

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

CBS

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE *Salpianthus arenarius*, *Acrocomia mexicana*, *Agarista mexicana* y *Verbesina persicifolia*.



T E S I S

que presenta para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P r e s e n t a  
Rosa Martha Pérez Gutiérrez

Abril/1997

---

225699

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ESTA INCLUIDO  
EN EL PADRON DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y EL  
NUMERO DE CONVENIO DE APOYO AL POSGRADO ES: PFP-  
200-93.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas aprobó la tesis:

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE *Salpianthus arenarius*, *Acrocomia mexicana*, *Agarista mexicana* y *Verbesina persicifolia*.

que presentó

Rosa Martha Pérez Gutiérrez

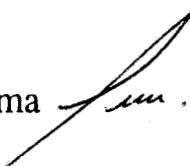
el día 17 del mes de abril del año 1997

Comité tutorial:

Tutor: Dra. Salud Pérez Gutiérrez

Firma 

Asesor: Dr. Héctor Luna Contla--

Firma 

Asesor: Dr. Rubén Román Ramos

Firma 

Sinodal: Dr. Raúl Enríquez Habib-

Firma 

Sinodal: Dr Enrique Hong Chong-

Firma 

## INDICE

Resumen-----	5
Antecedentes-----	11
Marco teórico-----	14
Material y métodos-----	37
Resultados y Discusión -----	59
Conclusiones-----	123
Bibliografía-----	126
Anexos -----	159

## RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad que como causa de muerte en 1995 ocupó en México el cuarto lugar, después de las enfermedades cardiovasculares, oncológicas y muertes violentas. El número de enfermos que padecen esta enfermedad se encuentra entre el 3 y el 6% a nivel mundial. En la actualidad el tratamiento de la diabetes consiste en el uso de insulina e hipoglucemiantes orales sin embargo los métodos empleados en el tratamiento para los diferentes tipos de diabetes se encuentran muy lejos de lo deseado para mantener un estado de normoglucemia y prevenir las complicaciones en los diabéticos; por lo que el índice de mortalidad a causa de esta enfermedad sigue en aumento. Por lo anterior un programa de investigación interdisciplinario sobre plantas medicinales podría conducir a alternativas eficientes para el control de esta enfermedad.

Las plantas *Salpianthus arenarius* (Nyctaginaceae), *Acrocomia mexicana* ( Palmaceae), *Agarista mexicana* (Ericacea) y *Verbesina persicifolia* (Compuestas) son utilizadas en la medicina folklórica en forma de extractos acuosos para el tratamiento de la diabetes mellitus en los estados de Michoacán y Guerrero (*Salpianthus. arenarius*), San Luis Potosí y Veracruz (*Acrocomia mexicana*), Guerrero (*Agarista mexicana*), Veracruz (*Verbesina persicifolia*). De cada planta se obtuvieron los extractos de hexano, cloroformo y metanol a los cuales se les determinó el efecto hipoglucémico en ratones diabéticos y normoglucémicos, se determinaron los niveles de glucosa sanguínea a 1.5, 3, 4.5 y 24 h después de la administración de los extractos por el método de o-toluidina. Los extractos metanólicos de la raíz de *Salpianthus arenarius* y *Acrocomia mexicana*, y clorofórmicos de las hojas de *Agarista mexicana* y *Verbesina persicifolia*, produjeron un significativo efecto hipoglucémico en los animales tratados. Estos extractos aumentaron la tolerancia de glucosa en ratas Wistar diabéticas.

Se aisló a partir del extracto metanólico de la raíz de *Salpianthus arenarius* un compuesto con actividad hipoglucémica al cual se le denominó “saliriol” y su estructura se determinó por medio de espectrometría de masas, Infrarrojo y RMN. El compuesto aislado se identificó como: 6´-(2-2 dihidroximetil-4-hidroxi metilen- 1,3-dioxolano)-β- D- manopiranososa.

La actividad antidiabética del saliriol se determinó en ratones normales y diabéticos después de la administración de varias dosis de este compuesto (25, 50 y 100 mg/kg) mostrando una fuerte actividad hipoglucemiante dosis-dependiente. En ratas diabéticas, el saliriol produce una disminución en la glucemia alcanzada durante la curva a la tolerancia de glucosa cuando se administró a dosis de 50 mg/kg. La actividad del saliriol fue comparada con la tolbutamida mostrando que el efecto hipoglucémico es de duración similar a ésta última.

A partir del extracto metanólico de la raíz de *Arocomia mexicana* se aisló un carbohidrato, al cual se le denominó “coyolosa” con propiedades hipoglucemiantes, y su respuesta es dosis- dependiente. La estructura y la estereoquímica relativa se determinó por medio de análisis espectroscópico, empleando información sobre las interacciones estéricas y conformación de derivados del tetrahidropirano y carbohidratos. El compuesto aislado se identificó como 6-O-β-D-galactopiranosil-6-O-β-D-galactosa. La coyolosa presentó una significativa disminución en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos, cuando se administró a dosis de 5,10, 20 y 50 mg/kg. La coyolosa administrada en ratones normoglucémicos a dosis de 50 y 100 mg/kg también disminuye los niveles de glucosa en sangre y en ratas diabéticas produce un aumento a la tolerancia a la glucosa a dosis de 50 mg/kg. El efecto hipoglucémico de este compuesto es menor de 24 h en comparación con la actividad de la tolbutamida que es de duración más prolongada.

Del extracto clorofórmico de las hojas de *Agarista mexicana* se aisló un compuesto, al cual se denominó “agaristina”, con propiedades hipoglucemiantes. La actividad antidiabética de la agaristina se determinó en ratones normales y diabéticos. Se encontró que después de la

administración de 50 mg/kg hubo una marcada disminución de los niveles de glucosa sanguínea. En ratas diabéticas produjo una disminución en los niveles de glucemia en la tolerancia a la glucosa a dosis de 50 mg/kg. El efecto hipoglucémico de este compuesto es mayor de 24 h mostrando que el efecto antidiabético es de duración similar al de la tolbutamida. Actualmente se está determinando la estructura de este compuesto.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a sickness that causes death. In 1995 it ranked in the fourth place, after cardiovascular, oncological and violent causes of death. The number of patients that have this sickness is of the order of 3 to 6 % worldwide. Nowadays, diabetes is treated by the use of insulin and oral hypoglycemic products. Nevertheless, these different methods of treatment produce results that are from producing the normal normoglycemic state desired to prevent complications in diabetics; thus, an interdisciplinary research program studying antiglycemic compounds in medicinal plants could offer alternatives to control this sickness.

The following plants are used in folklore medicine in Mexico for the treatment of diabetes mellitus: *Salpianthus arenarius* (Nyctaginaceae), *Acrocomia mexicana* (Palmaceae), *Agarista mexicana* (Ericaceae) and *Verbesina persicifolia* (Compuestas), as aqueous extracts in the states of Michoacan and Guerrero; (*Salpianthus. arenarius*), San Luis Potosí and Veracruz (*Acrocomia mexicana*), Guerrero (*Agarista mexicana*), Veracruz (*Verbesina persicifolia*). From each plant, extracts were made using hexane, chloroform and methanol, and to each, its hypoglycemic effect was determined, using diabetic and normoglycemic mice. The glucose blood levels were determined at 1.5, 3, 4.5 and 24 h after administration by the o-toluidine method.

Methanol extracts of the root of *Salpianthus arenarius* and *Acrocomia mexicana*, and chloroform extracts of the leaves of *Agarista mexicana* y *Verbesina persicifolia*, produced significant hypoglycemic effects in the treated animals. These extracts increased glucose tolerance in diabetic Wistar rats.

From the metanol extract of the *Salpianthus arenarius* root, a compound with hypoglycemic activity named “saliriol” was isolated. Its structure was determined by mass spectroscopy, infrared and RMN and identified as: 6'-((2,2-dihydroxymethyl-4-hydroxy-metilen-1,3-dioxolane)- $\beta$ -D-mannopyranose).

The antidiabetic activity of “saliriol” was tested in normal and diabetic mice after several dose administrations of this compound (25, 50 and 100 mg/kg), indicating a strong dose-dependent hypoglycemic activity. In diabetic rats, “saliriol” produced a reduction in glycemia, reached during the glucose tolerance curve when administered at a dose of 50 mg/kg. Saliriol's activity was compared with tolbutamide, indicating that its hypoglycemic effect is similar in duration to it.

From the methanol extract of the root of *Arocomia mexicana*, a carbohydrate was isolated and named “coyolosa”, which has hypoglycemic properties and its response is dose-dependent. Its structure and relative stereochemistry was determined by spectroscopic analysis, using information of its steric interactions of tetrahydropyrane and carbohydrates, and identified as 6-O- $\beta$ -D-galactopyranosil-6-O- $\beta$ -D-galactose.

Coyolosa presented a significant reduction in the blood glucose level in diabetic mice, when administered at doses of 5, 10, 20 y 50 mg/kg. And also reduces glucose levels in blood of normoglycemic and diabetic rats, causing an increase in the tolerance to glucose at doses of 50 mg/kg. The hypoglycemic effect of this compound is less than 24 h compared with tolbutamide activity which has a longer activity.

From the chloroform extract of the leaves of *Agarista mexicana*, a compound with hypoglycemic properties named “agaristina” was isolated. Its antidiabetic activity was determined in normal and diabetic mice. After 50 mg/kg dose administration it showed a

marked reduction in levels of blood glucose. In diabetic rats, it gave a reduction in glycemia levels in the glucose tolerance test at a dose of 50 mg/kg. Its hypoglycemic effect is similar in duration to tolbutamide, and its structure is currently being determined.

## ANTECEDENTES

En 1873, el arqueólogo y novelista alemán George Ebers, excavando en las ruinas de la antigua ciudad de Tebas encontró un papiro, escrito hacia el año 1553 A.C. Este papiro contiene una síntesis de todos los conocimientos médicos del antiguo Egipto, entre las diversas enfermedades que describe, menciona una en especial, donde los enfermos adelgazan, tienen hambre y sed, orinan en forma abundante indudablemente el sacerdote (anónimo) que escribió este papiro observó y supo describir adecuadamente los síntomas de la diabetes juvenil (1).

La primera descripción real de la diabetes data de alrededor de 1500 A.C. En los siglos cercanos al principio del cristianismo se describió la aparición de diabetes en generaciones sucesivas. Los famosos trabajos realizados en la India por Susruta y su discípulo Charaka, en el siglo V A.C. (2), indican la presencia de una rara enfermedad propia de las clases ricas, principalmente en las personas obesas que comen mucho dulce y arroz; cuya característica más peculiar es que la orina tiene un sabor dulce. Para Hipócrates, el padre de la medicina griega, la diabetes fue desconocida. En el año 70 de nuestra era, Arateo de Capadocia describe a la enfermedad como un sifón que vacía al organismo. Al paso de los años, los síntomas de la diabetes fueron perfectamente conocidos por los médicos y se conservan hasta la fecha los nombres dados por la etimología griega: polidipsia (sed), poliuria (orina abundante) y polifagia (apetito constante).

La medicina árabe alcanzó su esplendor en los siglos X y XI, el médico Avicena vuelve a describir la sintomatología de la diabetes y añade a los síntomas ya conocidos el trastorno en las funciones sexuales (2).

En el siglo XIV, el médico suizo Paracelso, colocó orina de un enfermo de diabetes en un recipiente, lo llevó a sequedad hasta obtener un polvo blanco, afirmando que debido a la presencia de esta sal se presentaba la polidipsia y la poliuria (2).

En el año 1679, el Dr. Thomas Willis (3), al igual que hiciera un milenio atrás Susruta, probó la orina producida por algunos enfermos de diabetes, encontrando en varios pacientes que la orina era muy dulce, en cambio en otros enfermos no lo era tanto y en algunos era totalmente insípida. Esta observación le permitió diferenciar dos clases de diabetes, la más frecuente es aquella en que la orina presenta sabor dulce y la llamó diabetes mellitus (en latín mellitus significa miel). Cuando la orina no presenta sabor la llamó diabetes insípida. Aún en este periodo se observó que la herencia era importante, ya que generalmente varios miembros de una familia estaban afectados con la enfermedad de agua dulce. Durante este lapso de la historia, se registró otro tipo de diabetes, la que se inicia en la madurez; en la cual, además de los síntomas usuales el paciente se encontraba obeso y sin energía.

Durante el siglo XIX, se inicia la época de la medicina experimental. Claude Bernard descubrió que las féculas y azúcares tomadas de los alimentos se metabolizaban produciendo glucosa y ésta en el hígado se convierte en glucógeno, el cual a su vez pasa nuevamente a glucosa manteniendo de una manera constante la concentración de azúcar en la sangre. Las descripciones históricas de la enfermedad por Thomas Willis, Dodson y Claude Bernard dieron importancia al padecimiento y al reconocimiento de las complicaciones que esta presenta (4).

También en el siglo XIX, Brockman, en un estudio en peces y más adelante Langerhans en su estudio en humanos, descubrieron que, dispersos en la masa pancreática de aspecto muy similar a las glándulas salivales, se encuentran racimos de células cuya estructura es diferente a las que producen enzimas digestivas y cuya función en ese momento no pudo ser determinada, estos islotes forman el 1% del total del páncreas. En 1889 los fisiólogos alemanes Von Mering y Minkowski de la Universidad de Estrasburgo, notaron que si se extirpaba el páncreas en perros, el animal desarrollaba diabetes con un comienzo agudo, de

curso grave y que terminaba con la muerte del animal en pocas semanas. Más adelante, los científicos descubrieron que aún destruyendo al páncreas, los animales no se volvían diabéticos si los islotes se preservaban. Los estudios de Opie en los Estados Unidos confirmaron el hecho de que los pequeños islotes estaban dañados en humanos con diabetes; por ello concluyó que el páncreas produce una sustancia indispensable para el aprovechamiento de las féculas y los azúcares, y que esta sustancia se debe de producir en los islotes de Langerhans y la bautizó con el nombre de insulina mucho antes de que esta fuera descubierta (5).

Utilizando esta información, en 1921 Banting y Best en Ontario, Canadá, iniciaron un proyecto de investigación sobre la diabetes; el cual consistió en el aislamiento y purificación de los tejidos de los islotes de ciertos animales e inyectaron este material a un animal con diabetes. Ellos encontraron que los niveles de azúcar sanguíneo descendían, esto fue un importante evento para los miles de diabéticos en todo el mundo y señaló el principio de una nueva era en el tratamiento de la diabetes. En el campo de la diabetes después de aislar la insulina pocos descubrimientos en la medicina han tenido tan grandes repercusiones como los trabajos experimentales realizados por estos investigadores canadienses . En 1955 Sanger dilucidó la estructura química de la insulina bovina y fue hasta 1960 que Nicol y Smith describieron la estructura química de la insulina humana. En 1963 un grupo de investigadores lograron la síntesis química de la insulina (6, 7). Si bien estos descubrimientos fueron considerados como la solución de los problemas originados por la diabetes, eventualmente se vio que la administración intermitente de insulina producía diversas complicaciones.

## MARCO TEORICO

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, caracterizada por un aumento de la glucosa en la sangre y la excreción de glucosa por la orina, como consecuencia de una deficiencia en la secreción de insulina o de un trastorno en el efecto biológico de la misma (8). La disminución de la eficacia de la insulina secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans está relacionada con otros estados patológicos que se originan en el hígado y otras glándulas endocrinas, especialmente la hipófisis, las suprarrenales y la tiroides (9-11). Actualmente se conoce muy poco acerca del mecanismo por el cual se produce esta enfermedad, por lo que en 1979 se decidió clasificar esta enfermedad en diferentes tipos, basándose en la características de la secreción de insulina y de su sensibilidad (12, 13) las cuales se discuten a continuación.

### 1.- Diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente (DMID).

La DMID está caracterizada por una destrucción total de las células  $\beta$  productoras de insulina probablemente debido a una reacción autoinmune, los pacientes más comunes son jóvenes, ya que es muy raro que se presente en personas adultas (14). Esta se manifiesta especialmente en personas no obesas; es un problema catabólico en el cual la insulina circulante se encuentra ausente y el glucagón plasmático es elevado y las células  $\beta$  no responden a ningún estímulo insulinogénico (15). La situación genética en estos casos aún no se encuentra muy clara.

El tratamiento adecuado de este tipo de diabetes es con insulina (16), y una dieta especial (17). El uso de insulina en el control de la diabetes y sus complicaciones han demostrado que reduce 76% el riesgo de que el paciente desarrolle retinopatía (15). El

objetivo principal en el manejo de pacientes DMID es asegurar que el individuo sea capaz de participar plenamente en las actividades cotidianas (18, 19).

## 2.- Diabetes mellitus tipo II o no insulino dependiente (DMNID)

Esta enfermedad se presenta en un grupo heterogéneo de personas, ocurre predominantemente en adultos y ocasionalmente en jóvenes y se caracteriza por presentar resistencia a la insulina, teniendo producción de ésta (20). Siempre se ha creído que la DMNID es un problema familiar (21-26) y actualmente se sabe que tiene fuertes determinantes genéticas (27). También la obesidad es un factor de riesgo perfectamente identificado (28-30). En la diabetes mellitus tipo II las células  $\beta$  generalmente se encuentran en menor número que las células  $\alpha$  y la secreción de insulina es usualmente suficiente para oponerse a la formación de cuerpos cetónicos, pero no para prevenir la hiperglucemia. Este grupo de pacientes se divide en dos subgrupos basados en la presencia o la ausencia de obesidad.

a.- Pacientes no obesos.- En estos pacientes generalmente no hay liberación de insulina en respuesta a la glucosa, sin embargo fácilmente responden a la estimulación de otros agentes insulinogénicos, tales como las sulfonilureas. La hiperglucemia en este subgrupo de pacientes es disminuida por agentes hipoglucemiantes orales o por dieta. Ocasionalmente se emplea la insulina para tener un control adecuado de la glucemia. El tratamiento recomendado es una dieta adecuada (31, 32) y sulfonilureas (33).

b.- Pacientes obesos.- Estos pacientes se caracterizan por presentar una diabetes suave. La mayoría de los pacientes que sufren de esta enfermedad son adultos pero ocasionalmente pueden ser niños (34). La hiperplasia en las células  $\beta$  del páncreas se encuentra presente y probablemente ésta sea la causa de la exagerada respuesta de la insulina a la glucosa (35-37). En este tipo de diabetes la obesidad es muy común y es resultado de una excesiva ingestión de alimentos con un alto contenido en calorías. En algunas ocasiones se presenta hipoglucemia después de un exceso de liberación de insulina. El tratamiento recomendado para este tipo de

pacientes es: dieta especial, ejercicio, pérdida de peso, hipoglucemiantes orales y en raras ocasiones debe de administrarse insulina (38).

Actualmente el desarrollo de la civilización ha conducido a que la dieta sea alta en grasas y baja en carbohidratos complejos como la fibra, así como una disminución en la actividad física, lo que ha ocasionado un incremento en el número de personas obesas. Esto ha contribuido considerablemente a elevar la incidencia de la diabetes mellitus (39). Anteriormente la dieta administrada a los pacientes diabéticos era alta en grasas y baja en carbohidratos reduciendo con ello el riesgo de problemas en las arterias coronarias, sin embargo recientemente la Asociación Americana de Diabetes recomendó que no se siga aplicando este concepto y que el porcentaje de calorías aportadas por los carbohidratos debe de variar de forma individual con cada paciente dependiendo de la actividad física que se desarrolle (40).

En diversas investigaciones (41-43) se demostró que la dieta alta en carbohidratos tiene diferente efecto en el control de la glucemia en pacientes DMNID que presentan diferentes grados de intolerancia a la glucosa. En aquellos pacientes que no tienen intolerancia a la glucosa severa, la ingestión alta de carbohidratos produce un incremento compensatorio en la secreción de insulina (44) y pueden ser tratados únicamente con dieta. En contraste con aquellos pacientes que presentan una intolerancia a la glucosa más severa, los cuales requieren del uso de fármacos hipoglucemiantes, el incremento compensatorio en la respuesta de insulina a las dietas altas en carbohidratos no ocurre (45).

La insulina actúa uniéndose a los receptores de proteínas tetraméricas de las membranas celulares las cuales consisten en dos sub-unidades extracelulares  $\alpha$  y dos trasmembranas  $\beta$ . La unión de la insulina a las sub-unidades  $\alpha$  causa una autofosforilación de los residuos de tirosina de la sub-unidad  $\beta$  intracelular. El receptor activado por la insulina se encuentra acoplado a un substrato receptor el cual puede afectar la hormona pleiotrópica responsable del metabolismo y crecimiento de la célula. Las proteínas que se encuentran involucradas con la

insulina aún no son conocidas, pero cada una de ellas puede jugar un papel importante en la resistencia a la insulina (46).

La falta de insulina disminuye la utilización de glucosa en los tejidos, especialmente el muscular y el adiposo, lo que contribuye a la hiperglucemia; otros dos factores que aportan más glucosa a la sangre son la glucogenólisis hepática y muscular y la gluconeogénesis en el hígado (47). Cuando la hiperglucemia sobrepasa el umbral renal aparece la glucosuria y se establece una diuresis osmótica, lo que explica la poliuria tan común de la diabetes. Si esta poliuria es intensa y se acompaña por una baja ingestión de agua, se produce deshidratación y hemoconcentración. Cuando la hipovolemia es grave puede causar insuficiencia circulatoria periférica o choque (48). La hipotensión que acompaña a la hipovolemia disminuye la perfusión renal sanguínea, que en caso de mantenerse durante cierto tiempo causa necrosis tubular aguda, oliguria o anuria y finalmente produce la muerte. Además, las condiciones de anaerobiosis generalizada producen un aumento en la concentración sanguínea de ácido láctico, que unido a la insuficiencia renal da origen a acidosis (49).

El metabolismo intermedio de las grasas se encuentra muy afectado en pacientes con diabetes ya que la grasa de los depósitos se moviliza y los ácidos grasos libres pasan a la circulación sanguínea en forma de lipoproteínas de baja densidad. El hígado se llena de grasa que solamente puede oxidar hasta el nivel de acetyl CoA; los fragmentos de dos carbonos se agregan formando los ácidos diacético y  $\beta$ -hidroxibutírico y de esta forma pasan a la circulación sanguínea por las venas hepáticas (50).

Cuando la concentración sanguínea de los cuerpos cetónicos sobrepasa el umbral renal de eliminación estos aparecen en la orina, donde pueden identificarse fácilmente. Sin embargo, al eliminarse por el riñón acarrear bases fijas con ellos, lo que contribuye todavía más a la pérdida de agua y de electrolitos agravando la hipovolemia (51). La incapacidad de utilización de la glucosa debido a la falta de insulina afecta considerablemente la biosíntesis de las

proteínas, con el consecuente predominio del catabolismo, especialmente en aquellos tejidos sensibles a la acción de la insulina, como son los músculos. Los productos de la proteólisis muscular pasan a la sangre llegando así al hígado, donde son desaminados oxidativamente y los residuos de carbono contribuyen a la gluconeogénesis o también a la formación de cuerpos cetónicos; el grupo amino de las aminas es eliminado por la orina en forma de urea junto con otros iones intracelulares como el potasio (52). La deficiencia de acción de la insulina en los diabéticos puede deberse a varias causas, tales como una reducción de la cantidad de tejido de los islotes de Langerhans, una biosíntesis defectuosa de proinsulina; una defectuosa conversión de proinsulina; una liberación deficiente de insulina en sangre como respuesta a un incremento de glucosa sanguínea; producción de una insulina genéticamente defectuosa o un elevado ritmo anormal de destrucción insulínica (53). En pacientes con diabetes juvenil la cantidad de insulina que se ha encontrado en el páncreas es inferior al 5% de la cantidad normal, si se aumenta la glucosa sanguínea no se induce liberación de insulina significativamente por parte del páncreas (54). Sin embargo en la DMNID, la cantidad total de insulina presente en el páncreas puede ser totalmente normal aunque su liberación a la sangre puede estar retrasada como respuesta a una glucemia elevada. Existen múltiples caminos por los cuales la insulina activa en sangre responde a las elevaciones de la concentración de glucosa sanguínea (11).

En el proceso diabético hay una afectación generalizada en todos los órganos de la economía y se encuentra caracterizada por trastornos microvasculares con engrosamiento de la membrana basal de los capilares, patología macrovascular con arterioesclerosis acelerada, neuropatía, que afecta tanto el sistema nervioso somático como el autónomo, disfunción neuromuscular, embriopatía y disminución de la resistencia a las infecciones (55-57). En algunas ocasiones la hiperglucemia puede no detectarse hasta que se desarrollan las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus, como la nefropatía, la retinopatía, el infarto al miocardio o la gangrena de las extremidades inferiores (58-62).

