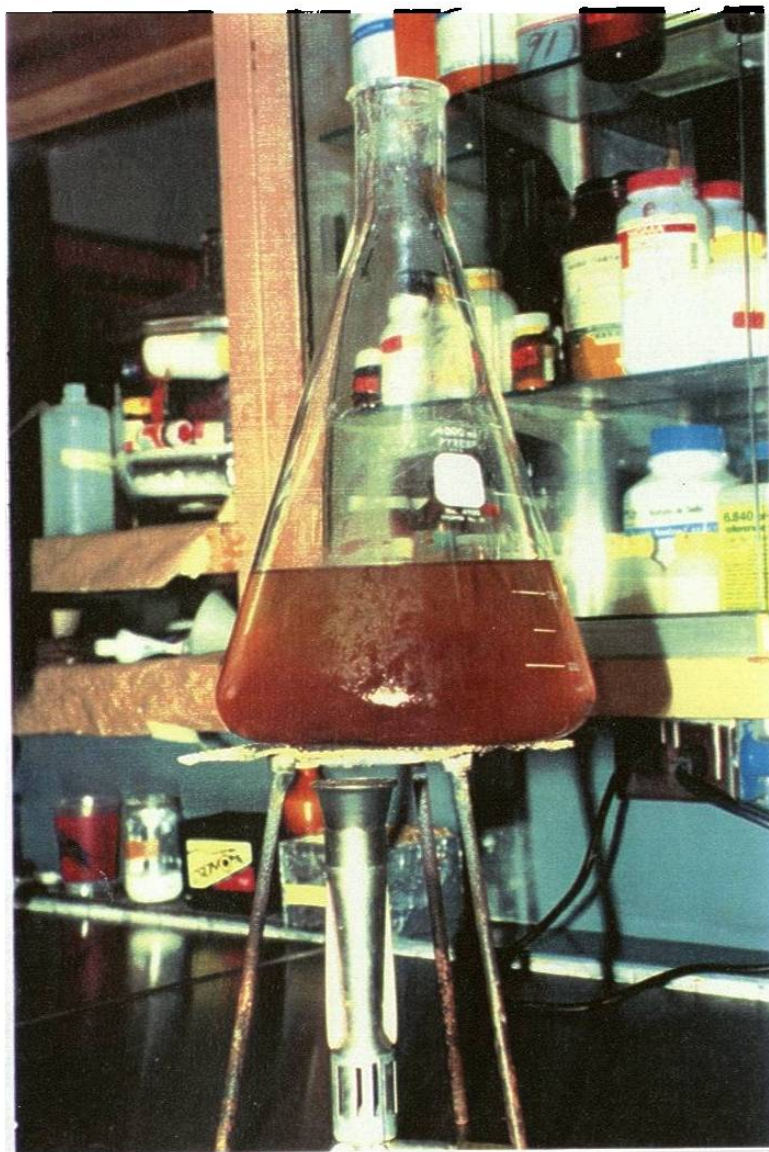




FOTOGRAFIA 6

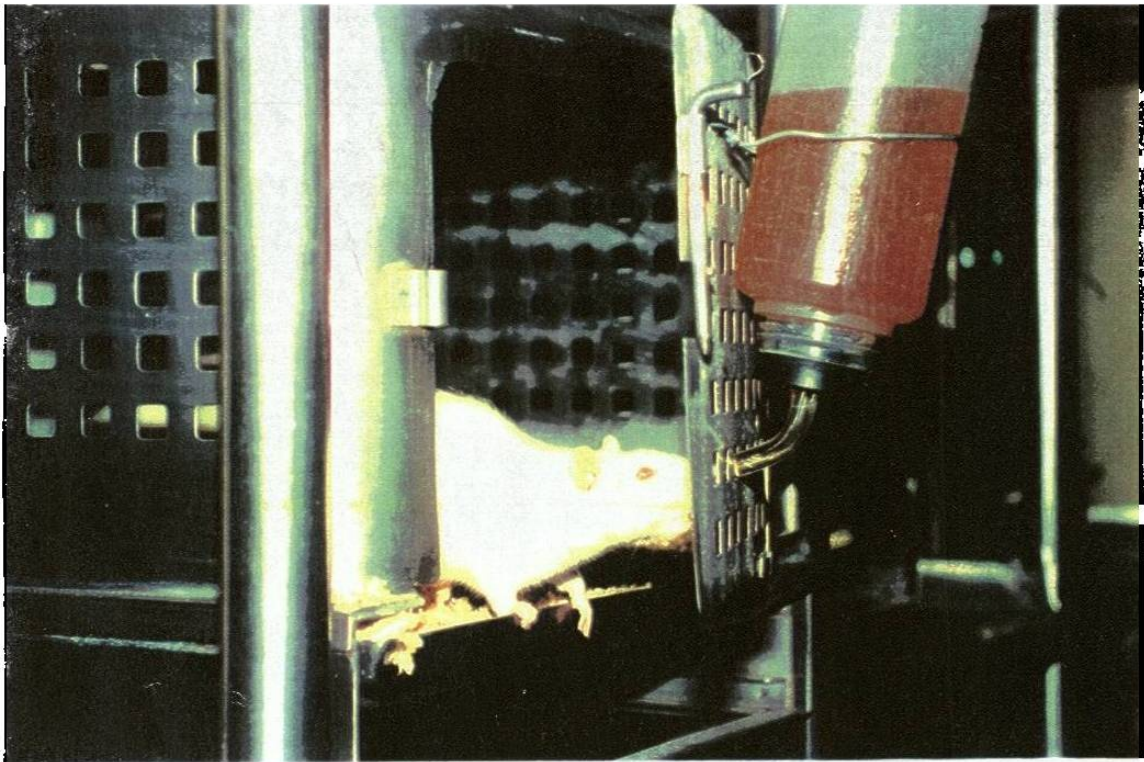


FOTOGRAFIA 7



FOTOGRAFIA 8





FOTOGRAFIA 9



FOTOGRAFIA 10