Todas estas disfunciones metabólicas pueden invertirse por la administración de insulina, la cual hace aumentar la velocidad de eliminación de la glucosa sanguínea hasta

concentraciones normales, incrementa la cantidad de glucocinasa, fosfofructocinasa y piruvatocinasa en el hígado, también inhibe la biosíntesis de las enzimas específicamente requeridas para la gluconeogénesis, disminuyendo así la formación de glucosa a expensas de los aminoácidos, restaura la velocidad de conversión de la glucosa en ácidos grasos e inhibe la degradación oxidativa de los ácidos grasos (63). Como resultado de esto, el nivel de azúcar sanguíneo vuelve a ser normal, desaparece la glucosuria y los cuerpos cetónicos retroceden a sus niveles normales. La administración de grandes cantidades de insulina provoca la caída de azúcar sanguíneo a niveles inferiores a los 80 mg/100 ml y pueden provocar choques insulínicos, convulsiones y coma, lo que sucede cuando el azúcar en la sangre desciende por debajo de los 20 mg/100 ml, esto se contrarresta con la administración intravenosa de glucosa (21).

Otra alteración del metabolismo de la glucosa durante la diabetes es la aceleración de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa, indicando que el metabolismo del organismo diabético está encauzado a mantener la mayor concentración posible de glucosa en la sangre, a pesar de que su nivel sanguíneo exceda en mucho el umbral renal para la glucosa (7).

¿ Por que razón los diabéticos no sólo presentan un defecto en la utilización de la glucosa por los tejidos, sino que están metabólicamente organizados para producir las cantidades máximas de glucosa a expensas de los lípidos y aminoácidos y evitar que la glucosa se convierta en grasa ? La respuesta a esto es que una exacerbada gluconeogénesis y una síntesis baja de grasa que constituyen compensaciones biológicas a la falta de insulina; según este punto de vista la concentración de glucosa en sangre se incrementa para que la deficiencia de su transporte puede ser superada, permitiendo así la utilización de la glucosa por parte de los tejidos periféricos en ausencia de insulina (5).

## TRATAMIENTO DE LA DIABETES

La terapia moderna de la diabetes comenzó con el descubrimiento de la participación del páncreas en la diabetes por Von Mering and Minkowski en 1889, y la demostración hecha por Banting y Best en 1921 de que un extracto de páncreas de res podía bajar los niveles de glucosa sanguínea en perros pancreatectomizados.

La terapia médica para el control de la diabetes está enfocada principalmente a combatir la incapacidad de utilización normal de los carbohidratos y la prevención de la hiperglucemia y glucosuria. En pacientes con DMID la terapia está basada en la administración de insulina parenteral para suplir la carencia de insulina (15). Esta puede ser administrada en forma cristalina, la cual tiene un efecto rápido pero es de corta duración, también se pueden administrar fármacos como: protamina Zinc-insulina (PZI), insulina globina e isofano insulina produciendo que la hormona activa pueda ser liberada de manera gradual. La combinación de insulina soluble de acción rápida y preparados de acción prolongada también son usados (64).

Con la aplicación de estos tipos de insulina pueden surgir efectos secundarios indeseables tales como: anomalías de refracción transitoria, alergia frente a la molécula de insulina o sustancias de retardo, alteraciones cutáneas locales, fuerte resistencia insulínica e hipoglucemia (48- 67).

La terapéutica con insulina puede producir por lo menos cinco clases moleculares de anticuerpos anti-insulina durante el curso del tratamiento: IgA, IgD, IgG, IgM y IgE. Todos los enfermos tratados con insulina desarrollan una alta concentración de anticuerpos IgG anti-insulina que neutraliza lentamente la acción de la hormona pancreática, esto hace que se requieran concentraciones altas de insulina a menudo más de 200 UI al día. (38,48).

Aunque la administración de insulina disminuye los síntomas de la diabetes lo cual hace que el paciente retorne a una vida casi normal, desafortunadamente no controla los defectos metabólicos presentes en los diabéticos y no previene las complicaciones futuras. Se cree que este problema se debe a las fluctuaciones de niveles de glucosa sanguínea causados por la inyección de insulina o a los diferentes métodos desarrollados recientemente para mantener un estado de normoglicemia constante (bombas portátiles de insulina, monitores de glucosa sanguínea) (68).

Los medicamentos antidiabéticos suministran insulina exógena o estimulan la producción de insulina endógena en pacientes con diabetes. La insulina tiene la desventaja de que solamente se puede administrar por vía parenteral, en comparación con los agentes hipoglucemiantes que se administran por vía oral. De ahí el éxito terapéutico de éstos (20).

En 1940 se observó que ciertas sulfonamidas usadas para el tratamiento de fiebre tifoidea y neumonía provocaban hipoglucemia conduciendo así al desarrollo de las sulfonilureas como agentes hipoglucemiantes. La tolbutamida fue el primero en ser aprobado en los Estados Unidos en 1957. El mecanismo de acción de estos fármacos es estimular la secreción de insulina a través de los receptores sulfonilureas de las células  $\beta$  produciendo disminución de iones  $K^+$  en los canales de ATP y posiblemente a través de un efecto directo en el transporte de calcio intracelular y también producen una reducción en la producción de glucosa hepática (69).

En pacientes con DMNID, se recomienda el uso de hipoglucemiantes orales tales como: Tolbutamida, Tolazamida, Acetohexamida, Cloropropamida, Glibenclamida y Glipicida, empleados en forma simple o en combinaciones. Estos hipoglucemiantes orales son efectivos para controlar los niveles elevados de glucosa sanguínea y glucosuria pero no para prevenir todas las complicaciones de la diabetes (70).

Con la aplicación de las sulfonilureas pueden surgir efectos secundarios indeseables tales como: hiponatremia, reacciones dermatológicas, hepatitis y efectos hematológicos. Desafortunadamente ninguna de las sulfonilureas conocidas normaliza la secreción de insulina (71).

Otra clase de fármacos son las biguanidas, el primero de ellos fue el Fenformin aprobado en 1959 pero debido a que produce acidosis láctica se retiró del mercado norteamericano. Posteriormente, desde 1977 el Metformin se ha usado en la terapia de DMNID debido a que incrementa la sensibilidad a la insulina en el tejido a través de un sistema transportador-enlace (72).

En años recientes se ha encontrado que en los pacientes que han utilizado diferentes antidiabéticos orales por un largo periodo, se han incrementado considerablemente los trastornos cardiovasculares, por lo que actualmente se recomienda que aquellos pacientes que no los requieran deban de ser tratados inicialmente con dieta especial. Las combinaciones de insulina y fármacos antidiabéticos rara vez se usan (73).

Los requerimientos dietéticos de las personas diabéticas difieren considerablemente de un paciente a otro, dependiendo de la severidad de la enfermedad. El contenido en calorías de la dieta del paciente diabético depende del peso comparado con el peso deseable. El paciente diabético obeso requiere de una reducción gradual de peso seguida por una dieta que lo mantenga en el peso ideal, el cual será alrededor del 10% más bajo del peso deseable para cada individuo (74). La razón principal por la cual un paciente diabético debe de estar en un peso ideal es que la respuesta de la insulina a las células de grasa depende del número de células de grasa en el cuerpo. En personas obesas existe la necesidad de almacenar una cantidad anormal de grasas y las células adiposas presentan poca respuesta a la insulina ya que requieren de una gran cantidad de ésta para mantener la tolerancia y el metabolismo de los carbohidratos en forma normal. La pérdida de peso y la reducción del tamaño de las células adiposas pueden

producir que en este tipo de paciente regrese la sensibilidad de la insulina y se reduzca la necesidad de ésta, permitiendo que el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas se acerque más a lo normal (75-77).

Contrariamente a lo que se creía en los años 50 que los carbohidratos debían de ser restringidos en la dieta de la mayoría de los pacientes diabéticos, se ha visto que el incremento en el contenido de carbohidratos en la dieta de los pacientes insulino-dependientes, sin aumentar el contenido calórico total no incrementa el requerimiento de insulina. Actualmente, el 45% de las calorías en las dietas para diabéticos proceden de los carbohidratos, por lo que la flexibilidad en el menú incrementa considerablemente la aceptación de las dietas por los pacientes (20).

El ejercicio produce efectos benéficos en los pacientes no-insulino-dependientes ya que este incrementa la sensibilidad a la insulina provocando con ello cambios en los niveles plasmáticos de insulina, glucagón y catecolaminas (78-81). El ejercicio también ayuda a la reducción de peso en los pacientes diabéticos obesos insulino-resistentes ya que el glucógeno muscular es utilizado durante el ejercicio (82).

Otras opciones en el tratamiento de la diabetes es el uso de agentes antihiper glucemiantes tales como inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, tiazolidinedionas, cloroquina, hidroxiclороquina, derivados del ácido fíbrico como el clofibrato (83).

La terapia de la diabetes requiere de la aplicación de los conocimientos sobre la naturaleza de la enfermedad y del mecanismo de acción, seguridad y eficacia del tratamiento empleado. En estudios recientes se ha determinado que el control de la hiperglucemia en pacientes diabéticos puede ser segura y efectiva hasta por 7 o 10 años ya que después de este tiempo generalmente se presentan las complicaciones cardiovasculares características de la DM (84-88). Los métodos empleados en el tratamiento para los diferentes tipos de diabetes se

encuentran muy lejos de la idealidad para mantener un estado de normoglucemia y prevenir las complicaciones en los diabéticos. En países en desarrollo existen otros problemas relacionados con la terapia convencional como son: la inyección de insulina, su almacenaje, control de la dieta, complicaciones por desnutrición, carencia de educación de los pacientes y carencia de cuidados de la salud (89). En tales situaciones la mortalidad relacionada con la diabetes es más grande sobre todo en las áreas rurales. Esto produce una gran necesidad de alternar estrategias en la terapia de la diabetes.

Actualmente la diabetes mellitus se encuentra dentro de las primeras 10 causas de muerte en los países en vías de desarrollo y en los países desarrollados ocupa el 3<sup>er</sup> lugar después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas. Con base en datos estadísticos se ha encontrado que la DM y sus complicaciones es la causa principal de ceguera irreversible y se ha calculado que el 6% de la población mundial padece de diabetes(90).

Durante 1975 la DM ocupaba en México el décimo lugar como enfermedad causante de muerte, constituyendo el 2.4 % de las defunciones totales de ese año. En los últimos años la incidencia de diabetes ha aumentado considerablemente en el país (91). En 1985 murieron a causa de esta enfermedad 16,626 personas ocupando el séptimo lugar como causa de defunciones (92). En 1995 la diabetes como causa de muerte ocupó el cuarto lugar, después de las enfermedades cardiovasculares, oncológicas y muertes violentas (93).

En Estados Unidos de América, actualmente existen 14 millones de personas que padecen diabetes. Alrededor del 90% de estos pacientes presentan el tipo II y cerca del 10% el tipo I. El tratamiento de esta enfermedad representa un costo de 9.6 mil millones de dólares por año a este país (94). En 1987 se calculó que 5.7 millones de días en diversos hospitales se usaron para el tratamiento de complicaciones de la diabetes, con 2 millones de días laborables perdidos, con una mortalidad de 80,000 calculandose un costo de 10.6 mil millones de dólares (95). La diabetes se ha incrementado considerablemente en los últimos años en

áreas rurales de naciones en desarrollo (96). Alrededor del 90% de la población rural utiliza la medicina tradicional para el cuidado de la salud e investigaciones realizadas sobre medicina tradicional condujeron al descubrimiento de los últimos 88 fármacos de uso mundial (97), por lo que un programa de investigación interdisciplinario sobre plantas medicinales podría conducir a alternativas eficientes para el control de esta enfermedad.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 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 (98). Esto ha promovido la realización de estudios experimentales y clínicos encaminados a la validación científica de las propiedades medicinales, que la población atribuye, a una serie de plantas.

## **LAS PLANTAS EN EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES**

Desde tiempos antiguos se ha reportado el uso de plantas en el tratamiento de la diabetes. En el Papiro Ebers en 1550 a.C. se recomienda una dieta alta en fibra y la planta *Momordica charantia* (1). En 1981 Pushpa (99) aisló un polipéptido p-insulina de las frutas y semillas de la *M. charantia* el cual tiene un peso molecular de 11, 000. Posteriormente la actividad antidiabética de este compuesto fue determinada en animales de experimentación (100). Antiguamente la glucosuria se conocía como el síntoma principal de la diabetes reportada en textos médicos, como el Sushruta Sambita y Charaka Sambita (101) y se recomendaban frutas y granos para el tratamiento de la diabetes los cuales tienen gran cantidad de carbohidratos complejos, fibras solubles e insolubles.

Una gran cantidad de plantas se han descrito para el tratamiento de la diabetes en todo el mundo y debido al gran número de estudios etnobotánicos existentes, resulta difícil precisar la cantidad de especies medicinales usadas empíricamente, en el control de la DM. Sin embargo, debido al creciente interés mostrado por los científicos en la medicina tradicional y folklórica han sido reportadas más de 800 plantas usadas en el tratamiento de la diabetes mellitus. Estas plantas se han usado empíricamente para el tratamiento de los síntomas de la diabetes; esto representa más de 725 géneros en 183 familias, extendiéndose filogenéticamente desde las algas marinas y hongos hasta las plantas superiores.

Las familias de plantas más citadas por su actividad hipoglucémica son: (102)

Familia	Especie citada	Especies totales
Fabaceae	127	18,000
Asteraceae	98	21,300
Lamiaceae	36	3,500
Liliaceae	35	6,460
Poaceae	30	10,000
Euphorbiaceae	30	7,000

La distancia filogenética entre cada una de las familias es una fuerte indicación de la gran variedad de constituyentes activos. Los estudios quimiotaxonómicos son frecuentemente utilizados para el descubrimiento de plantas con nuevos constituyentes activos, por lo que es necesario aprender más sobre los hipoglucemiantes de origen natural y sus mecanismos de acción para que el descubrimiento de nuevas sustancias pueda ser llevado a cabo de manera sistemática. La mitad de las especies reportadas en la literatura han sido usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes pero solamente una pequeña parte de ellas han recibido evaluación experimental y clínica para determinar su eficacia (103). Con base en los datos reportados en los estudios sobre los remedios de la medicina tradicional para el control de

la diabetes mellitus existe un gran potencial para la obtención de nuevos compuestos antidiabéticos.

Se les han aislado e identificado la substancia causante de la actividad antidiabética aproximadamente a 100 plantas. La mayoría de los compuestos aislados con actividad hipoglucemiante son glicanos y proteínas, seguidos de mucílagos. También se han identificado otros compuestos con actividad hipoglucemiante tales como: flavonoides, esteroides, triterpenos y alcaloides (104).

La actividad hipoglucemiante de 20 plantas pertenecientes a las familias de las Lileaceas, Amarillidaceas, Dioscoreaceas, Malvaceas y Plantaginaceas fueron estudiadas por Tomoda (105), aislando de ellas diversos mucílagos con una considerable actividad hipoglucemiante. También observó que los mucílagos aislados de las plantas pertenecientes a la familia de las Malvaceas, presentaron efecto antidiabético, estos compuestos contienen una estructura repetida de (1→4)-[O-β-(D-glucopiranosil ácido urónico)]-(1→3)-O-α-(D-galactopirano ácido silorónico)- (1→2)-O-α-L-ramnopiranosil. Los glicanos aislados de las plantas *Anemarrhena asphodeloides* (106), *Aloe arborescens* Mill (107), *Atractylodes japonica* (108), *Coix lachryma-jobii* (109), *Dioscorea japonica* (110), *Eleutherococcus senticosus* (111), *Ephedra distachya* (112), *Oryza sativa* (113), *Ganoderma lucidum* (114) *malva verticillata* (115) *Lithospermum erythrorhizon* (116) *Trichosanthes kirilowii* (117) y *Saccharum officinarum* (118), se probaron en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos produciendo una significativa disminución en los niveles de glucosa sanguínea.

En las últimas décadas también se han aislado péptidos y glicoproteínas con actividad hipoglucemiante de las plantas: *Morus alba* (118), *Centaurea aspera* (119), *Coccinia indica* (120), *Musa sapientum* (121), *Panax ginseng* (122), *Cystoseria barbata* (123), *Acacia milanoxylon* (124), *Panax quinquefolium* (125).

Las semillas de numerosas plantas pertenecientes a la familia de las Fabaceas son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes. Además de los efectos directos de los constituyentes antidiabéticos que contienen, también presentan efectos sobre la dieta ya que estas semillas tienen un alto contenido en carbohidratos complejos los cuales se digieren más lentamente que cualquier otro tipo de almidón. Estudios clínicos sobre dietas altas en legumbres mostraron un importante control en los niveles de glucosa sanguínea, en dietas con fibras no-celulósicas, tales como gomas y galactomananas, la absorción de la glucosa en el intestino es lenta (126). La modificación de las características físicas y químicas del contenido intestinal provocado por las gomas contenidas en las leguminosas puede también modificar la liberación de hormonas gastrointestinales y con ello influir en la secreción de insulina y la motilidad gastrointestinal (127). La actividad hipoglucemiante de un gran número de gomas fue atribuido a la inhibición de la gluconeogénesis y a la estimulación de la utilización de la glucosa periférica y no a la interferencia con la absorción de la glucosa en el intestino (128).

La actividad hipoglucemiante de los mucílagos ha sido ampliamente estudiada (129). La fermentación bacteriana intestinal de oligosacáridos y fibras produce ácidos grasos de cadenas cortas los cuales al ser absorbidos afectan el proceso metabólico relacionado con la gluconeogénesis hepática (130).

Numerosos investigadores han aislado una gran variedad de glicanos, peptidoglicanos y heteroglicanos a partir de plantas usadas en la medicina tradicional oriental. Estos carbohidratos complejos tienen pesos moleculares de 1000 a 10,000 y presentan actividad hipoglucemiante cuando se administran por vía i.p. en animales normales e hiperglucémicos. El mecanismo de acción de estos compuestos es diferente, por ejemplo el Aconitan A aislado de *Aconitum carmichaeli* potencia la actividad fosfofructocinasa hepática (131). El glicano Ganoderan B aislado de *Ganoderma lucidum* incrementa el nivel de insulina plasmática, incrementa la actividad de la fosfofructocinasa hepática y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y reduce el contenido de glucógeno hepático (132). Los glicanos panaxans A y E de la *Ganoderma lucidum* ginseng presentan diferentes mecanismos de acción aunque presentan estructuras parecidas.

Panaxans A y B estimulan la utilización de la glucosa hepática incrementando la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la fosforilasa A (133).

Los flavonoides son pigmentos que se encuentran en la mayoría de las plantas y algunos de ellos presentan actividad antidiabética tales como: La (-)- epicatequina aislada de la *Pterocarpus mersupium* (134), El camferol-3-O-ramnosido y la quercetina-3-O-ramnosido aislados de *Zyzyphus rugosa* (135), el quercetina aislada de *Baukina purpurae* (136), la colaflavonona obtenida de la planta *Garcinia kola* (137), la bellidifolina aislada de *Swertia japonica* (138). La (-)- epicatequina y miricetina aislada de la *Pterocarpus mersupium* causan un incremento en la secreción de insulina en los islotes del páncreas (139). Estos compuestos son conocidos como potentes inhibidores de la proteína cinasa tirosina (140)

Entre los esteroides y triterpenos aislados de diversas plantas que presentan actividad hipoglucemiante podemos mencionar los siguientes: El fagastero [*Phyllanthus emblica*, (141)], el ácido gimnemico [*Gymnema sylvestre*, (142)], sitosterol [*Coffea arabica* L., (143)], acetato de lupeol [*Phoenix dactylifera*, (144)], sapogenol [*Bumelia sartorum*, (145)], ácido torméntico [*Poterium ancistroides* Desf), (146) ], ácido oleánico [*Momordica cochinchinensis*, (147)], triterpenoides polihidroxilados [*Eriobotrya japonica*, (148)], sacarol [*Stevia rebaudiana*, (149) ], ginsenosido Rg<sub>2</sub> [*Panax ginseng*), (150) ], ácido ursólico [*Cornus officinalis*, (151)].

Las semillas de las Leguminosas *Trigonella foenum* y *Lupinus termis* usadas en la medicina tradicional y folklórica, presentaron actividad hipoglucemiante cuando se administraron oralmente. Los efectos antidiabéticos de los alcaloides catarantina, lupidina, osparteina, lupanina, escopoleina, cumarina y trigonelina aislados de estas plantas presentaron una actividad hipoglucemiante de corta duración, a diferencia de la cumarina que presentó una acción prolongada (152) . Los alcaloides: tecomina [*Tecoma stans*, (153)], dioscoretina [*Dioscorea dumetorum*, (154)], criogenina [*Decdon verticillatus*, (155)], galegenina [*Galega officinalis* , (156)], lepidina [*Lepidus ruderale*, (157)], latirina [*Lathyrus japonica* (158)],

capsaicina [*Capsaicum anuum* (159)] y berberina [*Coptis chinensis*, (160)], presentaron actividad antidiabética en animales normoglucémicos y diabéticos. La *Catharanthus roseus* es una planta silvestre usada como remedio tradicional para la diabetes, en Inglaterra en 1920 se fabricó una preparación con el nombre de Vinculin con base en los estudios farmacológicos realizados en conejos con el extracto acuoso de esta planta. Posteriormente Svoboda en 1964 (161) probó la actividad hipoglucemiante de los alcaloides aislados de la *C. roseus* durante una investigación de nuevas sustancias con actividad oncolítica. Se observó actividad hipoglucemiante con catarantina, leurosine, locnerina, tetrahidroalstonina, vindolina y vindolinina. (162). Los alcaloides de la *C. roseus* podrían servir como modelo para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos y se sintetizaron 11 alcaloides derivados de la indolizina como análogos de vincamina, vindolina y vindolinina y se probó su actividad hipoglucemiante por vía oral en ratas, pero el mejor de ellos mostró solo la tercera parte de la actividad de la tolbutamida (163).

Los compuestos que contienen nitrógeno tales como: quinolina-2-metanol [*Kitasatoa griseophaens*, (164)], difenilamina [*Allium cepa* (165)], 1,2 pirrolidinas substituidas [*Tinospora cordifolia*, (166)], emiricedina [*Emiricella quadrilineata*, (167)], derivados de la guanidina [*Ganoderma lucidum*, (168)], metilen ciclopropil glicina [*Litchi smensis*, (169)], presentaron actividad hipoglucemiante en animales normoglucémicos y diabéticos. Estudios *in vitro* de los mecanismos de acción de los derivados de la quinolina, quinolinato y 3-mercaptopicolinato (170) demostraron que la liberación de alanina en el músculo es inhibida por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólico y mitocondrial.

Los principios hipoglucemiantes de la cebolla (*Allium cepa*) son compuestos que contienen sulfuros tales como: alil propil disulfuro y el alicin, presentan actividad hipoglucemiante en animales normales y con diabetes inducida con aloxana pero no en animales pancreatectomizados. (171).

La ingestión de la fruta de *Blighia sapida* causa vómito, los constituyentes eméticos son: amino ácido ciclopropanoide, hipoglicina A,  $\gamma$ -L-glutamil dipeptido e hipoglicina B los cuales son también potentes hipoglucémicos, estos compuestos actúan inhibiendo las enzimas  $\beta$ -oxidadas bloqueando la oxidación de las cadenas largas de los ácidos grasos (172).

Las semillas de la planta *Galega officinalis* L. contiene gelagenina que es un derivado de la guanidina. Este compuesto bloquea la deshidrogenasa succínica y citocromo oxidasa, las biguanidas también se conocen como inhibidores de la absorción de glucosa en el intestino (173).

Entre las plantas cuyo efecto hipoglucémico ha sido demostrado en diferentes modelos de animales, pero cuyos principios activos no han sido aislados y caracterizados se encuentran las siguientes plantas: *Euphorbia prostata* y *Fumaria parviflora* (174), *Cuminum nigrum* (175), *Lythrum salicaria* (176), *Centaurea corcubionensis* (177), *Gymnema sylvestre* (178), *Myrtus communis* (179), *Bumelia sartorum* (180), *Verbesina persicifolia*, *Valeriana edulis*, *Loeselia mexicana*, *Cecropia obtusifolia*, *Bidens pilosa*, *Cacalia decomposita*, *Coutarea latiflora*, *Eysenhardtia polystacha*, *Psittacanthus calyculatus*, *Turnera diffusa* (181) y *Agrimonia eupatoria* (182).

A nivel celular y molecular las plantas y los animales no son muy diferentes en sus procesos metabólicos. La glucosa es el precursor de energía más importante en la biosíntesis de las plantas y ésta es almacenada y también se moviliza mediante la acción de diversas hormonas al igual que en los animales. Los reguladores del crecimiento de las plantas como el ácido indol-3- acético y sus análogos sintéticos ácido indol-3-butirico, ácido indol-3-propiónico, L-triptofano y ácido p-clorofenoxiacético inhiben la insulina *in vitro* y son hipoglucemiantes *in vivo* en ratas normales (183). El alcaloide hipoglucemiante trigonelina aislado de la *Trigonella foenum-graecum* es inhibidor del crecimiento. El ácido salicílico es inhibidor del crecimiento en las plantas y es un agente hipoglucemiante, estas sustancias que

regulan el metabolismo en las plantas pueden ser también reguladores del metabolismo en animales (184).

## Estudio de las plantas con actividad hipoglucemiante

Las técnicas usadas para el estudio de la actividad hipoglucemiante *in vivo* se basan en el uso de animales (rata, ratón y conejo) normoglucémicos e hiperglucémicos. El desarrollo de diabetes mellitus en animales de experimentación (insulino-dependientes) depende principalmente de las células-T ya que se ha demostrado que éstas causan insulinitis y posteriormente la destrucción selectiva de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans (185). Algunos compuestos usados para este fin son: aloxana, estreptozotocina, ácido úrico, ácido dehidroascórbico, algunas quinolonas, 2,4-dinitrofenol, diazoxida, algunas sales de magnesio y hormonas tales como epinefrina, glucagón, corticotropina, somatotropina y extracto de la pituitaria. También se utilizan animales hiperglucémicos genéticamente obesos tales como ratas Zucker fa/fa (186), ratón amarillo KK (138), diabetes espontánea en ratón de cepa C57BL/Ksj-db/db (187).

Los modelos más populares para inducir diabetes a los roedores es el tratamiento con aloxana o estreptozotocina. El mecanismo de acción la aloxana y derivados de la pirimidina fue estudiado por Lenzen y Panten en 1988 (188). La aloxana es un compuesto que tiene selectividad por las células  $\beta$  del páncreas a través de la inhibición de la glucocinasa, esto hace que sea un buen modelo para el estudio de la diabetes mellitus, aunque también presenta algunos problemas como la imposibilidad en establecer la relación entre la dosis de aloxana y concentración efectiva en el páncreas para desarrollar la diabetes; es difícil tener la concentración adecuada de aloxana que inhiba a las células  $\beta$  sin producir necrosis (189).

La estreptozotocina es también conocida como estreptozocina y es un compuesto de origen natural aislado de *Streptomyces Achromogenes*, este compuesto causa degeneración de las células  $\beta$  pancreáticas. Esto puede ser debido a que la estreptozocina induce una alteración en la función mitocondrial del islote pancreático (190). Este modelo de inducción de diabetes por estreptozocina no representa la DMNID en humanos.

Numerosas técnicas *in vitro* han sido desarrolladas para determinar la variedad de mecanismos de acción de los agentes hipoglucemiantes descubiertos por medio de ensayos *in vivo*. Diferentes aspectos de la respuesta hipoglucémica son comúnmente estudiados *in vitro* : la liberación de insulina desde los islotes pancreáticos, la disponibilidad de insulina periférica, la utilización de glucosa y el efecto sobre las enzimas hepáticas. Las técnicas más utilizadas son las de Ricordi et al (191) para aislar los islotes pancreáticos de cerdos y humanos. El mecanismo de algunas sulfonilureas a nivel celular y subcelular se ha determinado empleando cultivo de células  $\beta$  (192). También el papel del hígado en la diabetes se ha estudiado en cultivos de hepatocitos de rata (193). Recientemente se han usado hepatomas humanos para estudiar los receptores de insulina (194). Hikino y colaboradores han determinado un gran número de mecanismos de agentes hipoglucemiantes aislados de plantas con una preparación de diferentes enzimas hepáticas (195). Finalmente los niveles de insulina se han determinado por la técnica de inmunoensayo (196) la cual fue remplazada por radioinmunoensayo que condujo al premio novel para su descubridor (197).

A los datos obtenidos en el estudio de las plantas que presentan alguna actividad biológica se les debe de realizar un análisis bioestadístico. Al calcular la variancia y la desviación estándar a partir de datos agrupados, se supone que todos los valores que caen dentro de un determinado intervalo de clase se localizan en el punto medio del intervalo (198). El uso generalizado de las computadoras ha tenido un tremendo impacto sobre la investigación de las ciencias de la salud en general y en el análisis bioestadístico en particular (199). La necesidad de llevar a cabo largos y tediosos cálculos aritméticos como parte del análisis estadístico de datos actualmente ha sido substituida por el uso de las computadoras ya que estas

pueden llevar a cabo rápidamente un gran número de cálculos más precisos que los que puedan efectuar los especialistas humanos. Las computadoras han permitido que los investigadores dediquen más tiempo al mejoramiento de la calidad de los datos y a la interpretación de los resultados, que el manejo y análisis de los datos obtenidos (200).

Existen programas de computadora que se utilizan ampliamente y que permiten llevar a cabo más procedimientos estadísticos descriptivos e inferenciales tales como: BMPD Biomedical Computer Programs (201), SPSS Statistical Package for the Social Sciences (202), the IMSL Library (203), Minitab (204) y el SAS (205). Dixon y Jennrich escribieron un artículo (206) donde describen 38 paquetes de programas estadísticos distintos que pueden analizar los datos obtenidos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La diabetes mellitus es una enfermedad que representa un serio problema de salud pública. La diabetes en 1995 como causa de muerte ocupó en México el cuarto lugar después de las enfermedades vasculares, oncológicas y muertes violentas. El número de enfermos diabéticos se encuentra entre el 3 y el 6% a nivel mundial (93). Desafortunadamente el índice de mortalidad a causa de esta enfermedad sigue en aumento. El tratamiento (dieta, biguanidas, sulfonilureas e insulina) no ha resultado completamente exitoso, por lo que actualmente existe una fuerte necesidad de encontrar nuevos medios que ayuden en forma satisfactoria al control de esta enfermedad.

## OBJETIVO PRINCIPAL

Aislar compuestos con actividad hipoglucemiante de algunas plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Probar la actividad hipoglucemiante de las plantas *Salpianthus arenarius*, *Verbecina persicifolia*, *Agarista mexicana* y *Acrocomia mexicana* en ratones normales y diabéticos
- 2.- Aislar y purificar los principios activos hipoglucemiantes presentes en mínimo dos de las siguientes plantas: *Agarista mexicana*, *Salpianthus arenarius*, *Verbecina persicifolia* y *Acrocomia mexicana*.
- 3.- Determinar la estructura química de los compuestos aislados (mínimo dos).
- 4.- Probar la actividad hipoglucemiante de los principios activos aislados en ratones normales, en ratones y ratas con diabetes mellitus experimental.

## **HIPOTESIS**

Las plantas *Agarista mexicana*,, *Salpianthus arenarius*, *Verbecina percisifolia* y *Acrocomia mexicana* utilizadas en la medicina tradicional y folklórica en el tratamiento de la diabetes, contienen cuando menos un principio activo hipoglucemiante, el cual puede ser aislado por medio de técnicas de separación y purificación y puede ser identificado por medio de métodos químicos y espectroscópicos.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL BIOLOGICO

#### Colecta de las plantas

La planta *Verbesina persicifolia* se colectó en los alrededores de Poza Rica, Ver., *Salpianthus arenarius* en la Huacana Estado de Michoacán. En la cercanía de Taxco, Gro. se colectó la *Agarista mexicana*. Estas plantas fueron identificadas por la Biol. Edith López Villafranco del departamento de botánica de la ENEP-Iztacala UNAM. Un espécimen de cada una de ellas se encuentra depositado en el herbario de esta institución . (registro 4256, 2765 y 5231 respectivamente). En los alrededores de Tampico, Tamps. se colectó la *Acrocomia mexicana*, y la *Salpianthus arenarius* en los alrededores de Zirándaro, Estado de Guerrero. Ambas especies fueron identificadas por la M. en C. Aurora Chimal H. del departamento de El Hombre y su ambiente de la UAM-Xochimilco; un ejemplar de cada una de estas plantas se encuentra depositado en el herbario de esta institución. (registro S.P.42, S.P. 250 respectivamente).

## DESCRIPCION BOTANICA

La descripción botánica de las plantas estudiadas (*Acrocomia mexicana*, *Salpianthus arenarius*, *Verbesina percisifolia* y *Agarista mexicana*) es la siguiente:

*Acrocomia mexicana*: Familia Palmaceae, Nombre vulgar Coyol. La *A. mexicana* es una palma de 10 a 20 metros de altura, con el tronco cubierto de espinas hacia la parte superior, frecuentemente con hojas muertas colgantes. Sus hojas pinado-compuestas, bastante recorvadas, con el pecíolo y el raquis con espinas aplanadas, negras, hasta 11 cm de largo, muy agudas, cubiertas de pelos ferruginosos en la base, hojas hasta de 3 metros de largo y 1.5 cm de ancho, con una nervadura central prominente; verde oscuro y opaco en el haz, verde pálido en el envés, pecíolo y raquis cóncavos en la parte más gruesa en el haz y cubiertos por abundantes pelos de hasta 5 mm de largo, duros, erectos, agudos y ferruginosos. Sus frutos son esféricos de unos 5.5 cm con un mesocarpio leñoso muy duro, con almendra oleaginosa (207), ( Figura 1).

Forma parte de la vegetación secundaria derivada de las selvas medianas perennifolias, subperennifolias y subcaducifolias, ocasionalmente crece en el bosque caducifolio con suelos derivados de materiales ígneos o calizos; desde el nivel del mar hasta los 800 metros de altitud. El coyol crece en la vertiente del golfo desde el sudeste de San Luis Potosí, el norte de Puebla y Veracruz hasta el norte de Chiapas y Tabasco, en la vertiente del pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas (208).

Usos medicinales del coyol: Se ha reportado que la raíz del coyol se usa en la medicina tradicional mexicana para controlar la diabetes (209). Estudios farmacológicos realizados por Pérez y colaboradores (210) con anterioridad han demostrado que el extracto metanólico de la raíz de esta palma disminuye los niveles de glucosa en sangre de ratones cepa CD-1 con diabetes inducida con aloxana.

*Salpianthus arenarius* H.B.K. G. Ortega: Familia Nyctaginaceae, de nombre común "Catarinilla" o "Catarinita". Es una planta herbácea o subarborescente de más o menos 5 metros, finamente vellosa, hojas alternadas, ovaladas con el ápice casi obtuso, base atenuada, la lámina de unos 4 cm; inflorescencias vellosas, paniculadas; flores morado-rosadas, tubulosas con los estambres salientes (211). La catarinilla crece en los estados de Guerrero, Chiapas y Michoacán (Figura 2).

Usos medicinales de la catarinilla : se usa en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de problemas nerviosos. En el Estado de Michoacán se emplean la hojas y la raíz como remedio para las picaduras de alacrán, tratamiento de problemas nerviosos y para controlar la diabetes (212).

Estudios realizados por Pérez y colaboradores (181,213) demostraron que el extracto metanólico de la raíz de esta planta disminuye los niveles de glucosa en sangre de ratones cepa CD-1 con diabetes y también a partir del extracto etanólico se aisló el compuesto 2-metoxi-5-hidroximetil ciclopentano-1,3,4-triol con propiedades parasimpaticomiméticas (214).

*Verbesina percisifolia* D.C. : Familia Compuestas, de nombre común: "Huichim." Es una planta que presenta cabezuelas heterógamas, con flores periféricas uniseriadas, liguladas de color amarillo pequeñas. Invólucro cortamente acompañado, de pocas series bráctiles, receptáculo convexo con pajitas que envuelven las flores. Vilano de dos cerdas persistentes caedizas. Hierbas perennes o arbustos con la hojas opuestas o alternas frecuentemente lobuladas (209). (Figura 3). El Huichim crece en los estados de Hidalgo, San Luís Potosí y Veracruz.

Usos medicinales: Se usan las hojas en el tratamiento de la diabetes en el Estado de Veracruz (209).

*Agarista mexicana* : Género Agarista, Especie mexicana, Familia Ericacea, de nombre común " Palo Santo". Es un arbolillo de 1 a 2.5 m, hojas elíptico-oblongas de 2 a 4 cm acuminadas,

serrulladas; flores rosadas colocadas en racimos; fruto en capsulita con el cáliz acrescente (215). El palo santo crece en los estados de Guerrero y Michoacán.

Usos Medicinales: Las hojas se emplean en el tratamiento de la diabetes en el Estado de Guerrero (215).

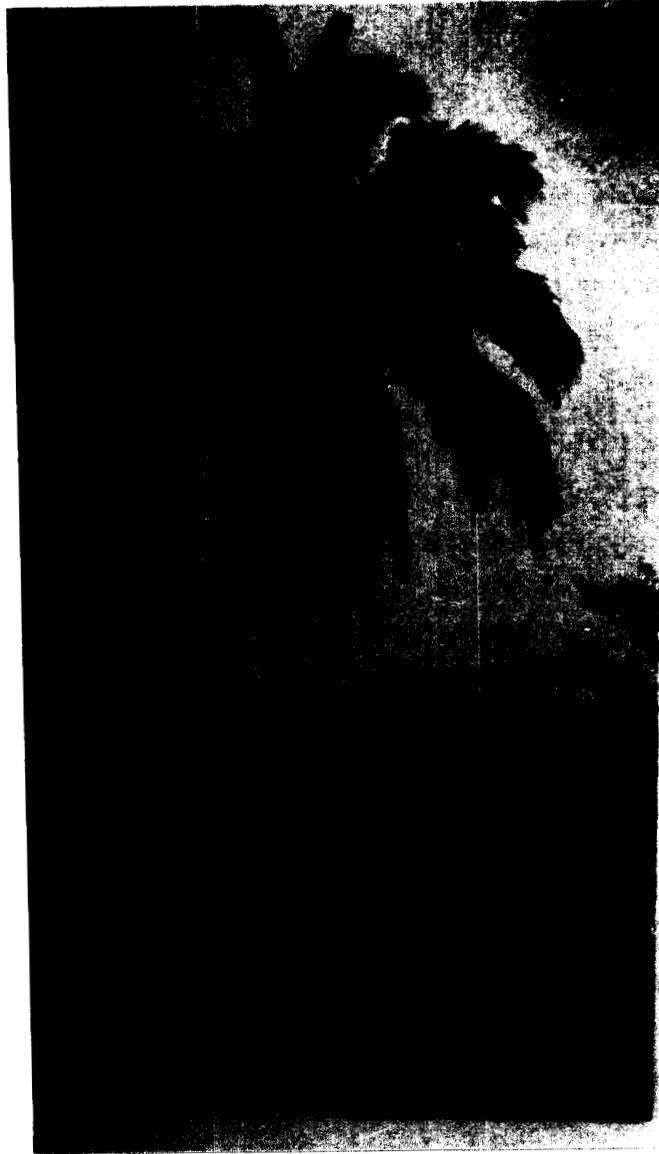


Figura. 1.- *Acrocomia mexicana*



Figura 2.- *Salpianthus arenarius*



Figura 3.- *Verbena percisifolia*



Figura 4.- *Agarista mexicana*

## Animales

Se utilizaron 800 ratones albinos (*Mus musculus*), cepa CD1, maduros sexualmente, de doce semanas de edad, en condiciones gonadales normales de intercelo, de ambos sexos con un peso promedio de  $35.0 \pm 5.0$  gramos para los machos y de  $30.0 \pm 5.0$  gramos para las hembras. También se usaron 150 ratas Wistar macho de peso promedio de  $155 \pm 5.0$  gramos maduros sexualmente, de diez semanas de edad, en condiciones gonadales normales de intercelo. Los animales sanos fueron proporcionados por el bioterio de la UAM-Xochimilco.

Los animales se mantuvieron en un cuarto cerrado y aislado bajo condiciones ambientales controladas de luz blanca por medio de cuatro lámparas de neón de 40 watts, de 1.20 metros cada una . Esta intensidad lumínica correspondió a 38 candelas/pie<sup>2</sup> la cual se midió con un fotómetro (marca Weston: Instruments mod: 756). Se mantuvieron ciclos de luz-obscuridad de 12-12 horas respectivamente, de acuerdo a lo propuesto por Hafez (216) . El encendido de la luz se produjo a las 7:00 A.M. y el apagado a las 19:00 P.M. (217).

La temperatura ambiental se controló por medio del cierre o abertura del sistema de aire acondicionado . Dicha temperatura fue de  $23 \pm 1.0$  °C y la humedad relativa fue de  $45 \pm 5.0$  % la cual se midió con un barómetro marca Penn. Los ratones utilizados para esta investigación se dividieron en 52 lotes de 8 animales cada uno. Las ratas se dividieron en 13 lotes de 8 animales cada uno. Se les dio comida de la marca Purina y agua *ad-libitum*.

## Preparación de los extractos

Antes de someter las plantas colectadas a la desecación fue necesario separarles la raíz, y las hojas en forma manual. Las hojas de *Agarista mexicana*, *Verbecina percisifolia* y las raíces de *Acrocomia mexicana* y *Salpianthus arenarius* se extendieron sobre las mesas del laboratorio evitando todo lo posible la acción directa de los rayos solares. Una vez terminada la desecación al aire libre (218) las hojas se molieron en un molino de bolas y las raíces se cortaron en trozos pequeños.

250 g de las plantas *Agarista mexicana* y *Verbecina percisifolia* se trataron con hexano a temperatura de reflujo durante 5 h con 1.5 litros. Los extractos de cloroformo y metanol se prepararon por el mismo procedimiento.

100 g de la raíz de *Acrocomia mexicana* se calentó a temperatura de reflujo con 300 ml de agua durante 2 h. Los extractos de cloroformo, metanol y hexano de esta planta se prepararon de manera similar al extracto acuoso.

En un matraz balón de 2 l se colocaron 200 g de la raíz seca de *Salpianthus arenarius* y 500 ml de disolvente (agua, metanol, cloroformo y hexano); la mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 4 h.

Después los extractos se filtraron y finalmente se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida obteniéndose en cada caso un residuo verde oscuro. Se preparó a partir de cada uno de los extractos una suspensión acuosa (200 mg/ml) los cuales fueron utilizados para determinar la actividad antidiabética en los animales de experimentación.

## Bioensayo para la actividad hipoglucemiante

El efecto hipoglucémico de los extractos obtenidos de las plantas: *Agarista mexicana* (hoja), *Verbecina persicifolia* (hojas), *Acrocomia mexicana* (raíz) y *Salpianthus arenarius* (raíz), se estudió en ratones cepa CD1 con diabetes. Los extractos que mostraron actividad hipoglucémica se probaron en ratones normoglucémicos también los compuestos aislados con actividad hipoglucemiante de las plantas: *Agarista mexicana* (hojas), *Salpianthus arenarius* (raíz), y *Acrocomia mexicana* (raíz), también fueron probados en los mismos modelos farmacológicos.

## Estudios en ratones hiperglucémicos

Se utilizaron ratones macho cepa CD1, a los cuales se inyectó una vez cada tercer día, hasta completar tres administraciones, una solución de aloxana (70 mg/kg de peso del animal) y se les dejó descansar una semana (219). Se determinó el nivel de glucosa en sangre empleando el micrométodo de *o*-toluidina (220). Los animales que presentaron glucosa sanguínea superior a 150 mg/100 ml se incluyeron en el grupo de animales diabéticos, en ratones normales en ayunas la concentración de glucosa en la sangre es de 80-110 mg/100 ml. Se usaron lotes de 8 animales cada uno a los cuales se les retiró el alimento 24 h antes del experimento, y se les proporcionó agua *ad-libitum*. Los suspensiones acuosa de los extractos y los compuestos obtenidos de las plantas en estudio se administraron por vía intraperitoneal a diferentes concentraciones. Al mismo tiempo, a los lotes control se les administró solución salina. El porcentaje de variación de glucemia se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de la variación de glucemia} = \frac{G_x - G_o}{G_o} \times 100$$

$G_o$  = Nivel inicial de glucemia

$G_x$  = Niveles de glucemia a las: 1.5, 3, 4.5, y 24 hr después de la administración

### Estudios en ratones normoglucémicos

La evaluación de la actividad hipoglucemiante también se llevó a cabo mediante la determinación de la variación de los niveles de glucosa sanguínea en ratones normales después de la administración de los extractos y de los compuestos aislados de las plantas bajo estudio por vía intraperitoneal (i.p.). Los animales se dejaron sin alimento 24 h antes del experimento con el agua *ad-libitum*. Muestras de sangre fueron extraídas de la vena caudal por medio de un pequeño corte a las 1.5, 3, 4.5 y 24 h después de la administración (221).

### Efecto sobre la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas

Se formaron 3 lotes de ratas Wistar diabéticas de 8 animales cada uno. Al grupo 1 se le administró solución salina (0.85%, 1 ml / 100 g) y al grupo 2 se le dieron los extractos y los compuestos obtenidos de las plantas en forma de suspensión acuosa por vía oral y el tercer

grupo recibió tolbutamida. 30 minutos después de la administración de las sustancias citadas, todos los grupos recibieron una dosis de glucosa (1g/ kg). Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a 1.2 y 4 h y se determinó el contenido de glucosa sanguínea en cada una de ellas (222).

### Estudios de dosis-respuesta

Los estudios de dosis-respuesta se llevaron a cabo sobre ratones cepa CD1 con diabetes inducida por aloxana, empleando para ello el método siguiente: Se midió una respuesta biológica gradual, a varias dosis y se registraron las respuestas y el porcentaje de efectos positivos de cada dosis. La potencia de los compuestos aislados de las plantas que se estudiaron, en esta investigación se compararon con una suspensión de tolbutamida a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal (223).

### Preparación del reactivo de o-toluidina.

En un matraz aforado de 500 ml se disuelven 1.5 g de tiourea, 60 ml de o-toluidina en 100 ml de ácido acético glacial. La solución se deja en reposo en un frasco de color ámbar a temperatura ambiente durante 24 h (220).

## Determinación de glucosa sanguínea

El micrométodo de o-toluidina es una modificación del reportado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (220). Efectuando un pequeño corte en la cola del ratón se tomó una muestra de sangre con un capilar heparinizado, el cual se selló y centrifugó durante 10 minutos a 400 rpm; enseguida se cortó en la sección donde se separa el plasma de los eritrocitos, se tomaron con una pipeta para glóbulos blancos 10  $\mu$ l de plasma y se colocaron en un tubo de ensayo de 10 ml con 1 ml de reactivo de o-toluidina. La mezcla se calentó en baño María durante 10 minutos. Al finalizar este tiempo se enfriaron en un baño de hielo, también durante 10 minutos. A la solución obtenida se le determinó su absorbancia en UV/VIS a 625 nm (224).

## Curva estándar de glucosa

Se prepararon soluciones de glucosa a las siguientes concentraciones: 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 mg/100 ml con ácido benzoico al 2% como preservativo. Las soluciones se trataron con el reactivo de o-toluidina de una manera similar a las muestras sanguíneas.

## Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en el estudio farmacológico realizado sobre la actividad hipoglucemiante de las plantas *Salpianthus arenarius*, *Acrocomia mexicana*, *Agarista mexicana* y *Verbecina percisifolia* se determinó el análisis de variancia a un nivel de confianza de 95% y cuando fue necesario se compararon las medias aplicando la prueba de Tukey, empleando el programa para computadora "Microcal Origen".

## Potencia relativa

La potencia relativa es la cantidad de fármaco (U) que se necesita para producir un efecto específico cuando este se compara con la actividad de otro fármaco empleado como estándar (S). Si la potencia relativa es constante en cada dosis probada se obtendrán gráficas lineales del log dosis-respuesta las cuales generalmente son paralelas. La potencia relativa se determina a partir de la distancia horizontal d entre las líneas obtenidas (225). Para determinar la potencia relativa de la coyolosa, se emplearon dosis de 5, 10, 50 mg/kg, para el saliriol y agaratina se utilizaron dosis de 25, 50 y 100 mg/kg en cambio para la tolbutamida se usaron dosis de 20, 45 y 90 mg/kg. La potencia relativa se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$d = \log (\text{dosis})_u - \log (\text{dosis})_s$$

$$d = \log \frac{(\text{dosis})_u}{(\text{dosis})_s}$$

$$\text{Potencia relativa} = \frac{(\text{dosis})_u}{(\text{dosis})_s} = \text{antilog } d$$

Aislamiento del compuesto hipoglucemiante de la raíz de *Acrocomia mexicana*

5 kg de la raíz seca y cortada en trozos pequeños de la planta *Acrocomia mexicana* se extrajeron con 14 litros de hexano y 14 litros de MeOH consecutivamente. El extracto de MeOH se concentró a presión reducida produciendo un líquido viscoso (160 g), el cual se sometió a una separación cromatográfica en columna con sílica gel (malla 230-400), como eluyente se empleó CHCl<sub>3</sub>- MeOH 9:1, v/v. Se colectaron fracciones de 20 ml cada una, aquéllas que mostraron patrones idénticos por análisis en cromatografía en capa fina ( sílica gel 60) usando como eluyente CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1 y 1:1 fueron combinadas. Finalmente, todas las

fracciones obtenidas fueron evaluadas en relación a su actividad biológica en animales hiperglucémicos. Las fracciones con mayor actividad hipoglucemiante se cristalizaron de MeOH obteniéndose un sólido cristalino blanco con un rendimiento de 0.25% y con un p.f. 170-172 °C.

### Aislamiento del compuesto hipoglucemiante de la raíz de *Salpianthus arenarius*

3 kg de la raíz seca y cortada en trozos pequeños de la planta *Salpianthus arenarius* se extrajeron con 8 litros de hexano y 8 litros de MeOH consecutivamente. El extracto de MeOH se concentró a presión reducida y se obtuvo un líquido viscoso (140g), el cual se cromatografió en columna, con sílica gel malla 230-400, como eluyente se empleo CHCl<sub>3</sub> - MeOH 1:1 v/v. Se colectaron fracciones de 20 ml cada una, aquéllas que mostraron patrones idénticos por análisis en cromatografía en capa fina ( sílica gel 60) usando como eluyente CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1 y 1:1 fueron combinadas y evaporadas a sequedad. Las fracciones con mayor actividad hipoglucemiante en ratones hiperglucémicos se cristalizaron de MeOH obteniéndose un sólido cristalino blanco con un rendimiento de 0.016% y con un p.f. de 185-187 °C.

### Aislamiento del compuesto hipoglucemiante de las hojas de *Agarista mexicana*

Las hojas (5 kg) secas y molidas se sometieron a temperatura de reflujo durante 7 horas con CHCl<sub>3</sub> para la primera extracción y 5 horas para la segunda. Los extractos se combinaron y concentraron a presión reducida obteniéndose 180 g de un líquido viscoso de color verde oscuro, el cual fue cromatografiado en columna con sílica gel (malla 230-400),

se empleó como eluente MeOH - CHCl<sub>3</sub> (1:9). Se colectaron fracciones de 20 ml cada una y aquéllas que mostraron patrones idénticos por análisis en cromatografía en capa fina ( sílica gel 60) usando: CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1, 1:1 y CHCl<sub>3</sub>-éter de petróleo, 9:3 v/v; así como benceno cloroformo 1:1 se reunieron. Finalmente las fracciones obtenidas, fueron evaluadas en relación a su actividad biológica.

Posteriormente las fracciones con mayor actividad farmacológica fueron cristalizadas de MeOH produciendo un sólido amorfo de color blanco. La pureza de este se determinó por medio de cromatografía de gases indicando que se trata de una mezcla de cinco compuestos por lo que se procedió a cromatografiar nuevamente, en columna empacada con sílica gel y como eluentes fueron usados CHCl<sub>3</sub>-éter etílico 1:1 y CHCl<sub>3</sub>-éter de petróleo 9: 3 v/v consecutivamente. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento de 0.0001% y con un p.f. de 60-61 °C. Su pureza fue determinada por medio de cromatografía en capa fina encontrándose en todos los casos una sola mancha.

## Elucidación de las estructuras de los compuestos hipoglucemiantes aislados.

### Procedimientos generales:

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato para punto de fusión Fisher-Johns calibrado. Los espectros infrarrojos fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT 1600 usando pastillas de KBr. Espectrofotómetro UV/Vis Pye Unicam SP 1800. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN se determinaron en un instrumento Jeol GX-300 y Jeol GSX-270 (CINVESTAV-IPN) usando TMS como referencia interna; Los desplazamientos químicos se reportaron en valores de δ (ppm). Los espectros de masas se determinaron, a 70 eV en un aparato Jeol JCMATE.

## Derivados químicos de los compuestos aislados

### Acetilación de la Coyolosa

Una solución de 100 mg de “coyolosa” fue acetilada con anhídrido acético (3.5 ml) en un mililitro de piridina a temperatura ambiente, en reposo durante 72 hrs. Posteriormente el producto fue cromatografiado en sílica gel con Acetato de etilo-Cloroformo 1:6 v/v. El acetato de la coyolosa presentó un punto de fusión de 132-134 °C.

### Acetilación del saliriol

Se realizó de manera similar a la acetilación de la coyolosa, el acetato del saliriol presentó un punto de fusión de 80-82 °C.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

El efecto hipoglucémico del extracto metanólico de la *Acrocomia mexicana* en ratones diabéticos se presenta en la Figura 5 y Tabla 1. Con la administración de 200 mg/kg del extracto metanólico de *Acrocomia mexicana* la máxima actividad hipoglucemiante (44.6% de reducción) se observó después de 4.5 h de la administración. La mínima actividad se observó con la administración de 133 mg/kg (23.7% de reducción) después de 4.5 h de la administración. Este extracto presentó una respuesta dosis-dependiente y el efecto persistió por un periodo menor a las 24 h. Los extractos clorofórmico (Figura 6, Tabla 1) y hexánico (Figura 7, Tabla 1) de la planta *Acrocomia mexicana* no presentaron actividad hipoglucemiante.

El efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de la raíz de *Salpianthus arenarius* en ratones diabéticos se presenta en la Figura 8 (Tabla 2). La administración de 200 mg/kg del extracto acuoso (Figura 9, Tabla 2) de *Salpianthus arenarius* redujo la glucemia en 40.2% a las 3h y 57.4% a las 4.5 h. En el estudio con el extracto de metanol se observó que después de 3 h de la administración hay una disminución de los niveles de glucosa de 24% para la dosis de 200 mg/kg, y de 31.3% para la dosis de 400 mg/kg. A las 4.5 h, la disminución de la concentración de glucosa sanguínea fue de 42.9% y 47.9% y para las dosis de 200 y 400 mg/kg, respectivamente. El efecto persistió por un periodo superior a las 24 h. Los extractos hexánico y clorofórmico (Figura 9) de *Salpianthus arenarius* no presentaron actividad hipoglucemiante.

Los extractos hexánico y metanólico de la *Agarista mexicana* y *Verbecina percisifolia* no presentaron actividad hipoglucemiante. Los resultados se presentan en las figuras 10 y 12 (Tabla 3-4) respectivamente.

Los extractos clorofórmicos de *Agarista mexicana* y *Verbecina percisifolia* presentaron actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos comparada con el grupo control, también el efecto de estos extractos se comparó con el efecto producido por la tolbutamida. Cuando se administraron dosis de 50 a 150 mg/kg/oral de los extractos de *Agarista mexicana* y *Verbecina percisifolia* se obtuvo una respuesta dosis-dependiente, los resultados se presentan en la Figuras 11 y 13 (Tabla 3-4). Con el extracto de *Agarista mexicana* la máxima actividad hipoglucemiante (28.1% de reducción) se observó después de 3 h de la administración pero la concentración de glucosa sanguínea permanece dentro de las 24 h. lo cual indica que el efecto de la *Agarista mexicana* es de efecto similar al de la tolbutamida. Con el extracto clorofórmico de *Verbecina percisifolia* el efecto máximo (40.8% reducción) se observó 4.5 h después de la administración del extracto, este efecto persistió aún a las 24 h lo cual indica que la actividad hipoglucemiante de esta planta es de efecto similar al de la tolbutamida .

La actividad hipoglucemiante de los extractos clorofórmicos de las plantas *Agarista mexicana* y *Verbecina percisifolia* a dosis de 150 mg /kg en ratones normoglucémicos se presentan en la Figura 14 (Tabla 5). Con esta dosis el extracto de *Agarista mexicana* produce la máxima actividad antidiabética a las 3 h después de la administración (21.6% de reducción) pero la concentración de glucosa se incrementa dentro de las 24 h, lo cual indica que el efecto de la *Agarista mexicana* es de corta duración. Con el extracto de *Verbecina percisifolia* se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) a las 1.5, 3 y 4.5 h después de la administración, este efecto fue más pronunciado a las 4.5 h (28% de reducción). Los niveles de glucosa sanguínea regresan a los valores iniciales a las 24 h.

El efecto de la administración de los extractos metanólicos de *S. arenarius* y *Acrocomia mexicana* en ratones normoglucémicos se presenta en la figura 15 (Tabla 6). Cuando se administraron dosis de 100 y 150 mg/kg de los extractos de *S. arenarius* y *Acrocomia mexicana* se observó que en ambas plantas el máximo efecto hipoglucemiante se presentó a las

4.5 h después de la administración con una disminución de los niveles de glucosa sanguínea de -30.2 % y -32.3% respectivamente

Los resultados del efecto de los extractos de cloroformo de *Acrocomia mexicana* y *Verbecina percisifolia* sobre la tolerancia de glucosa se presentan en la Figura 15 (Tabla 7) . En el grupo control, animales que recibieron una solución salina después de la administración de una dosis de glucosa (1g/kg), se produjo que la glucemia se incrementara significativamente (+9.21%) después de 1 h de la administración de la glucosa. El nivel de glucosa sanguínea permaneció alto en las próximas 3 h. La administración previa de los extractos citados y de tolbutamida en dosis de 50 mg/kg revierten significativamente el incremento de glucemia indicando con ello un cambio de patrón a la tolerancia de glucosa.

Los resultados muestran que la solución salina usada como control en estos experimentos no produce cambios significativos en los niveles de glucosa sanguínea en animales normales e hiperglucémicos (Figuras 5-19). Los resultados obtenidos en la prueba de la tolerancia a la glucosa mostraron que en las ratas diabéticas no tratadas el aumento de glucosa sanguínea no fue muy alto después de la administración de 1 g/kg de glucosa, posiblemente se debió a la dosis de glucosa utilizada en este ensayo.

Los resultados de las fracciones obtenidas por cromatografía durante el aislamiento de los principios activos de las plantas *Acrocomia mexicana*, *Salpianthus arenarius* y *Agarista mexicana* que presentaron actividad hipoglucemiante se presentan en las Figuras 17, 18 y 19 (Tabla 8) respectivamente.

No se aisló el compuesto con actividad hipoglucemiante de la planta *Verbecina percisifolia* debido a que se perdió la actividad durante el proceso de aislamiento. En el segundo intento en el que se trató de aislar esta sustancia empleando diferentes técnicas

volvió a ocurrir lo mismo, razón por la cual se puede suponer que el compuesto responsable de este efecto sea muy inestable.

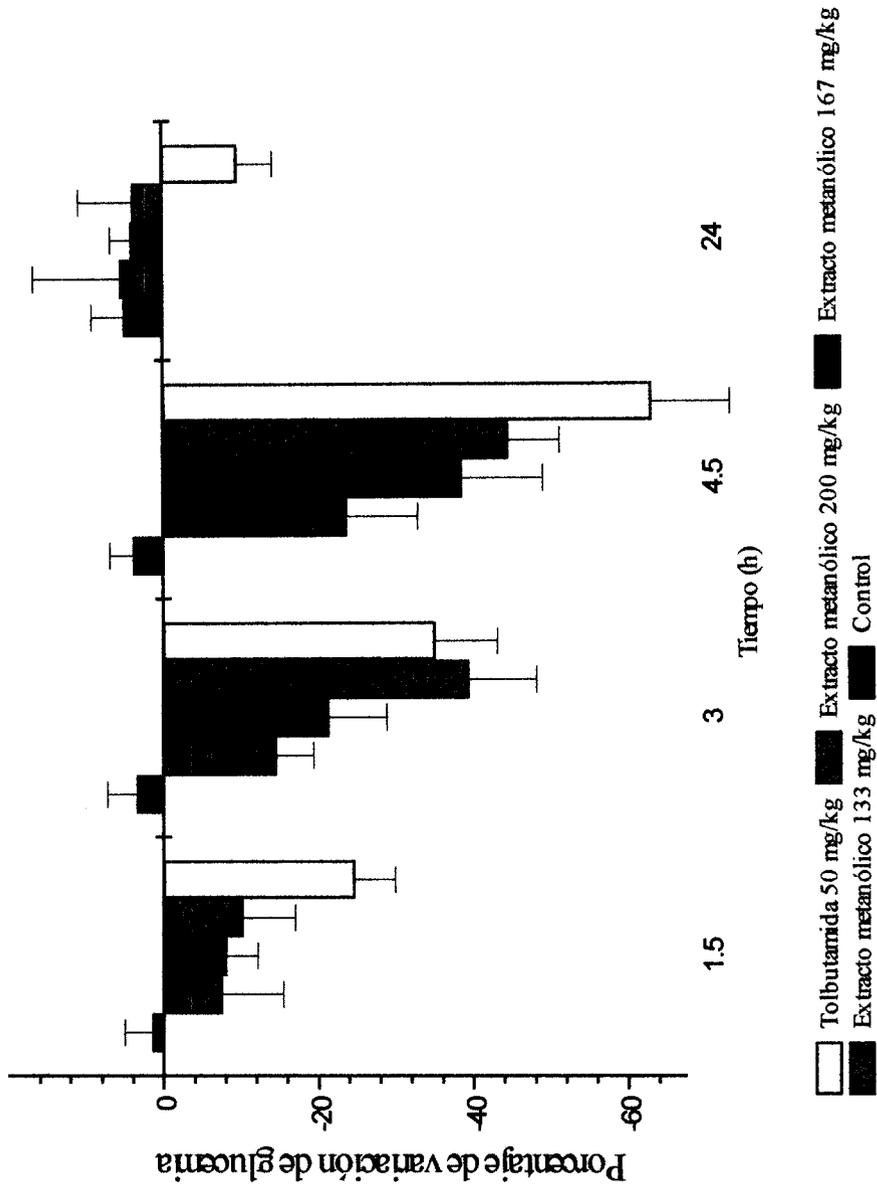


Figura 5.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto metanólico de *Acrocomia mexicana* en ratones hiperglicémicos inducidos con aloxana.

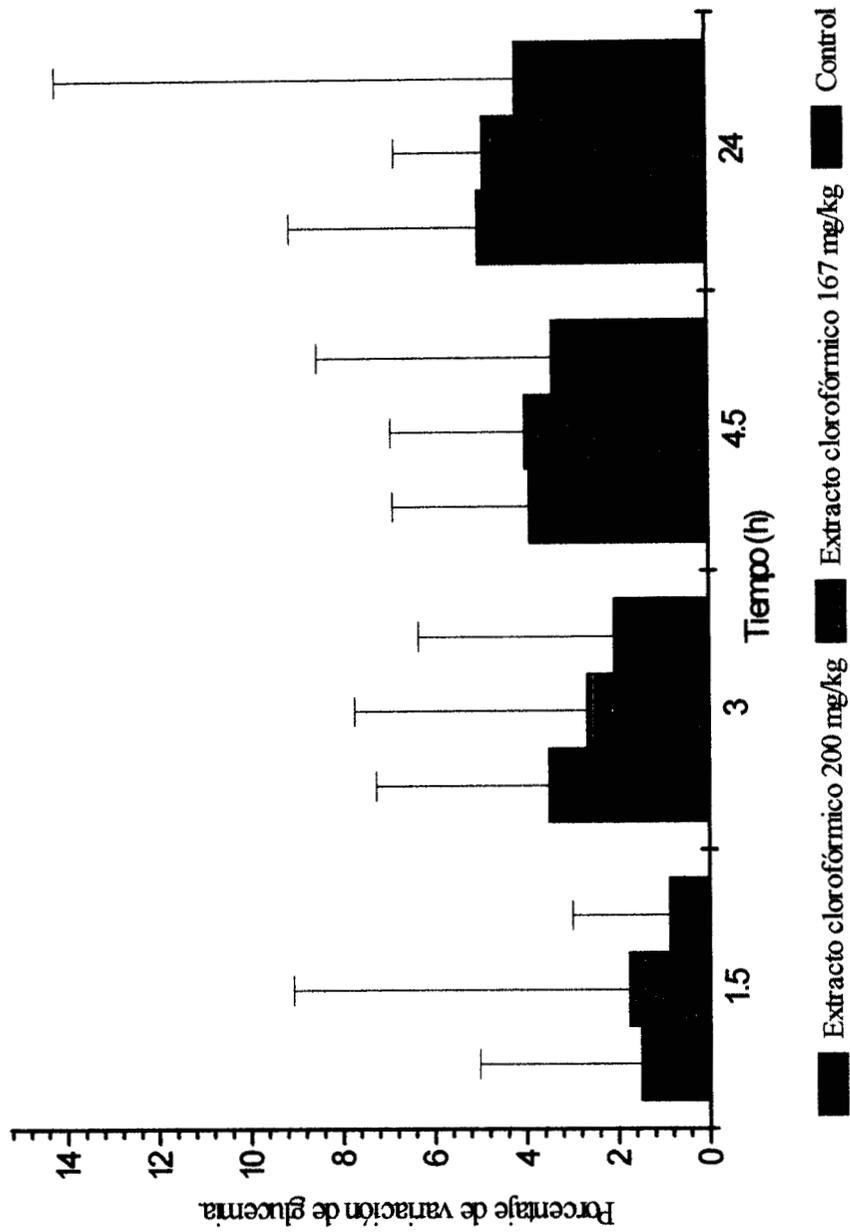


Figura 6.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto clorofórmico de *Acrocomia mexicana* en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxana.

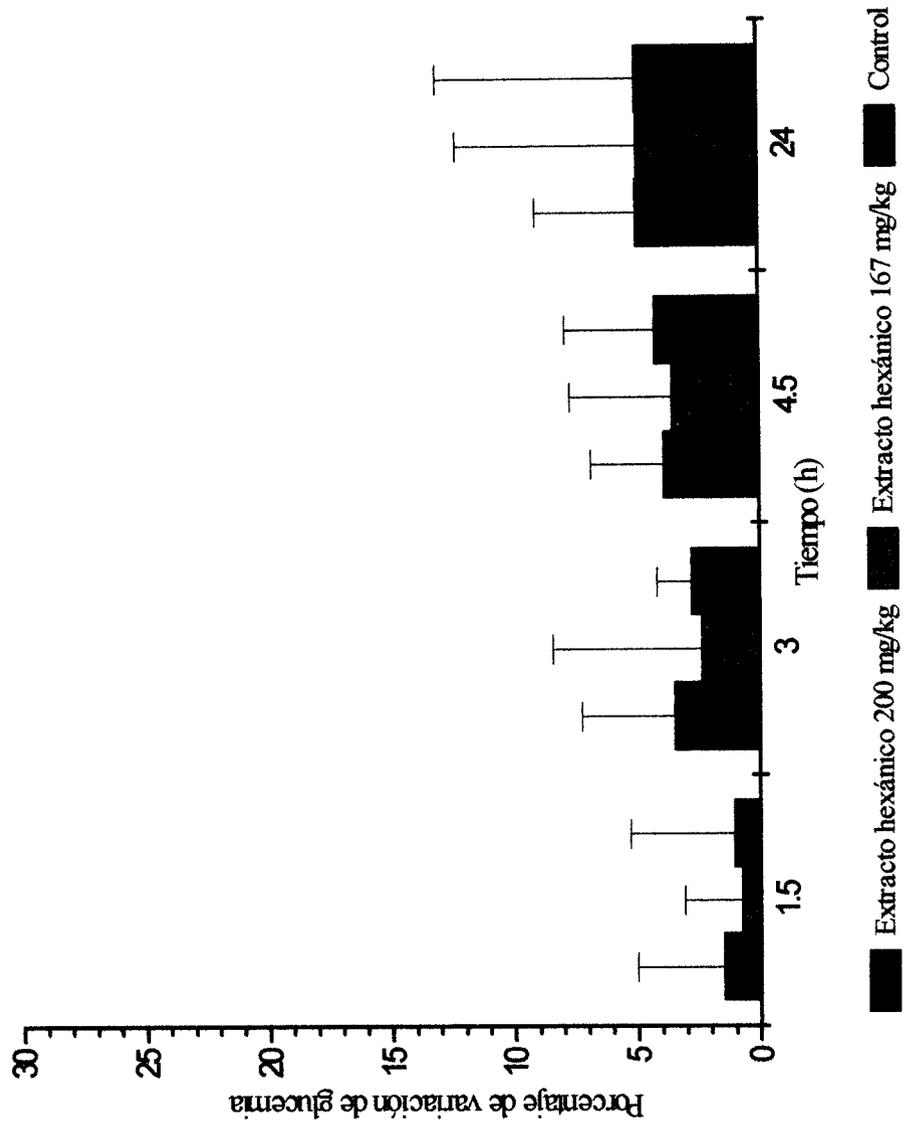


Figura 7.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto hexánico de *Acrocomia mexicana* en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxana.

Tabla 1.- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos metanólico, cloroformico y hexánico de *Acrocomia mexicana* en ratones hiperglucémicos inducida con aloxana.

Estudio	Dosis (mg/kg)	Glucemia Inicial (mg/100ml)	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)			
			1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas
	Control	252	255 ± 3.52	260± 3.76	259± 2.98	262 ± 4.10
	<i>Acrocomia mex</i> <sup>a</sup> 167	241	245± 7.32**	247±5.07*	250±2.91	252±1.93
	200	203	204±2.11	207±4.25	209±5.11	211±10.02*
	<i>Acrocomia mex</i> <sup>b</sup> . 133	260	240±7.89**	222 ±4.87	198±9.16**	274±11.2*
	167	240	220±3.98	188±7.45**	147±10.4**	249±12.6**
	200	270	242±6.73*	163±8.72**	149±6.56*	280±6.87*
	<i>Acrocomia mex</i> <sup>c</sup> 167	225	226±2.33	230±6.07*	233±4.16	236±7.34**
	200	207	209±4.22	212±1.38	215±3.66	217.09**

Extractos : cloroformo<sup>a</sup>, metanol<sup>b</sup>, hexano<sup>c</sup>. Los asteriscos se refieren a la significancia: \*p < 0.05, \*\*p < 0.1; 10 ratones por grupo de experimentación.,

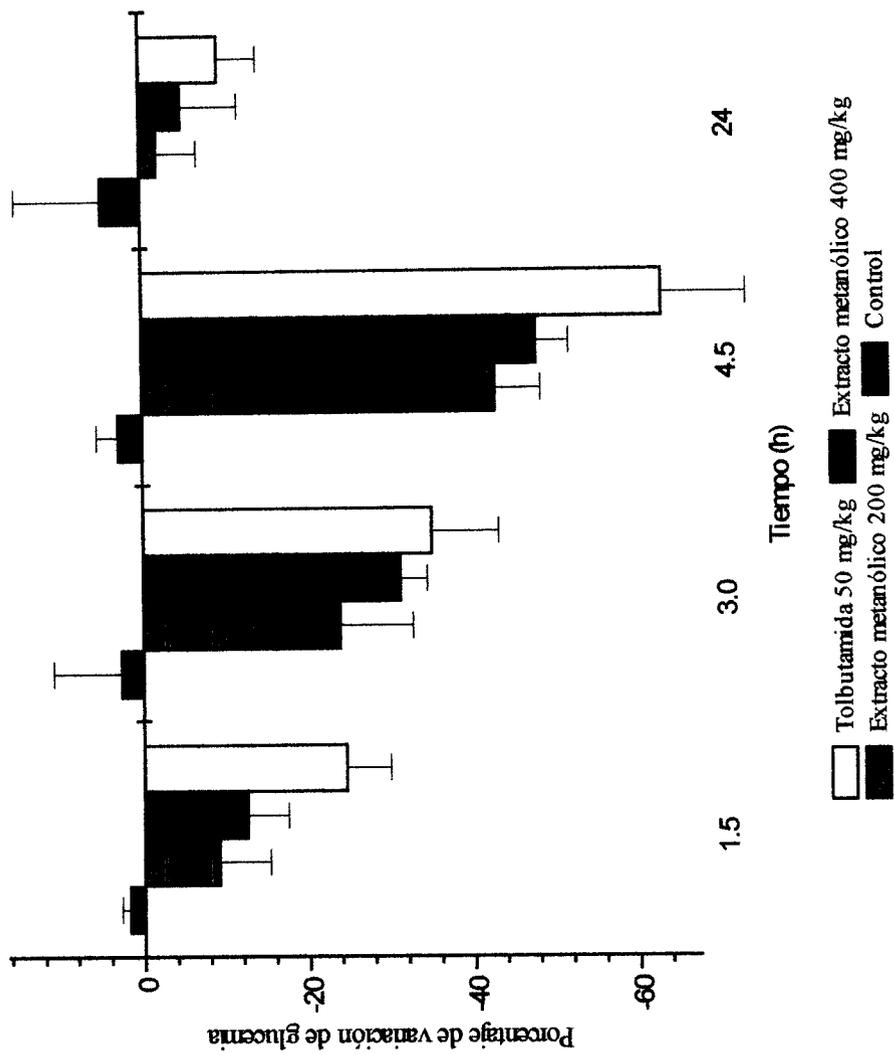


Figura 8.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto metanólico de *Salpicanthus arenarius* en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxana.

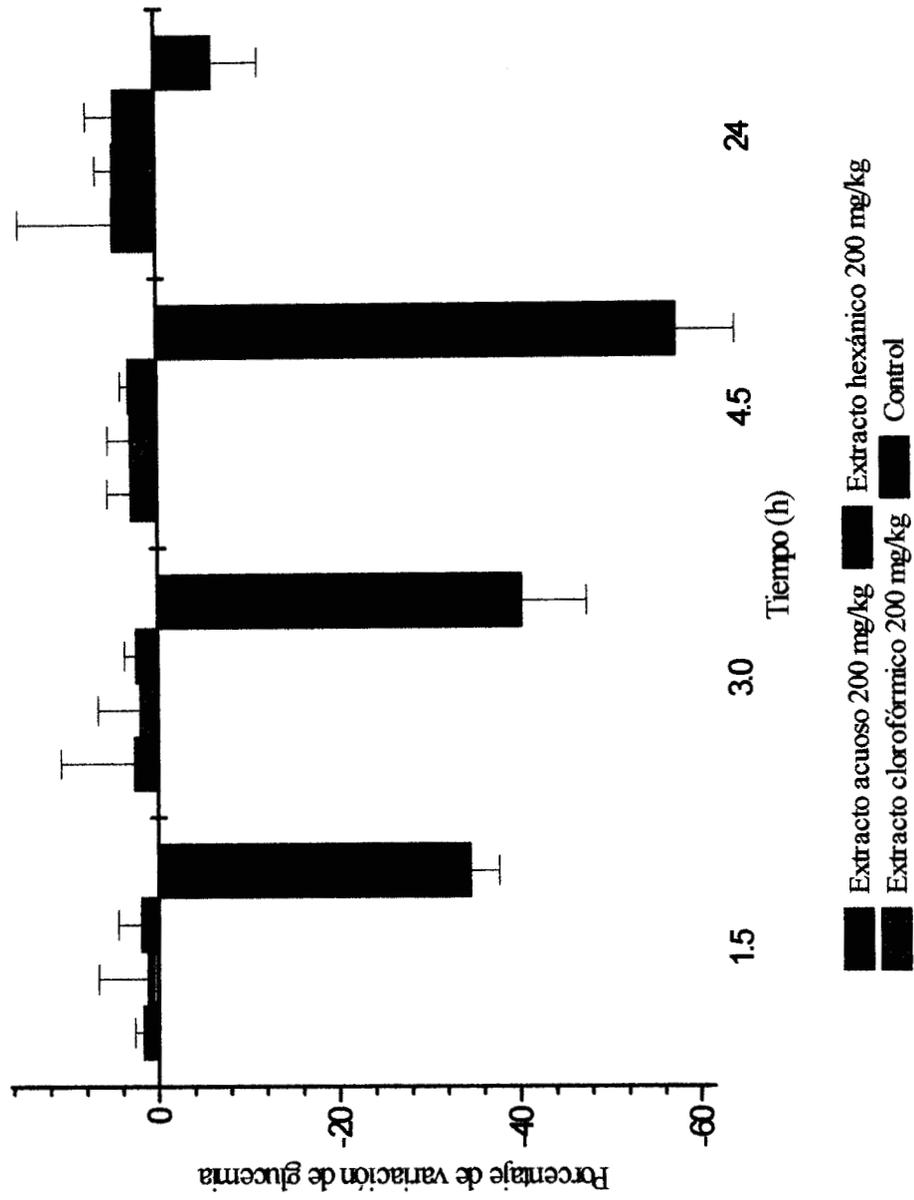


Figura 9.-Curso temporal del efecto de la administración de los extractos acuoso, hexánico y clorofórmico de *Salpianthus arenarius* en ratones hiperglucémicos inducido con aloxana.

Tabla 2.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto metanólico, clorofórmico y hexánico de *Salpianthus arenarius* en ratones hiperglucémicos inducida con aloxana.

Estudio	Glucemia Inicial (mg/100ml)	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)			
		1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas
Dosis (mg/kg)					
Control	256	260±0.89	262±8.10	263±2.56	268±10.35
<i>S. arenarius</i> <sup>a</sup> 200	228	230±5.40**	232±4.61	234±2.39	238±1.92*
<i>S. arenarius</i> <sup>b</sup> 200	249	226± 6.12 **	189 ±8.67**	142± 5.43	243 ± 4.74
400	231	201± 4.87	158± 3.12	120 ± 3.8	219 ± 6.84 *
<i>S. arenarius</i> <sup>c</sup> 200	219	223±2.4.8	224± 1.23*	226±0.9*	229±3.1
<i>arenarius</i> <sup>d</sup> 200	251	164± 3.16	150± 7.21**	106± 6.52	235 ± 5.12
Tolbutamida 50	238	179 ±5.21**	153 ±8.02**	87±10.1*	214 ±4.55

Extractos : cloroformo<sup>a</sup>, metanol<sup>b</sup>, hexano<sup>c</sup> y acuoso<sup>d</sup>. Los asteriscos se refieren a la significancia : \* p <0.05, \*\*p <0.1; 10 ratones por grupo de experimentación.

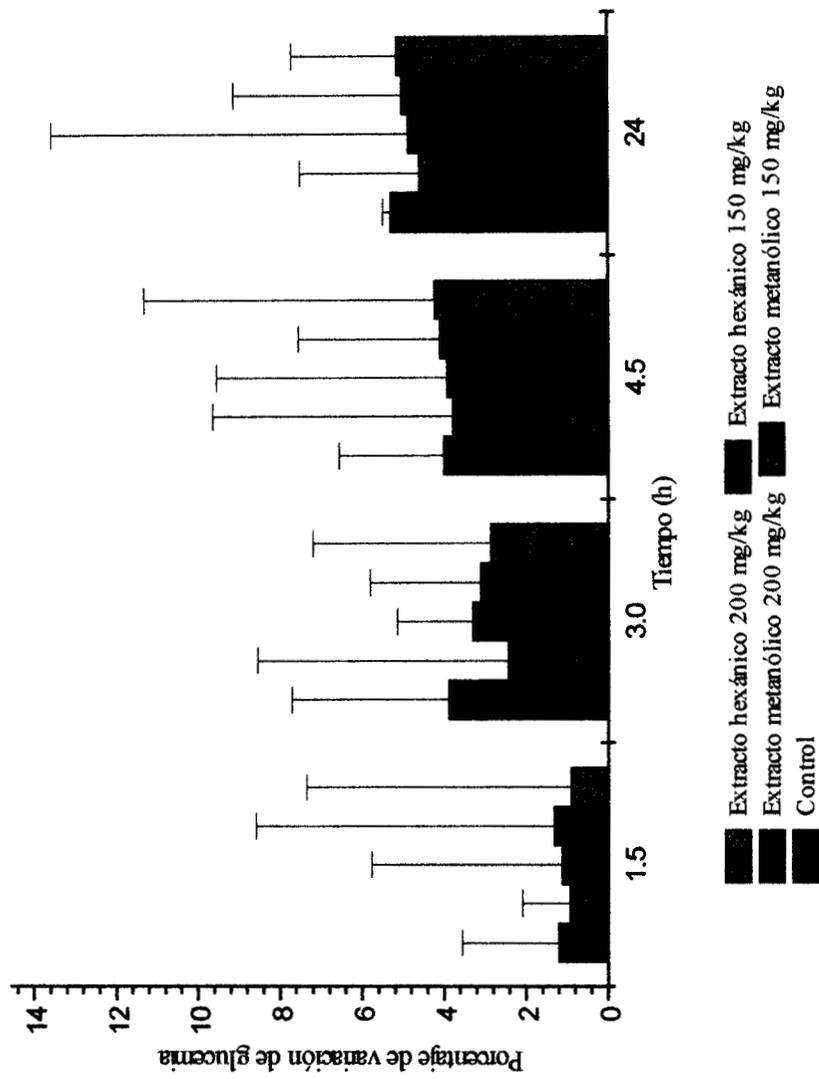


Figura 10.-Curso temporal del efecto de la administración de los extractos hexánico y metanólico de *Agarista mexicana* en ratones hiperglucémico inducidos con aloxana.

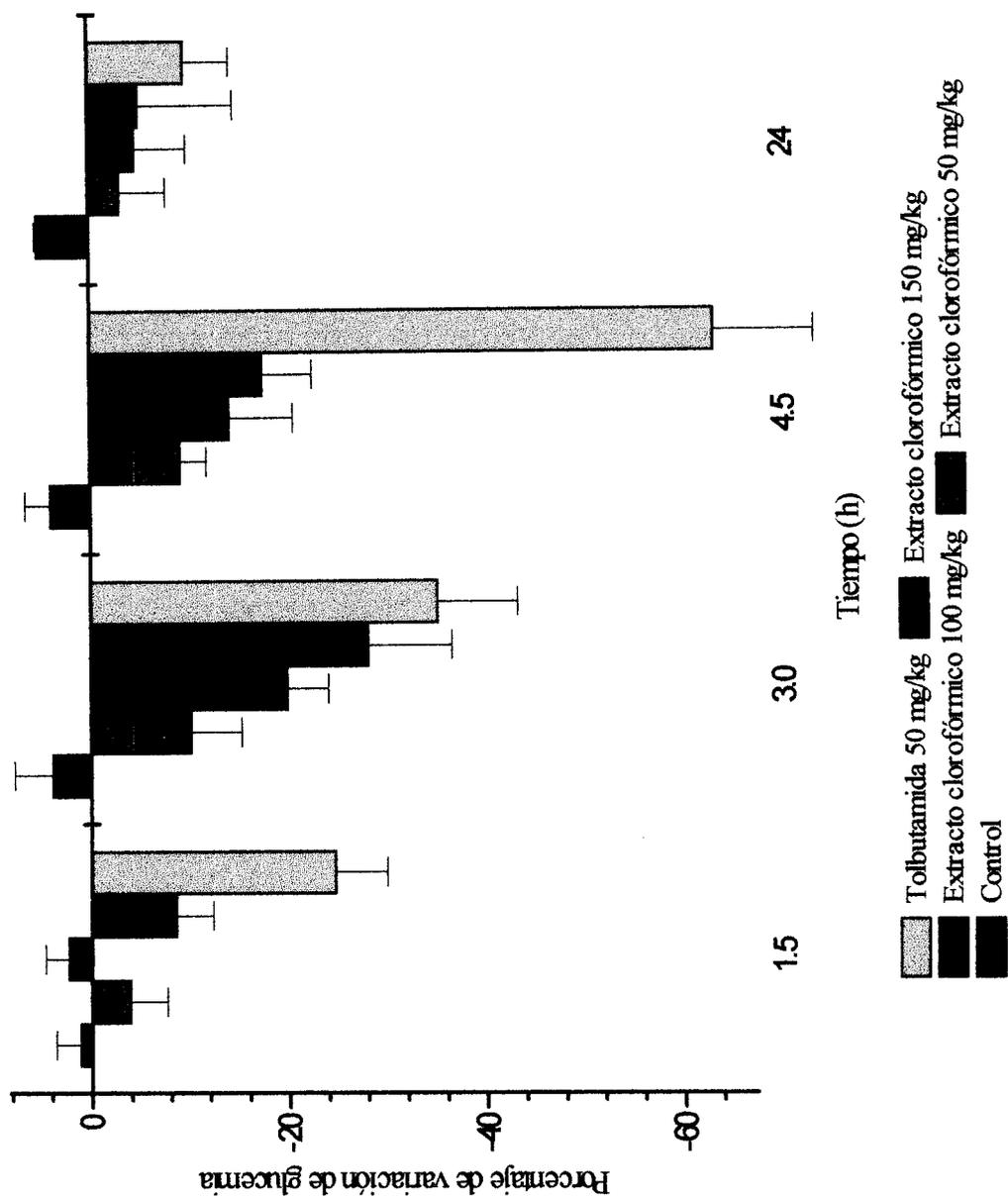


Figura 11.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto clorofórmico de *Agarista mexicana* en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxana.

Tabla 3. - Curso temporal del efecto de la administración del extracto metanólico, clorofórmico y hexánico de *Agarista mexicana* en ratones hiperglucémicos inducida con aloxana.

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Glucemia Inicial (mg/100ml)	1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas
Control	249	251 ± 2.35	258 ± 3.81	259 ± 2.54	262 ± 0.18
<i>Agarista mex</i> <sup>a</sup> 50	210	201 ± 3.71	190 ± 5.12*	188 ± 2.67	203 ± 4.57
100	232	213 ± 2.35	199 ± 4.15	185 ± 6.41**	221 ± 5.16*
150	242	221 ± 3.71	173 ± 8.41**	199 ± 4.93	229 ± 9.51**
<i>Agarista mex</i> <sup>b</sup> 150	212	213±1.16	217±6.12	219±5.86*	221±2.90
200	243	245±4.65	251±1.83	252±5.61*	254±8.69**
<i>Agarista mex</i> <sup>c</sup> 150	229	232±7.25**	236±2.68	238±3.44	240±4.11
200	199	200±6.45**	204±4.32	207±7.08**	209±2.56

Extractos : cloroformo<sup>a</sup>, metanol<sup>b</sup>, hexano<sup>c</sup>. Los asteriscos se refieren a la significancia : \*p < 0.05, \*\*p < 0.1; 10 ratones por grupo de experimentación.

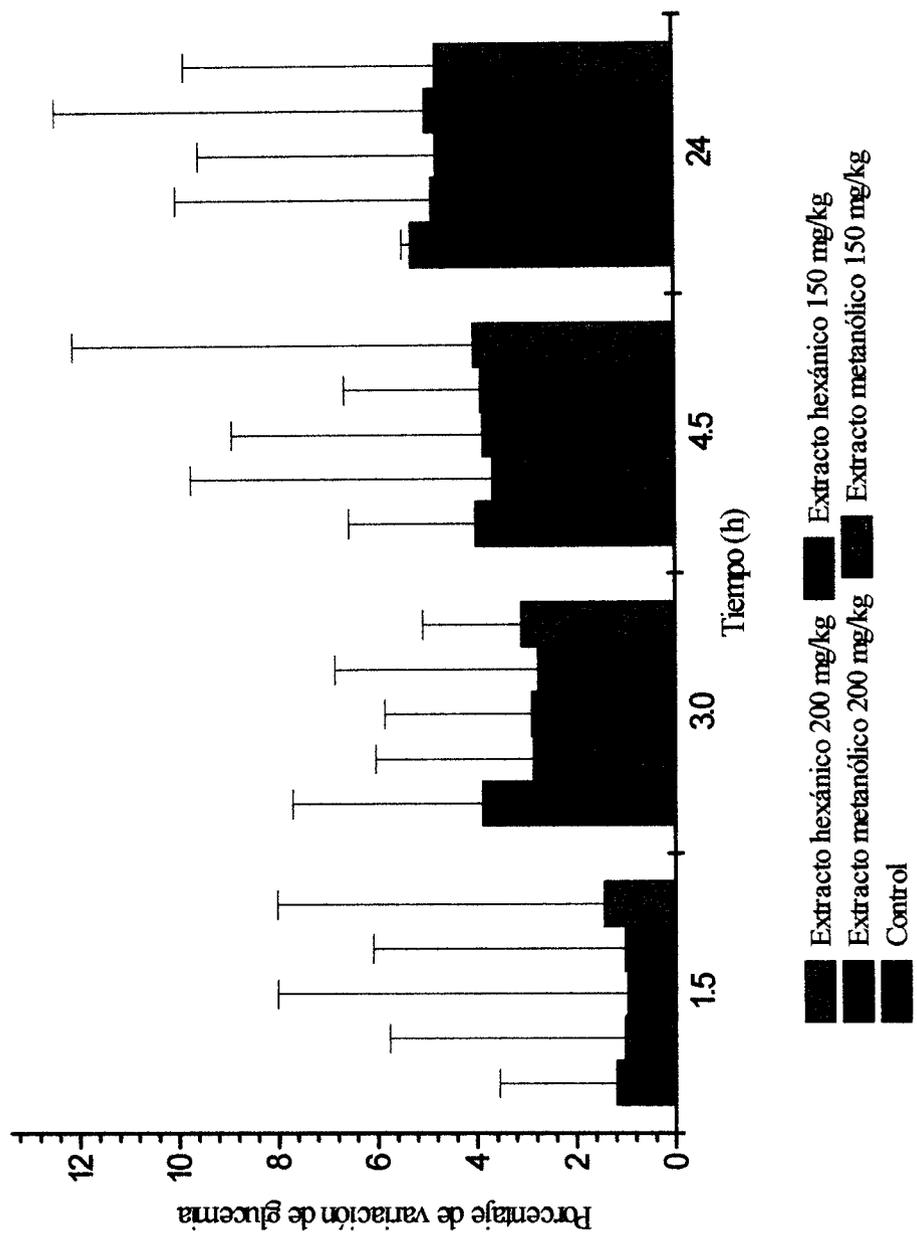


Figura 12.- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos hexánico y metanólico de *Verbena peruviana* en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxana.

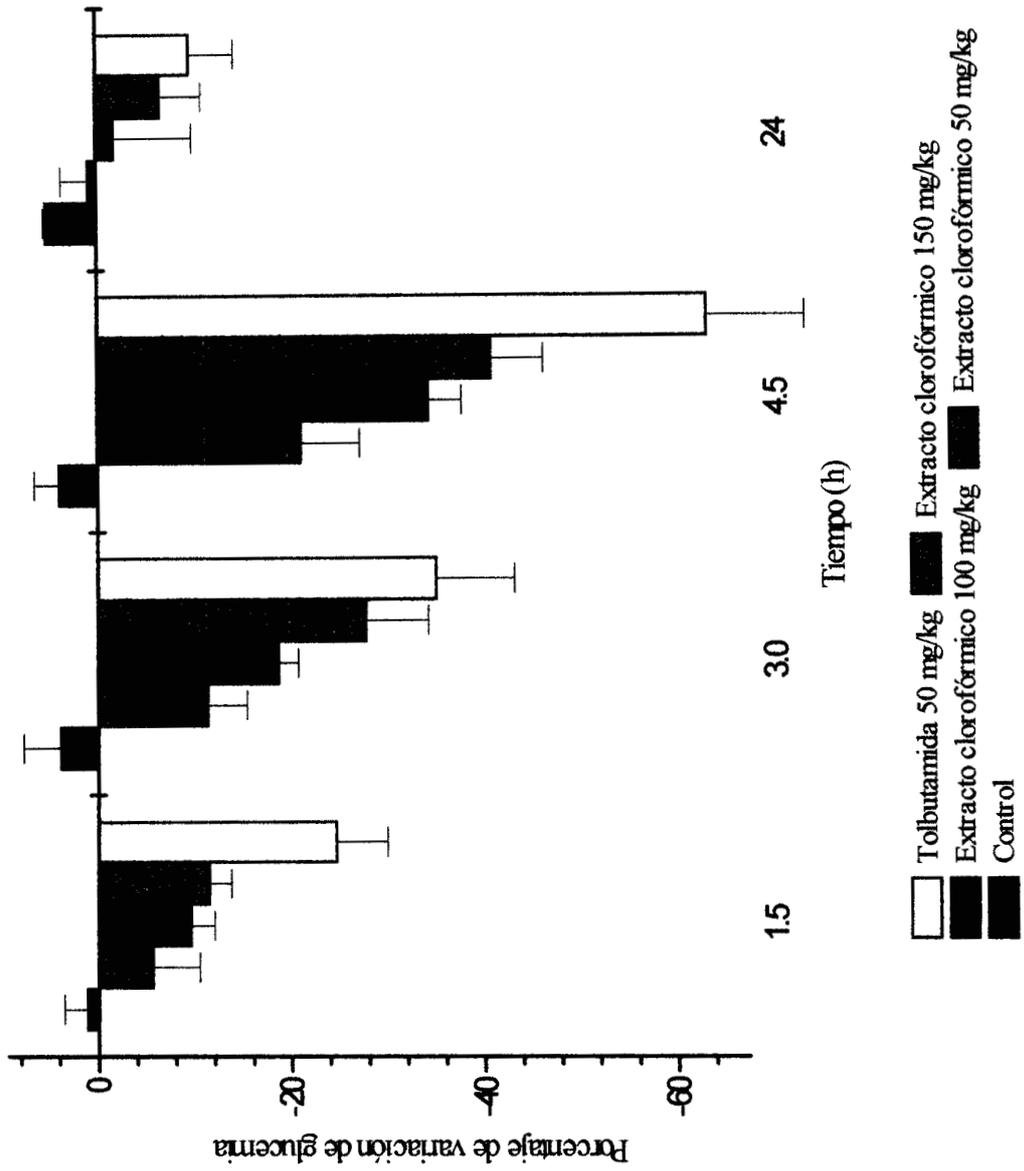


Figura 13.-Curso temporal del efecto de la administración del extracto clorofórmico de *Verbena perisifolia* en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxana.

Tabla 4.- Curso temporal del efecto de la administración del extracto metanólico, clorofórmico y hexánico *Verbequina percisifolia* en ratones hiperglucémicos

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Glucemia Inicial (mg/100ml)	1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas
Control	249	251±2.35	258±3.81	259±2.54	262±0.18
<i>V.percisifolia</i> <sup>a</sup> 50	197	185 ± 4.78**	174 ± 3.98	155± 6.01*	195 ± 2.76
100	267	178 ± 2.41	217 ± 2.01	175 ± 3.35	261 ± 7.96**
150	289	255 ± 2.21	208 ± 6.42*	171± 5.34*	269 ± 4.19**
<i>V.percisifolia</i> <sup>b</sup> 150	209	211±4.73**	214±3.17	216±6.07*	219±5.14
200	253	255±7.05*	260±2.96	262±5.05*	265±4.77**
<i>V.percisifolia</i> <sup>c</sup> 150	225	227±5.07*	231±4.08**	233±2.73	236±7.45*
200	187	189±6.58	192±1.98	194±8.05**	195±5.05

Extractos : cloroformo<sup>a</sup>, metanol<sup>b</sup>, hexano<sup>c</sup> y acuoso<sup>d</sup>. Los asteriscos se refieren a la significancia :  
\*p < 0.05, \*\*p < 0.1; 10 ratones por grupo de experimentación..

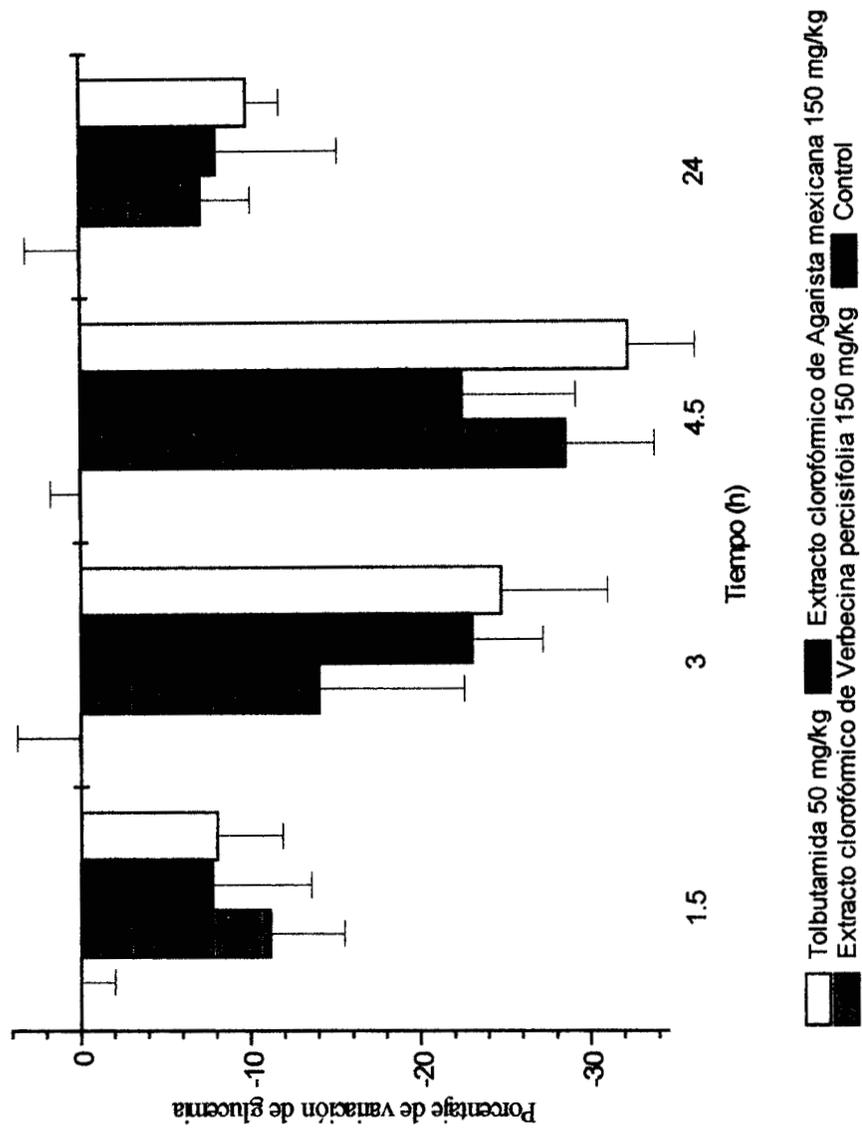


Figura 14.- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos clorofínicos de *Verbena percisifolia* y *Agarista mexicana* en ratones normoglucémicos.

Tabla 5.- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos clorofórmicos de *V. persicifolia* y *Agarista mexicana* en ratones normoglucémicos

Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)					
Estudio	Glucemia Inicial (mg/100 ml)	1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas
Dosis (mg/kg)					
Control	110	109 ±2.0	110±3.7	110± 1.7	109±3.1
<i>V. persicifolia</i> 150	105	93 ± 4.3**	90± 8.5*	74±5.2***	97±2.9
<i>Agarista mex.</i> 150	100	92±5.8**	77±4.1**	76±6.7*	91±7.1*
Tolbutamida 50	105	96±3.8	78±6.2	71±3.9	94±1.9

Los asteriscos se refieren a la significancia : \* p<0.05, \*\*p <0.1; 10 ratones por grupo de experimentación.

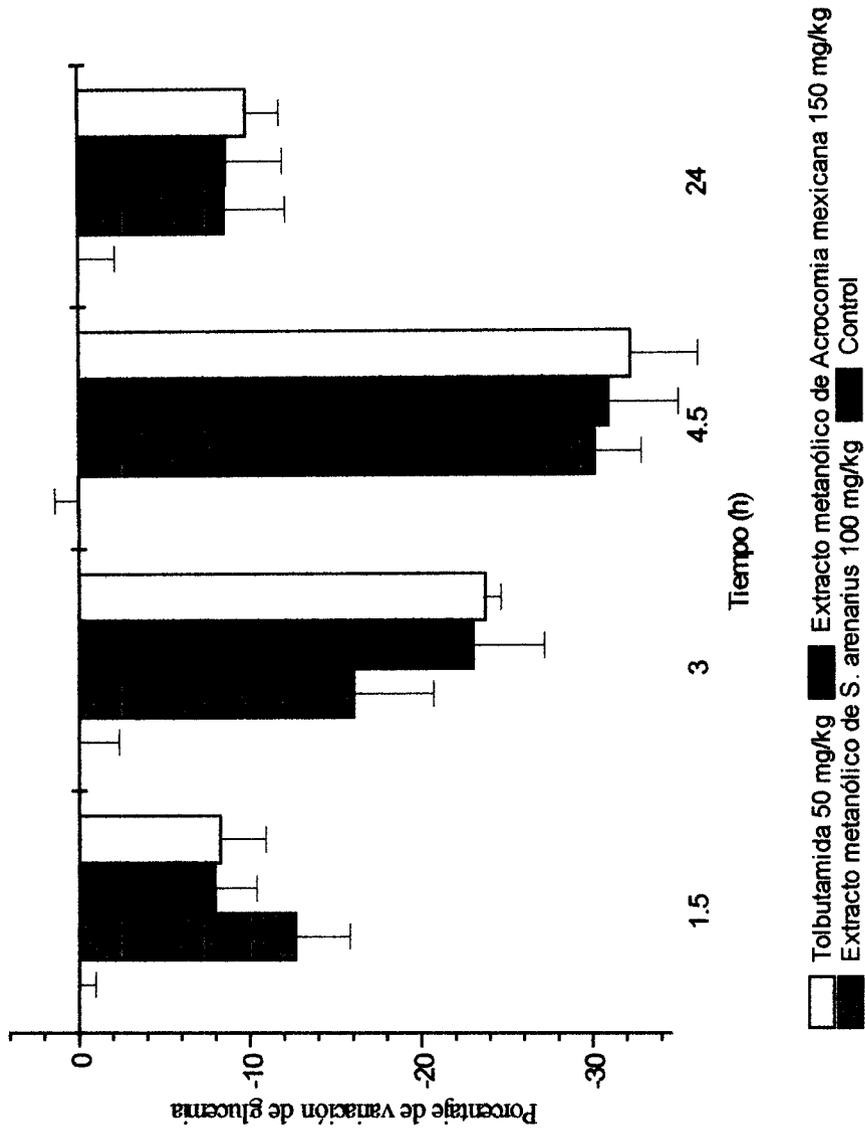


Figura 15.- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos metanólicos de *S. arenarius* y *Acrocomia mexicana* en ratones normoglucémicos.

Tabla 6 .- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos metanólicos de *S. arenarius* y *Acrocomia mexicana* en ratones normoglucémicos

Estudio		Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
Dosis (mg/kg)	Glucemia inicial (mg/100 ml)	1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas	
Control	110	109 ±0.98	109±2.37	111± 1.34	110±2.12	
<i>S. arenarius</i> 100	101	88 ± 3.11	84± 4.65*	70±2.70	92±3.53**	
<i>A. mexicana</i> 150 <i>B.</i>	104	95±2.42	79±4.1	71±4.02*	94±3.28	
Tolbutamida 50	105	96±2.65	80±0.87**	71±3.9	94±1.9**	

Los asteriscos se refieren a la significancia : \* p<0.05, \*\*p<0.1; 10 ratones por grupo de experimentación.

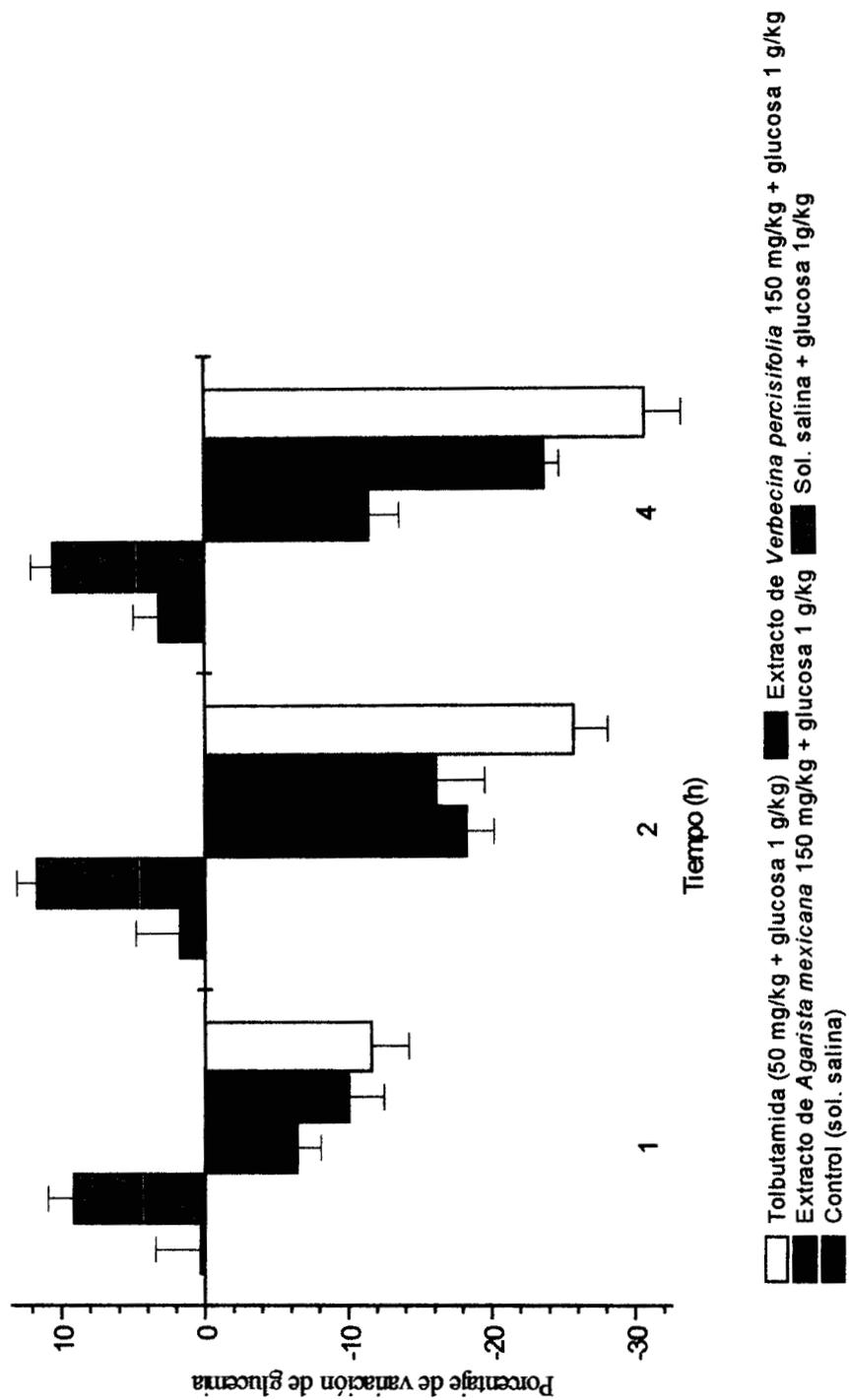


Figura 16.- Curso temporal del efecto de la administración de los extractos clorofórmicos de *Verbena perisifolia* y *Agarista mexicana* en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas.

Tabla 7. - Curso temporal del efecto de de la administración de los extractos clorofórmicos de *V. percisifolia*, *Agarista mexicana* en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas inducidas con aloxana

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)			
	Glucemia Inicial (mg/100ml)	1 hora	2 horas	4 horas
Dosis (mg/kg)				
Salina (-)	279	278 ± 3.08	274 ± 3.04	270 ± 1.76
Salina (-) + glucosa	282	308 ± 1.89 *	315 ± 3.14.	312 ± 4.22**
<i>Agarista mex.</i> Extracto (150)+ glucos	295	276± 1.87*	241 ± 2.98	261 ± 3.09
<i>V. percisifolia</i> Extracto (150)+ glucosa	278	233 ± 1.65	250 ± 3.17**	212 ± 5.43*
Tolbutamida (50)+ glucosa	283	250±5.70*	210 ± 2.13	196 ± 3.55**

Significancia con respecto al control solución salina+ glucosa \* p<0.001, \*\* p<0.01. n = 10

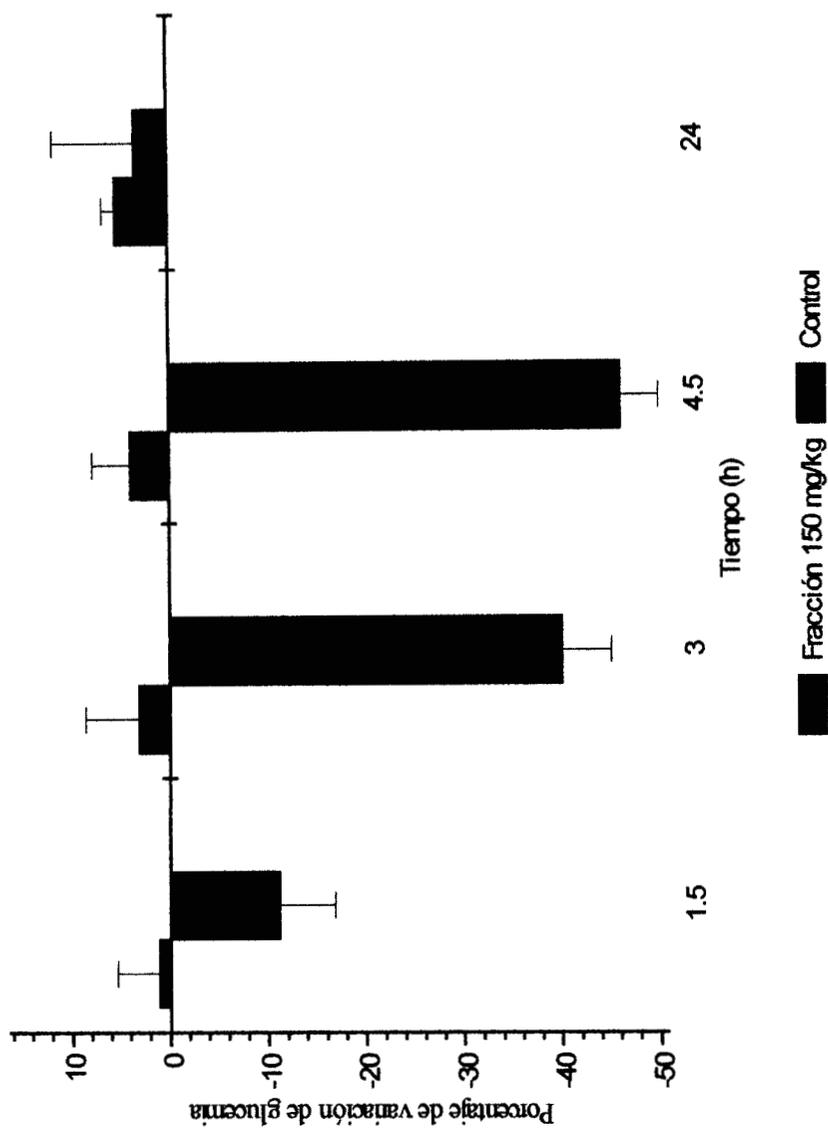


Figura 17.- Curso temporal del efecto de la administración de la fracción 3 con actividad hipoglucemiante, obtenida en el aislamiento del principio activo de *Acrocomia mexicana*.

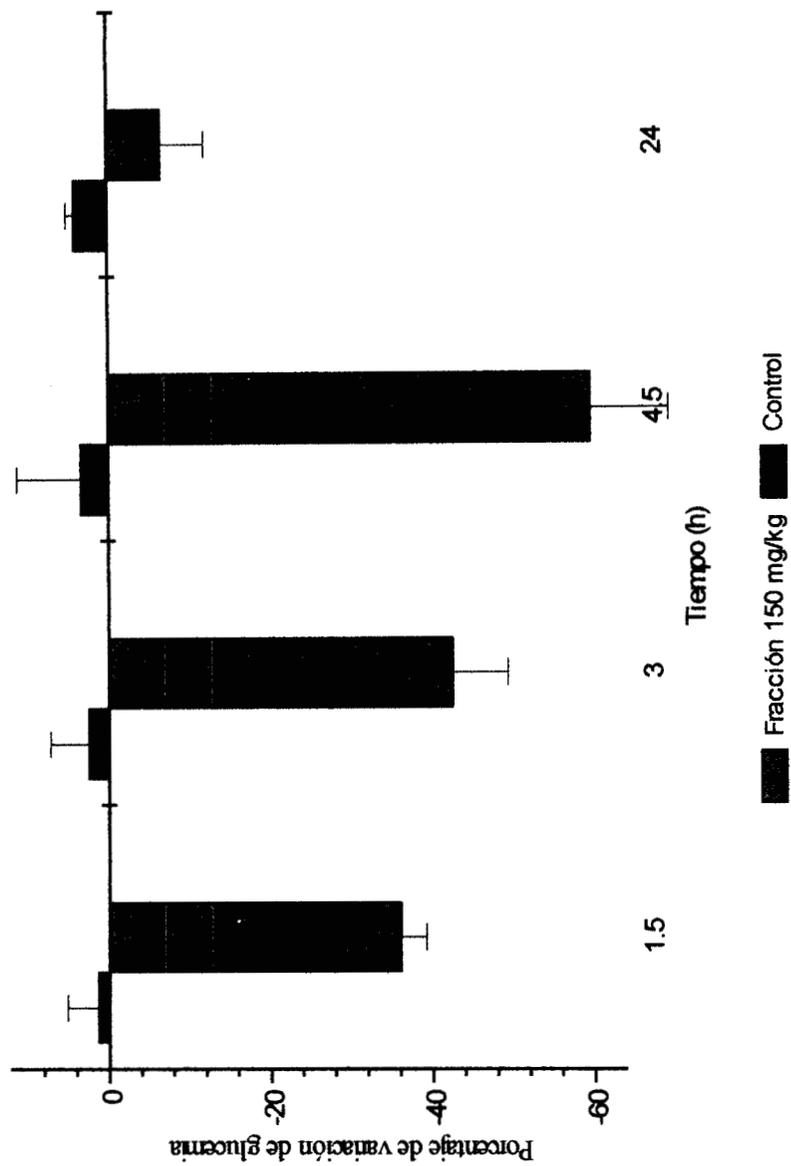


Figura 18.- Curso temporal del efecto de la administración de la fracción 5 con actividad hipoglucemiante obtenida en el aislamiento del principio activo de *Salpianthus arenarius* en ratones diabéticos.

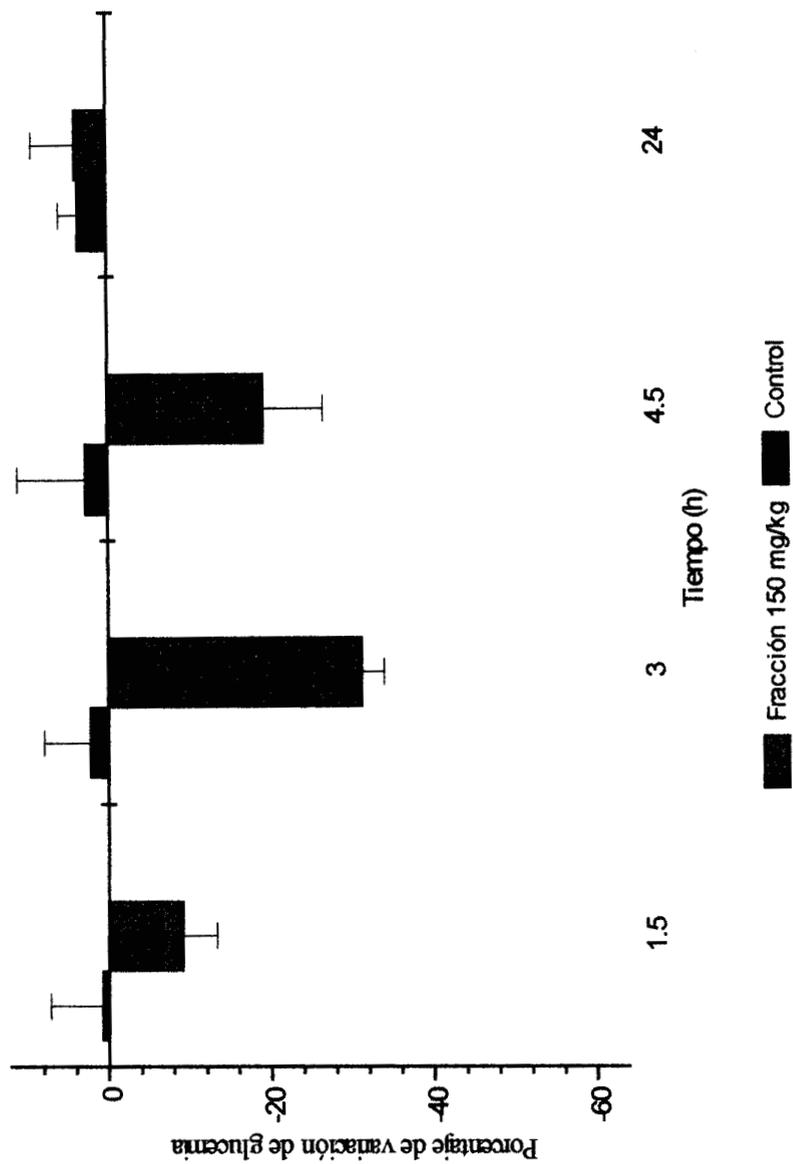


Figura 19.- Curso temporal del efecto de la administración de la fracción 2, con actividad hipoglucemiante obtenida en el aislamiento del principio activo de *Agarista mexicana* en ratones diabéticos.

Tabla 8.- Curso temporal del efecto de las fracciones 2, 5 y 3 con actividad hipoglucemiante obtenidas en el aislamiento de los principios activos de *Agarista mexicana*, *Salpianthus arenarius* y *Acrocomia mexicana* en ratones diabéticos.

Estudio		Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
Dosis (mg/kg)	Glucemia inicial (mg/100ml)	1.5 horas	3 horas	4.5 horas	24 horas	
Control	246	248± 4.28	253±5.4	255±3.87	259±1.3	
<i>Acrocomia mex.</i> 150	235	208±5.61*	140±4.92	126±3.82	242±8.34*	
Control	267	270±3.67	273±4.7	276±7.8	277±0.94	
<i>S. arenarius</i> 150	256	163 ±3.12	146±6.71	103±9.6*	238±5.3	
Control	278	280±6.3	284±5.6	285±8.3	288±2.26	
<i>Agarista mex.</i> 150	287	260±4.21	197±2.72	231±7.3*	298±5.32	

Los asteriscos se refieren a la significancia : p<0.001; 10 ratones por grupo de experimentación.

El compuesto aislado de la raíz de *Acrocomia mexicana*, al cual se le denominó "coyolosa" presentó un punto de fusión de 170-172 °C, El análisis elemental encontrado fue de: C 41.99%, H 6.55 %, O 51.45%, en comparación con el calculado para la fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}$  C 42.10%, H 6.43%, O 51.46%. El espectro de IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$  indicó la presencia de grupos hidróxilos ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ) y éter ( $1040\text{ cm}^{-1}$ ) (Grafica 1). El espectro de  $^{13}C$ RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ), señala que el compuesto contiene cinco grupos CH y un grupo  $CH_2$  (Grafica 2). Los desplazamientos químicos de las señales observadas en  $\delta$  72.5, 73.5, 71.5 y 70.5 indican la presencia de cuatro centros que contienen una función con oxígeno probablemente como CH-OH, por otro lado, un grupo C-O-C fue sugerido por la señal en  $\delta$  61.1. Estos grupos se confirmaron con las señales obtenidas en el espectro de IR a  $3400\text{ cm}^{-1}$  y  $1040\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. La señal a  $\delta$  92.5 es producida por un carbón anomérico por lo que la estructura de la coyolosa se trata de un carbohidrato lo cual se confirma con las señales obtenidas en el espectro de  $^{13}C$ NMR ya que la región de los carbonos presentes en los azúcares se encuentra entre  $\delta$  50-105, rango en que se encuentran las señales producidas por la coyolosa (226).

El espectro de  $^{13}C$ NMR reportado para la  $\beta$ -D-galactosa presenta las siguientes señales:  $\delta$  96 (C-1), 71.6 (C-2), 72.8 (C-3), 69.8(C-4), 75.2 (C-5) y 62.05 (C-6), (227). Por lo que las señales obtenidas en el espectro de la coyolosa pueden ser correlacionadas fácilmente por comparación con el de la  $\beta$ -D-galactosa. La  $^{13}C$ NMR del 2,3,4,6-tetra-O-metil- $\beta$ -D-galactopiranosido metil (228) debido al efecto de la metilación mostró un desplazamiento químico hacia campos bajos de los carbonos vecinos (CH-OH) a un grupo metilo por lo que en el espectro de la coyolosa la señal para el C-6 se encontró hacia campos bajos a  $\delta$  61.0 lo cual sugiere la presencia de un disacárido unido por medio de un grupo C-O-C con ambos monosacáridos idénticos unidos en C-6 y C-6' (Graficas 3 y 4) esto se confirma con las seis señales obtenidas en el espectro de  $^{13}C$ NM:  $\delta$  61.0, 70.5, 71.5, 73.1, 72.5 y 92.5. Si el disacárido estuviera unido por enlaces 1,2, 1,4 y 1,6 entre las unidades de monosacáridos, no se obtendrían las seis señales en el espectro de  $^{13}C$ . Por otro lado no se ha encontrado reportado ningún disacárido con enlaces 1,2, 1,4 y 1,6 con actividad biológica.

El espectro de  $^1\text{HRMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) presentó los siguientes datos espectrales:  $\delta$  3.51 (m),  $\delta$  4.48 (t,  $J = 9.5$  Hz),  $\delta$  4.59 (d,  $J = 5.9$  Hz),  $\delta$  4.77 (d,  $J = 3.0$  Hz),  $\delta$  4.95 (d,  $J = 3.0$ ) y  $\delta$  6.26, (d,  $J = 9$  Hz) (Grafica 5). Se observaron que las constantes de acoplamiento de los Hidrógenos vecinos del compuesto fueron del orden de 10 Hz lo cual indica la existencia de un anillo de 6 miembros, ya que cuando se tiene un anillo del tipo furanoide las constantes de acoplamiento se encuentran en el rango de 0 a 7 Hz (229). En las hexopiranosas y pentopiranosas las constantes de acoplamiento son características de la configuración anomérica y se ha demostrado que las señales para el protón anomérico en los  $\alpha$ -D-manosidos y  $\alpha$ -D-ramnosidos aparecen siempre a campos bajos de  $\delta$  5.02-5.92, en cambio los  $\beta$ -anómeros aparecen entre  $\delta$  4.59 y 4.95 (230). Esta diferencia entre  $\alpha$  y  $\beta$ -anómeros ayuda considerablemente a determinar la estructura anomérica en los carbohidratos.

Los protones de los grupos hidróxidos de la Coyolosa, generan cuatro dobletes: OH-1,  $\delta$  6.26; OH-2,  $\delta$  4.95; OH-3,  $\delta$  4.76; OH-4,  $\delta$  4.65; en cambio las señales producidas por H<sup>1</sup> ( $\delta$  3.61), H-2 ( $\delta$  3.16), H-3 ( $\delta$  3.55), y H-4 ( $\delta$  3.40), aparecen como multipletes (Grafica 5). El desacoplamiento entre los hidrógenos H-5 y H-6 sugieren que estos protones se encuentran en posición *trans*; esta orientación en el enlace de los carbonos C-5 y C-6 minimizan las interacciones estéricas alrededor del C-6 (Figura 20) el cual se encuentra muy substituido (231, 232). Este efecto se ha observado en algunos azúcares derivados de la piranosa que poseen configuraciones *trans*-1,2 y *trans*- 2,3 que muestran señales a campos bajos debido a la carencia de interacciones estéricas (233, 234). En cambio en los azúcares *cis*- 1,2 producen señales a campos altos entre  $\delta$  3.5 y 4.2 ppm y se debe a las interacciones estéricas presentes.

En el espectro de  $^1\text{HRMN}$  de la  $\beta$ -D-galactosa (227) se observó que los protones de los carbonos C-2 y C-3 presentaron señales a campos bajos en forma de dobletes y un multiplete para el H-6. En el espectro de la coyolosa se observaron las siguientes señales:  $\delta$  4.95 (d,  $J = 3.0$ ),  $\delta$  4.77 (d,  $J = 3.0$  Hz), las cuales fueron asignadas a los hidrógenos H-2 y H-3 respectivamente y el multiplete a  $\delta$  3.51 asignado para el H-6 (Figura 20).

Al comparar las constantes de acoplamiento entre los Hidrógenos 1,2 de la coyolosa con el isómero *trans*- 1,2 del compuesto tetra-O-acetil-D-aldohexopiranososa (235, 236), se observa que los valores de la constante de acoplamiento para este tipo de compuestos se encuentran en el rango de 9.0 a 10 Hz, que son típicos para los protones *trans* diaxial cuando se encuentran en una conformación de silla en los anillos del pirano (238). En el espectro de la coyolosa la constante de acoplamiento para los hidrógenos 1,2 es de 9.0 confirmando la estereoquímica *trans*-1,2 también se observan las señales de los hidrógenos H-2 (4.95 d, J=3.0) y H-3 (4.76 d, J=3.0) lo cual indica la presencia de un isómero *cis*-2,3.

El espectro de masas de la coyolosa se determinó a 70 eV (Grafica 6). No presentó ión molecular  $[M]^+$ , mostró poca abundancia relativa en los picos encontrados en la región de masas altas (103-179), m/z 179 (1%), 171 (2%), 161 (1%)  $[C_6H_9O_5]^+$ , 155 (1%), 145 (2%), 126 (4%), 109 (7%), 103 (7%)  $[C_4H_7O_3]^+$ . El espectro presentó varios iones intensos en la región de masas bajas (41-91), 91 (4%),  $[C_3H_7O_3]^+$ , 85 (10%),  $[C_4H_5O_2]^+$ , 81 (9%), 73 (20%)  $[HO-CH-O^+=CH-CH_2^+]$ , 69 (20%), 60 (22%)  $[HO-CH=CH-OH]^+$ , 55 (37%)  $[C_3H_3O]^+$ , 44 (54%)  $[C_2H_4O]^+$ , 45 (28%)  $[C_2H_3O]^+$ , 43 (100%),  $[CH=CH-OH]^+$ , 37 (11%)  $[C_3HO]^+$ ; el esquema de patrón de fragmentación de la coyolosa se presenta en la Figura 20.

El espectro de masas de un disacárido unido por medio de un grupo C-O-C muestra que su fragmentación puede ser descrita como una ruptura independiente de ambas unidades de los monosacáridos "a" y "b" así como del tipo de enlace intermonosacárido. El espectro de masas de la coyolosa es característico de los disacáridos formados por dos unidades de hexopiranososa. En aquellos disacáridos que presentan enlaces 1,2, 1,4 y 1,6 entre las unidades de monosacáridos, se ha encontrado la ausencia del ion molecular y la abundancia relativa de los

picos es mayor en la región de masas bajas del espectro y la presencia de los iones que contienen intacta la unidad "a" (238).

El ión  $m/z$  179 presente en el espectro de masas de la coyolosa debe de contener intacta la unidad "a" incluyendo C-6 porque la formación de este ion no depende de la posición del enlace intermonosacarido. El rompimiento del enlace intermonosacárido produce el ión  $m/z$  161  $[C_6H_9O_5]^+$  (239). La fragmentación del anillo de este ión condujo a la formación del ion  $m/z$  91  $[C_3H_7O_3]^+$  y por la pérdida de 3 moléculas de agua produce los iones  $m/z$  73  $[HO-CH-O=CH-CH_2^+]$ ,  $m/z$  55  $[C_3H_3O]^+$ , y 37  $[C_3HO]^+$ . El ión  $m/z$  91 produce por un rompimiento heterolítico del enlace de los carbonos C-3 y C-4 al ion  $m/z$  60  $[HO-COH=CH-OH]^+$ . El ión  $m/z$  103 contiene los carbonos C-1, C-2, C-5 y C-6  $[HO-CH-CH-OH-O^+=CH-CH_2^+, C_4H_7O_3]$ . Después este fragmento por la pérdida de una molécula de agua produjo el ión  $m/z$  85  $[103-H_2O, C_4H_5O_2]^+$ . También en el espectro de masas se observaron tres picos importantes a  $m/z$  45, 43 y 44, a los cuales se les asignaron los fragmentos  $[C_2H_3O]^+$ ,  $[C_2H_3O, CH=CH-OH]^+$  y  $[161-4H, O_3]^+$ , respectivamente.

El acetato de la coyolosa presentó un punto de fusión de 132-134 °C y el análisis elemental encontrado fue de: C 49.61%, H 5.74, O 44.64 %, comparado con el calculado para la fórmula  $C_{28}H_{38}O_{19}$  C 49.56% H 5.60% y O 44.83%. El espectro de IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$  indicó la presencia de los grupos: éter C-O-C (1040 y 1220  $cm^{-1}$ ) y carbonilo de éster (1740  $cm^{-1}$ ), (Grafica 7). Los grupos OH observados en la coyolosa a 3400  $cm^{-1}$  desaparecieron completamente en el derivado acetilado indicando con ello que todos estos grupos son primarios o secundarios.

Los datos espectrales obtenidos en  $^1H$ RMN (DMSO) del derivado acetilado del compuesto hipoglucémico fueron los siguientes:  $\delta$  1.91, 2.01, 2.09, 2.11 (OAc, s),  $\delta$  4.3 (H-6, m),  $\delta$  5.45 (H-5, m),  $\delta$  5.7 (H-2, d,  $J=4$ ),  $\delta$  5.1 (t,  $J=9$  Hz) y  $\delta$  4.9 (H-3, d,  $J=4$ ), (Grafica 8). El espectro de  $^{13}C$ RMN (Grafica 9) presentó los siguientes datos espectrales del acetato de la coyolosa:  $\delta$  170.59 (OAc),  $\delta$  170.21 (OAc),  $\delta$  169.62 (OAc),  $\delta$  149.48 (OAc),  $\delta$  91.17 (C-1),  $\delta$  89.13 (C-3),  $\delta$  72.82 (C-2),  $\delta$  69.90 (C-4),  $\delta$  67.88 (C-5),  $\delta$  61.54 (C-6) y  $\delta$  20.58

(Me). Los espectros de  $^1\text{HRMN}$  y  $^{13}\text{CRMN}$  indica claramente la presencia de un tetracetato, sugiriendo con ello la presencia de cuatro grupos OH en la molécula de la coyolosa lo cual confirma la presencia de un disacárido simétrico.

El espectro de masas del acetato de la coyolosa (Grafica 10) se determinó a 70 eV. No presentó ión molecular  $[\text{M}]^+$ , mostró los siguientes picos:  $m/z$  332 (7%), 331 (20%), 271 (18%), 242 (15%), 211 (10%), 200 (20%), 169 (100%), 157 (25%), 140 (15%), 115 (28%), 109 (33%), 103 (13%). El pico  $m/z$  331  $[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9]^+$  resulta del rompimiento del enlace entre las dos unidades de monosacáridos y por la pérdida de una molécula de acetato produce el ión  $m/z$  271  $[\text{331-HOAc}, \text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_7]^+$ . La fragmentación del anillo de este ión produjo la formación del ión  $m/z$  157  $[\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_4]^+$  que contiene los C-2, C-3 y C-4 de la galactosa y por la pérdida de una molécula de  $\text{CH}_2\text{CO}$  produce el ión  $m/z$  115  $[\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_3]^+$ . También la fragmentación del anillo condujo a la formación del ión  $m/z$  242  $[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_6]^+$  (Figura 21). Las unidades "a" y "b" que forman el disacárido son identificadas como  $\beta$ -D-galactosa unidas por enlace 6-6'. Los espectros de: IR,  $^{13}\text{CNMR}$ ,  $^1\text{HRMN}$  y espectrometría de masas de la coyolosa se presentan en el anexo I.

Estos resultados nos conducen a proponer la estructura de la coyolosa como un nuevo disacárido, 6-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-6'-O- $\beta$ -D-galactosa (Figura 22)

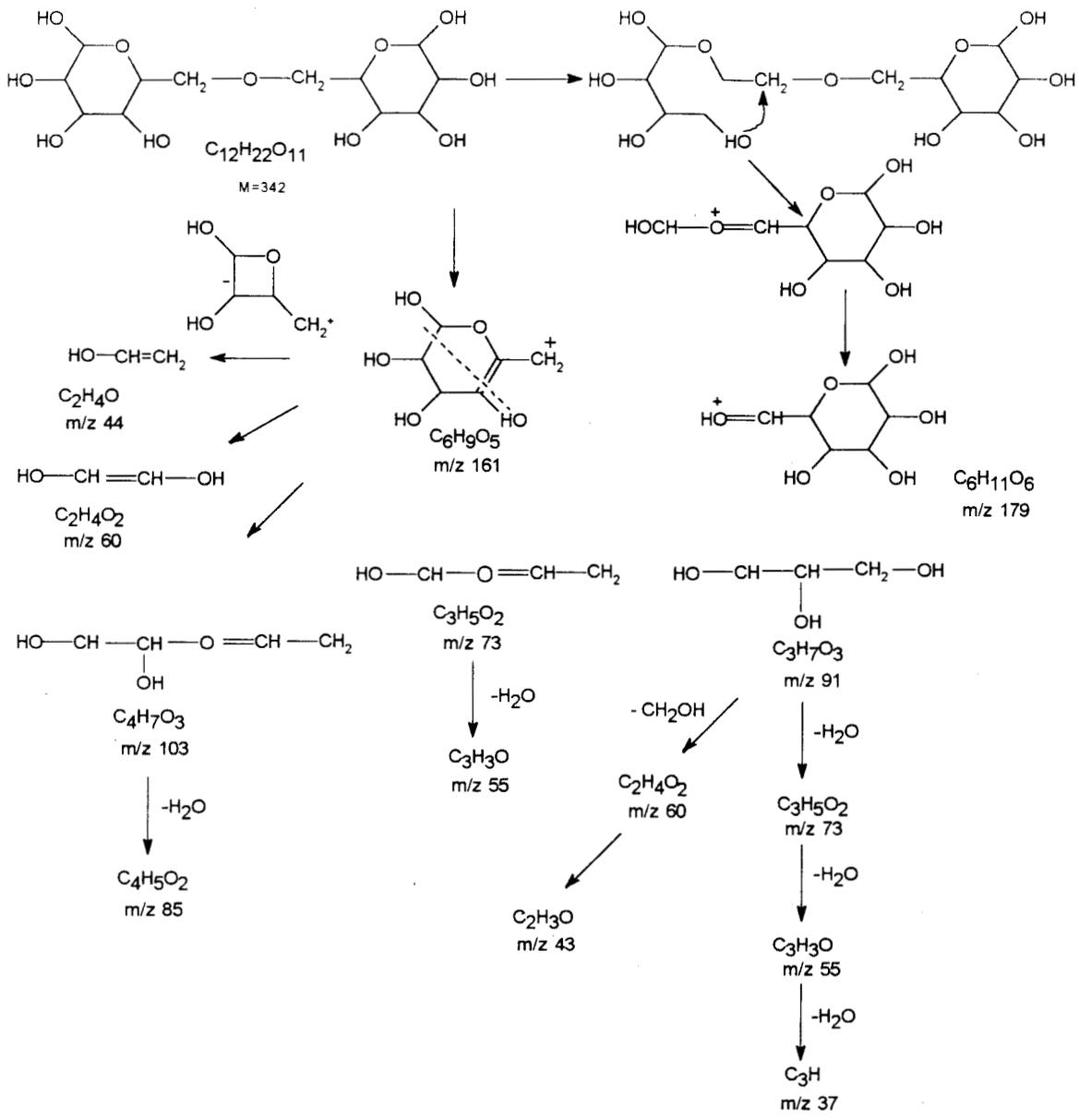


Figura 20- Patrón de fragmentación propuesto para la coyolosa

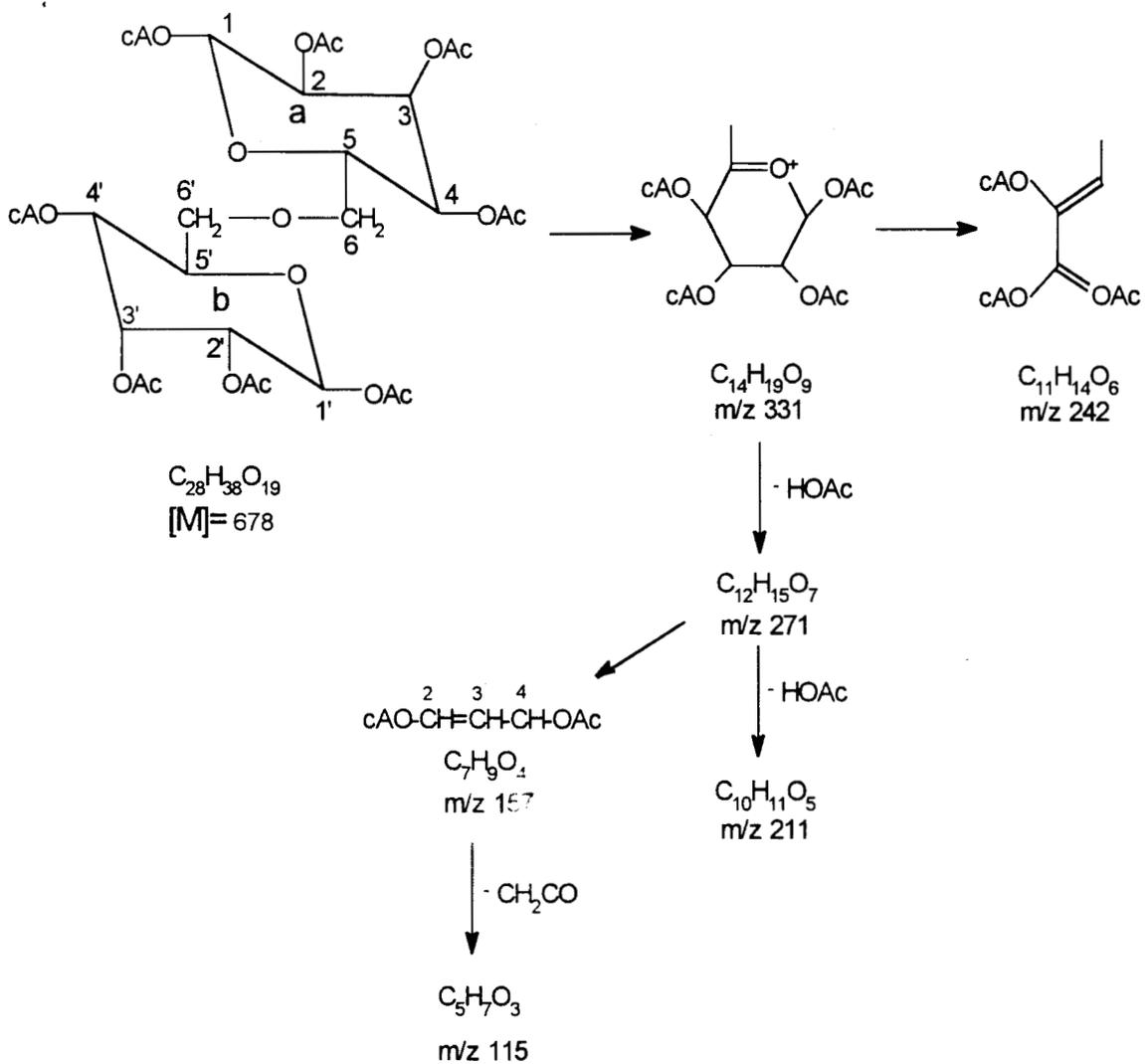


Figura 21.- Patrón de fragmentación propuesto para el acetato de la coyolosa.

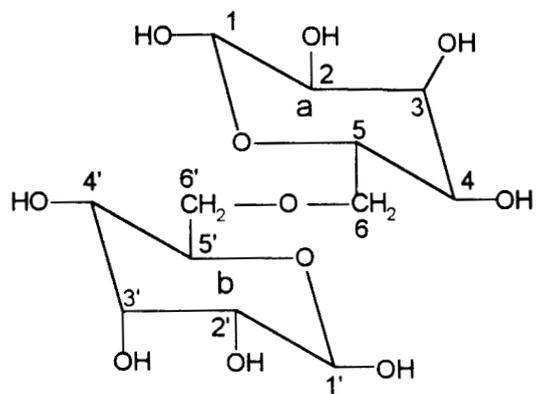


Figura 22.- 6-O-β-D-galactopiranosil-6'-O-β-D-galactosa

Los resultados del efecto hipoglucémico de la coyolosa, aislada de la *Acrocomia mexicana*, en ratones diabéticos y normoglucémicos, así como en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas se presentan en las Figuras 23, 24 y 25 (Tabla 9) respectivamente. El máximo efecto hipoglucémico de la coyolosa observado en ratones hiperglucémicos fue de 58.5.1%, 4.5 h después de la administración. Al comparar los resultados con los obtenidos con la tolbutamida en la misma dosis (50 mg/kg) se encontró que ésta solamente produce el 31.6% de disminución de glucosa sanguínea en el mismo tiempo, pero la concentración de glucosa se incrementa a las 24 h (+2.3%), lo cual indica que el efecto de la coyolosa es de corta duración. En la figura 21 también se muestran los resultados obtenidos con la administración de diferentes dosis (5, 10 y 20 mg/kg) de coyolosa a ratones hiperglucémicos. El máximo efecto hipoglucémico fue de 54.1%, 4.5 h después de la administración de 20 mg/kg. Con una dosis de 5 mg/kg la coyolosa produce la mínima actividad hipoglucemiante a las 1.5 h después de la administración (2.4% de reducción).

Esta sustancia produce una disminución en el nivel de glucosa sanguínea de 24.1 % a las 3 h de su administración en ratones normoglucémicos a dosis de 50 mg/kg. Y al igual que en el caso de los ratones diabéticos el efecto más pronunciado se presentó a las 4.5 h con un 26.2% de reducción de los niveles de glucosa sanguínea, dichos niveles regresan a los valores iniciales a las 24 h.

El efecto de la coyolosa en la prueba de tolerancia a la glucosa (Figura 23) mostró en los animales del grupo control, que recibieron solución salina seguida de una administración de glucosa por vía oral de 1 g/kg, incrementa notable de la concentración de glucosa sanguínea de 18.5% a las 2 h y estos niveles permanecen altos durante las siguientes 2 h. En cambio la coyolosa y tolbutamida a dosis de 50 mg/kg revierten significativamente el incremento de glucemia a las 4 h (-36.6 y -32.1% respectivamente) indicando con ello una disminución en la tolerancia a la glucosa. El compuesto aislado de la *Acrocomia mexicana* muestra una tolerancia a la glucosa más alta que la tolbutamida.

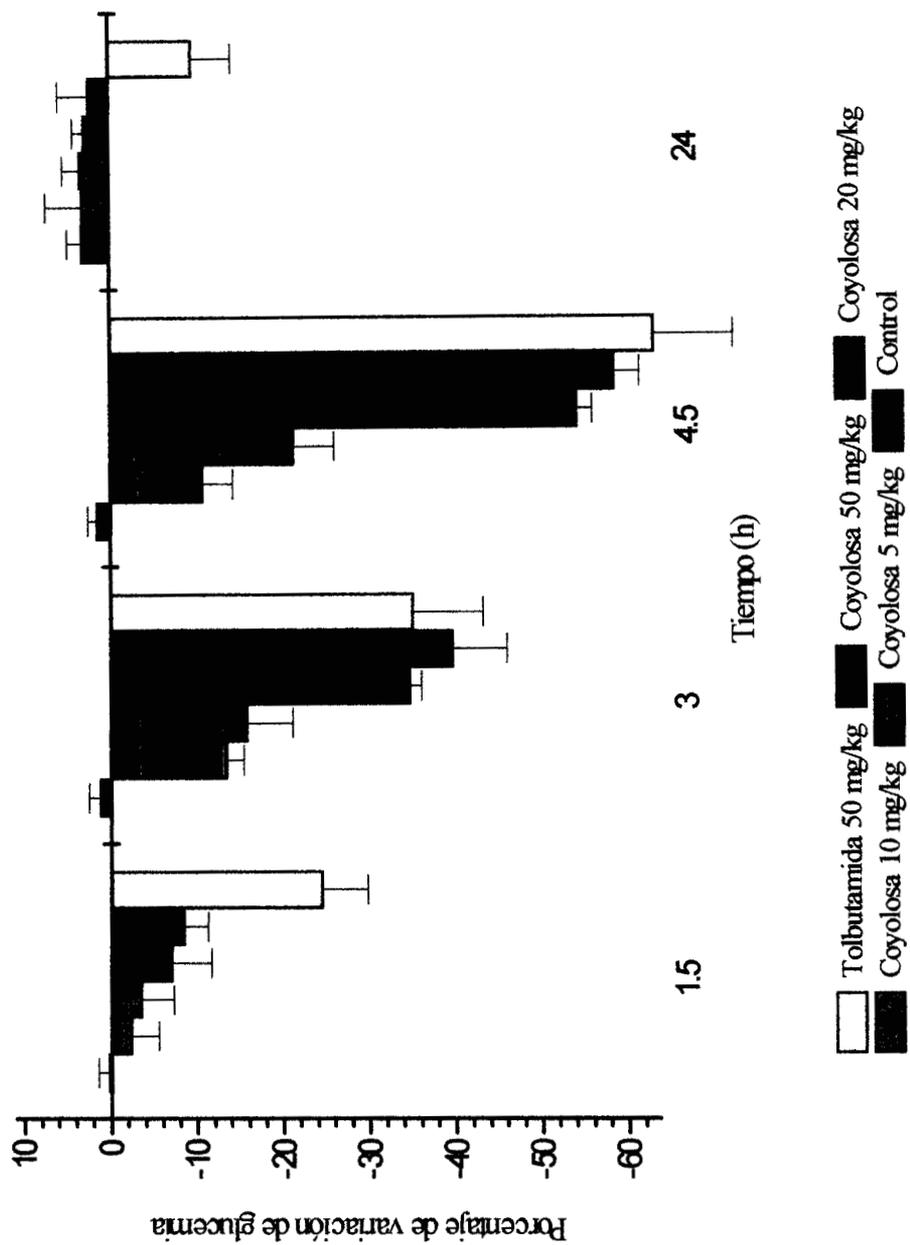


Figura 23.- Efecto de la Coyo los a aislada de la *Acrocomia mexicana* en ratones diabéticos.

Tabla 9. - Efecto de Coyolosa aislado de la *Acrocomia mexicana* en ratones diabéticos inducida por aloxana

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Glucemia Inicial (mg/100ml)	1.5 h	3 h	4.5 h	24 h
Dosis (mg/kg)					
Control	186	105±1.0	188±1.2	188±1.0	191±1.6
Coyolosa 5	210	204±3.1	187 ±1.9	181±3.5	216±4.2*
Coyolosa 10	193	186±3.7	162±5.3*	151±4.7*	199±1.9
Coyolosa 20	205	190±4.5*	133±1.3	94±1.7	210±1.2
Coyolosa 50	171	156±2.7	103±6.2*	71±2.8	174±3.5
Tolbutamida 50	238	179±5.21	155±8.02*	88±1.21	214±4.55

Los asteriscos se refieren a la significancia : \* p<0.05; 10 ratones por grupo de experimentación.

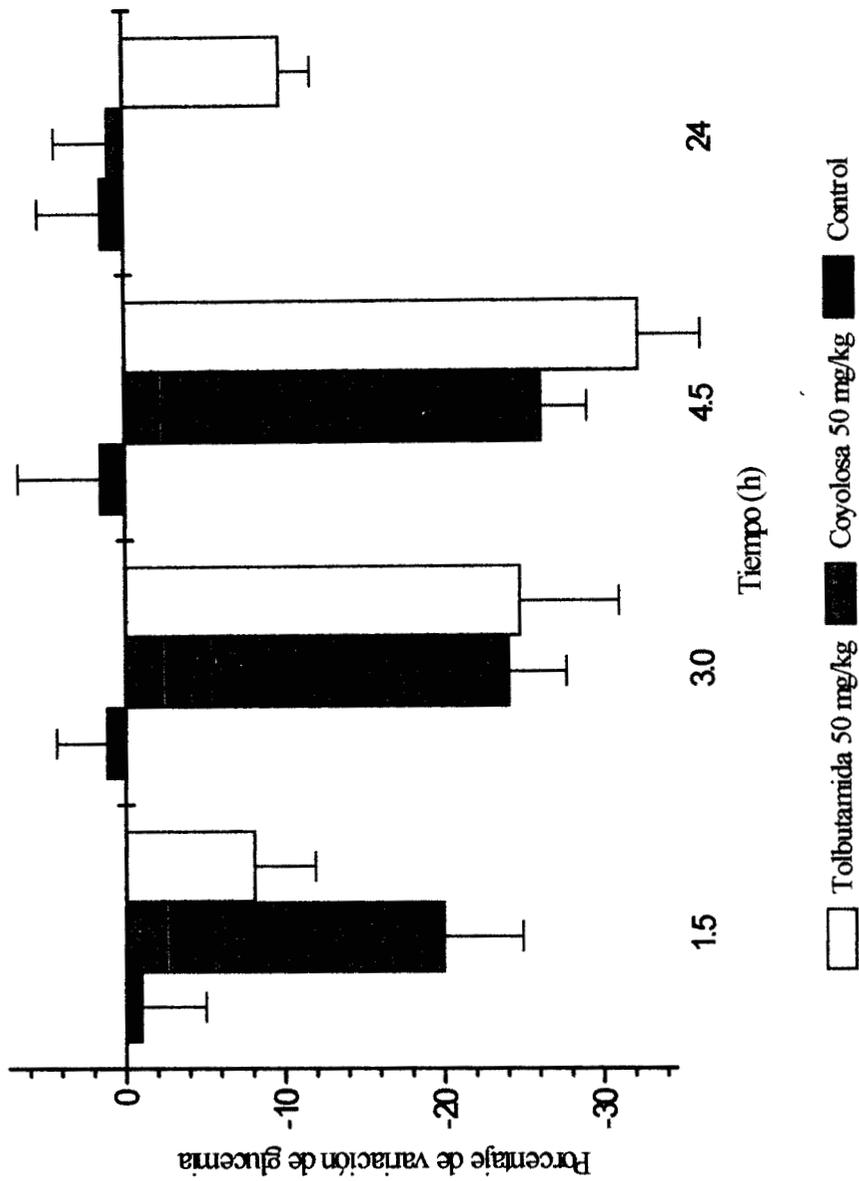


Figura 24.- Efecto de la Coyolosa aislada de *Acrocomia mexicana* sobre el nivel de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos.

Tabla 10.- Efecto de la coyolosa aislado de *Acrocroma mexicana* sobre el nivel de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Glucemia Inicial (mg/100ml)	1.5 h	3 h	4.5 h	24 h
Dosis (mg/kg)					
Control	105	106±4.0	106±3.1	105±4.1	106±3.9
Coyolosa 50	99	79±4.9	75±4.6*	73±2.8	100±3.3*
Tolbutamida 50	105	96±2.65	80±0.87*	71±3.9	94±1.9*

Los asteriscos se refieren a la significancia : \* p<0.001, 10 ratones por grupo de experimentación.

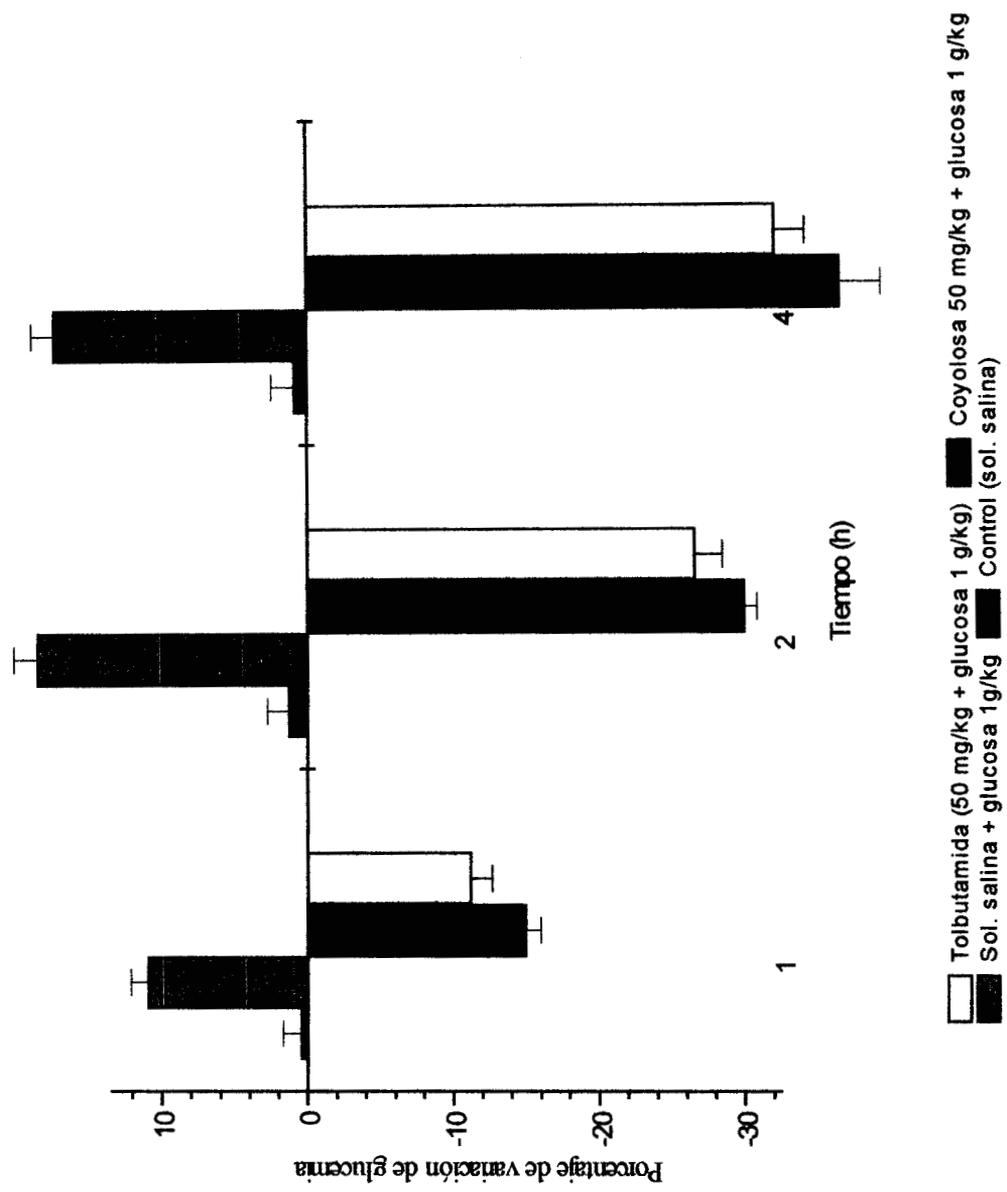


Figura 25.- Efecto de la administración de la Coyolosa aislada de la *Acrocomia mexicana* en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas.

Tabla 11. - Efecto de la administración de la Coyolosa aislada de la *Acrocomia mexicana* y Tolbutamida sobre la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas.

Estudio	Variación de la glucomia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Dosis (mg/kg)	Glucomia Inicial (mg/100ml)	1.0 h	2.0 h	4.0 h
Salina		229	229 ±1.56	232 ± 4.20	230 ± 1.68
Salina + glucosa		265	293 ± 2.11	313 ±3.45	310 ±4.09
Coyolosa (50) + glucosa		273	232±1.19**	191±2.67	173±3.25
Tolbutamida(50) + glucosa		240	213 ±3.24	176 ± 4.53*	161±1.86**.

Significancia con respecto al control solución salina + glucosa \* p<0.001, \*\* p<0.01. n = 8

El compuesto aislado de la raíz de *Salpianthus arenarius* con propiedades hipoglucemiantes denominado "saliriol" se cristalizó de metanol produciendo cristales incoloros con un punto de fusión de 185-187 °C . La solución metanólica del saliriol no presentó absorción en la región UV/VIS. El espectro de IR mostró bandas de absorción atribuibles a grupos hidróxilo ( 3414  $\text{cm}^{-1}$ ) y éter (11069, 1238 y 1279  $\text{cm}^{-1}$ ), (Grafica 11) el compuesto presentó una fórmula molecular de  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  basado en el análisis elemental, (C 42.17%, H 6.48% y O 51.34%; calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  C 42.11%, H 6.43% y O 51.46%). El número de átomos de carbono en el saliriol ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) se confirmó por la señales obtenidas en el espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, DMSO  $\delta$ ): 61.17,  $\delta$  62.38, 62.89, 68.52, 70.50, 73.32, 73.40, 74.89, 78.08, 83.01, 92.32, y 104.00 (Grafica 12). También este espectro señala que el compuesto contiene ocho grupos CH, tres grupos  $\text{CH}_2$  y un carbono cuaternario (Grafica 13). Los desplazamientos químicos de las señales observadas en  $\delta$  92.32, 83.01, 78.08, 73.32, 73.41 y 70.5, indicaron la presencia de seis centros con una función con oxígeno probablemente del tipo CH-OH y las señales a  $\delta$  62.38 y 62.89 sugieren la presencia de dos centros con una función con oxígeno probablemente del tipo  $\text{CH}_2\text{OH}$ . Estos grupos se confirmaron con las señales obtenidas en el espectro de IR ( 3414  $\text{cm}^{-1}$ ).

En los espectros de  $^{13}\text{C}$ RMN reportados de la  $\alpha$ -D- manopiranososa y  $\beta$ -D-manopiranososa (241) presentaron las siguientes señales:  $\delta$  94.85 (C-1), 72.35 (C-2), 74.10 (C-3), 67.75 (C-4), 77.30 (C-5) y la señal característica de 62.15 para el C-6. En estos espectros una señal a  $\delta$  102.4 se ha descrito para el C-1 de la  $\alpha$ -D- manopiranososa y una señal de  $\delta$  94.85 es reportado para el C-1 de la  $\beta$ - D-manopiranososa (242). En el espectro del saliriol la señal a  $\delta$  92.32 es producida por el C-1 y por otro lado el saliriol presentó la misma configuración en los C-2', C-3', C-4', y C-5' ( $\delta$  73.40, 74.89, 70.50, 78.08 respectivamente) que la reportada para la  $\beta$ -D-manopiranososa ya que se debe de esperar que el grupo OH axial en el C-2 tenga un efecto en el desplazamiento químico del C-5 a  $\delta$  78.08. Por otro lado, se presentaron las señales a  $\delta$  62.38 y 62.89 las cuales sugieren dos alcoholes primarios. La señal a  $\delta$  104.54 indica un grupo O-C-O característico del anillos de 1,3 dioxolanos (243).

Cuando se reemplaza el sustituyente  $\text{CH}_2\text{OH}$  del C-5 en los carbohidratos derivados de la piranosa por los grupos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2\text{Me}$  o H se observa un desplazamiento en las señales de los carbonos C-4 y C-5 en el espectro de  $^{13}\text{C}$  (242). Se observó en el espectro del saliriol que debe de existir la sustitución del grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$  en el C-5 por un grupo  $\text{HO-CH-CH-OH}$  esto se sugiere debido a las señales de  $\delta$  73.32 y 83.01, esto causa que las señales de los carbonos C-4' y C-5' sean también desplazadas hacia campos bajos a  $\delta$  70.50 y 78.08 respectivamente. Las señales producidas por el anillo 1,3 dioxolano fueron:  $\delta$  104.0 (C-2), 83.01 (C-4), 61.17 (C-5), 68.52 (C-6), 62.38 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) y 62.89 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) al extrapolar estos valores con los desplazamientos químicos reportados para 1,3 dioxolanos 2,2, 4 sustituidos con sustituyentes H, Me, Et, i-Pr, t-Bu, Ph suponemos que en el saliriol el sustituyente se encuentra en el C-4 (244).

El espectro de  $^1\text{HRMN}$  (300 MHz) del saliriol fue determinado en DMSO (Grafica 14) lo cual presentó un espectro muy complejo y no se pudo determinar la multiplicidad y las constantes de acoplamiento. Por lo que las señales de los grupos OH, fueron reducidas a un mínimo con la adición de  $\text{D}_2\text{O}$ . Las señales observadas en el espectro de  $^1\text{HRMN}$  de la  $\beta$ -D-manopiranososa en  $\text{D}_2\text{O}$  son reportadas:  $\delta$  5.04 (H-1 d,  $J = 1.0$  Hz), 3.92 (H-2, d,  $J = 2.5$  Hz), 4.28 (H-3, d,  $J = 2.5$  Hz), 3.97 (H-4, d,  $J = 2.8$  Hz), 3.73 (H-5, oct,  $J = 3$  Hz), 3.25 (H-6, d,  $J = 8.42$  Hz) (242). Los datos espectrales obtenidos del fragmento del monosacárido en el saliriol en el espectro de  $^1\text{HRMN}$  a 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) fueron los siguientes:  $\delta$  5.24 (H-1', d,  $J = 1.0$  Hz),  $\delta$  3.23 (H-2', d,  $J = 2.5$  Hz),  $\delta$  3.48-3.54 (H-3', m),  $\delta$  3.44 (H-4', d,  $J = 2.2$ ),  $\delta$  3.69 (H-5', oct  $J = 3.2$  Hz),  $\delta$  3.15 (H-6', t,  $J = 8.50$  Hz).

El espectro de  $^1\text{HNMR}$  en óxido de deuterio (Grafica 15) presentó un doblete a  $\delta$  5.24; esta señal fue asignada al H-1, no se observan señales para otros protones anoméricos. El resto del espectro presentó bandas en la región de 2.5 a 3.9 ppm. Un octeto centrado a  $\delta$  3.69, tiene una intensidad similar a la presentada por el H-1 por lo que a esta señal se le

asignó al protón H-5. Las constantes de acoplamiento observadas para  $J_{1,2}$ ,  $J_{2,3}$ , y  $J_{3,4}$  para la forma  $\beta$  se encuentra de acuerdo con la estructura de la  $\beta$ -D manopiranososa. Por otro lado los dos dobletes de dobletes a  $\delta$  3.23 con una intensidad en proporción de 1:1 puede ser asignado a los hidrógenos H-3 y H-2 del residuo del manopiranosil. Esta asignación es también corroborada por el doblete producido por el H-4 en el espectro de  $^1\text{H NMR}$  del saliriol (235).

Los datos espectrales para el anillo 1,3 dioxolano 2,2,4 trisustituido en el saliriol fueron: H-4 (3.63, t,  $J = 4.2$ ), H-5 (3.64, d,  $J = 4.2$ ), H-6 (3.83, t,  $J = 5.0$ ),  $\text{CH}_2\text{OH}$  (3.89, s) y  $\text{CH}_2\text{OH}$  (3.91, s) los cuales están de acuerdo con los datos reportados para los isómeros 2,2,4-trisustituidos-1,3-dioxolanos (244-247).

El espectro de masas del saliriol se determinó a 70 eV ( Grafica 16). Este compuesto no presentó ión molecular  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  179 (1%)  $m/z$  163 (16),  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$ , 145 (22),  $m/z$  133 (6),  $m/z$  131 (3)  $m/z$  127 (50),  $m/z$  109 (17),  $m/z$  103 (12),  $m/z$  97 (64),  $m/z$  91 (6),  $m/z$  85 (39),  $m/z$  73 (77),  $m/z$  60 (46),  $m/z$  45 (33),  $m/z$  43 (100).

Los patrones de fragmentación en los espectros de masas de los carbohidratos son caracterizados por un importante rompimiento en el sustituyente que se encuentra en el C-5 de la molécula de azúcar produciendo fragmentos iónicos subsecuentes por pérdida de cuatro moléculas de agua (248)  $m/z$  163,  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$ ,  $m/z$  145 [ $m/z$  163 -  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4^+$ ],  $m/z$  127 [ $m/z$  163-2  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_3^+$ ],  $m/z$  109 [ $m/z$  163-3 $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2^+$ ], y  $m/z$  91 [ $m/z$  163-4 $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_3\text{O}^+$ ]. También se observaron otros iones importantes tales como: al ion  $m/z$  90 [ $m/z$  163- $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$ ], el cual contiene principalmente los carbonos C-2, C-3 y C-4 [ $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3^+$ ], al pico a  $m/z$  60 [ $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ], se le asignó la estructura  $[\text{OH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{OH}]^+$  y se encuentra predominantemente compuesto por los carbonos C-2 y C-3, estos iones confirman la presencia de una molécula de  $\beta$ -D- manopiranososa en el saliriol.

También la fragmentación de los compuestos 2,4 dialquil,1,3 dioxolanos es bastante conocida (249). El espectro de masas obtenido del saliriol presenta solamente un pico intenso en la región de masas alta a  $m/z$  133 [ $C_5H_9O_4^+$ ]. La fragmentación del anillo de 1,3 dioxolano se lleva a cabo a través de la formación del ion oxonio formado por la pérdida de uno o dos grupos  $CH_2OH$  desde el ión molecular y es estabilizado por la deslocalización de la carga positiva entre los dos átomos de oxígeno  $m/z$  103 [ $m/z$  133- $CH_2OH$ ,  $C_4H_7O_3^+$ ] y  $m/z$  73 [ $m/z$  103- $CH_2OH$ ,  $C_3H_5O_2^+$ ] (246). Otras señales importantes se presentan a  $m/z$  43

[ $m/z$  73- $C_2H_3O$ ,  $CH_3-C\equiv O^+$ ], el ion  $m/z$  73 [ $C_3H_5O_2^+$ ] se forma por la pérdida del hidrógeno del C-4, este rompimiento es característico de los cetales que no contienen hidrógeno en el C-2 por lo que no presentan iones M-H (250). La presencia del ion  $m/z$  45 [ $m/z$  73-CO,  $EtO^+$ ] es característico de todos los 2,2,dialquil 1,3 dioxolanos y generalmente se encuentra en una abundancia relativa del 10 al 30% del pico base en los espectros de masas a 70 eV. Los picos metaestables en el espectro de masas establecen la formación de  $m/z$  73 por la eliminación de monóxido de carbono (Figura 24).

El octacetato de saliriol en el espectro de IR (Grafica 17) muestra la presencia de carbonilo a  $1745\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de  $^{13}C$ RMN ( $CDCl_3$   $\delta$ ) mostró: 170.63 (OAc), 170.19 (OAc), 170.06 (OAc), 170.04 (OAc), 168.83 (OAc), 169.77 (OAc), 169.50 (OAc), 169.45 (OAc), 104.04 (C-2), 89.95 (C-1'), 79.10 (C-6), 75.38 (C-5'), 74.98 (C-4'), 70.10 (C-2'), 69.66 (C-3'), 68.52 (C-4), 68.20 (C-6'), 63.72 ( $CH_2OAc$ ), 62.89 ( $CH_2OAc$ ), 61.77 (C-5) y 20.74 ( $CH_3$ ). El espectro de  $^{13}C$ NMR del compuesto acetilado (Grafica 18) indica claramente la presencia de ocho grupos funcionales OH, lo cual sugiere un octacetato. Los desplazamientos químicos de las señales de  $^{13}C$  obtenidas de la parte del azúcar del saliriol se compararon con las señales del espectro reportado para el pentacetato de la  $\beta$ -D- manopiranososa [ $\delta$  91.31(C-1), 70.0 (C-2), 69.5 (C-3), 67.70 (C-4), 69.50 (C.5), 61.10 (C-6)], (250) teniendo la misma configuración en C-2', C-3', C-4', y C-5' (245). Los datos espectrales obtenidos para el anillo 1,3 dioxolano fueron  $\delta$ : 104.04 (C-2), 68.52 (C-4) y  $\delta$  61.77 (C-5) 62.72 ( $CH_2OAc$ ), 63.72 ( $CH_2OAc$ ),  $\delta$  79.10 (C-6).

Los datos espectrales obtenidos para el octaacetato del saliriol en  $^1\text{HRMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1.99, 2.02, 2.07, 2.08, 2.09, 2.15, 2.31 y 2.33 (OAc, s), 4.09-4.34 (H-4, H-5 m), 4.17 ( $\text{CH}_2\text{OAc}$ , s), 4.27 ( $\text{CH}_2\text{OAc}$ , s), 4.22 (H-6, t,  $J = 4.5$  Hz), 5.68 (H-1', d,  $J = 3.7$  Hz), 4.86 (H-2', d, d,  $J = 1.4, 3.7$  Hz), 5.1 (H-6', t,  $J = 1.4$  Hz), 5.32-5.45 (H-3', H-4' y H-5', m), (Grafica 19).

Para confirmar la estructura sugerida para el saliriol se determinó a partir del compuesto acetilado los espectros de COSY H,H y H,C (Graficas 20, 21). La inspección del espectro COSY revela importantes interacciones vecinales, mostrando que el acoplamiento de los protones en el anillo de la manosa es consistente con una conformación de silla con el lado de la cadena ecuatorial a C-5'. La constante de acoplamiento asociada con el H-6 ( $J = 4.5$ ) es significativamente diferente de la constante de acoplamiento para el H-6' ( $J = 1.4$ ), esto sugiere que predomina la orientación *trans* alrededor de los enlaces de los C-6' y C-6 (236). Esta orientación alrededor de los enlaces de los C-5'-C-6' minimizan las interacciones estéricas alrededor del sustituyente en el C-6'.

Los espectros de: IR,  $^{13}\text{CNMR}$ ,  $^1\text{HRMN}$  y espectrometría de masas del saliriol se presentan en el anexo II. Estos resultados nos conducen a proponer la estructura del saliriol como: 6'-(2,2-dihidroxi-4-hidroximetil-1,3-dioxolano)- $\beta$ -D-manopiranososa (Figura 25).

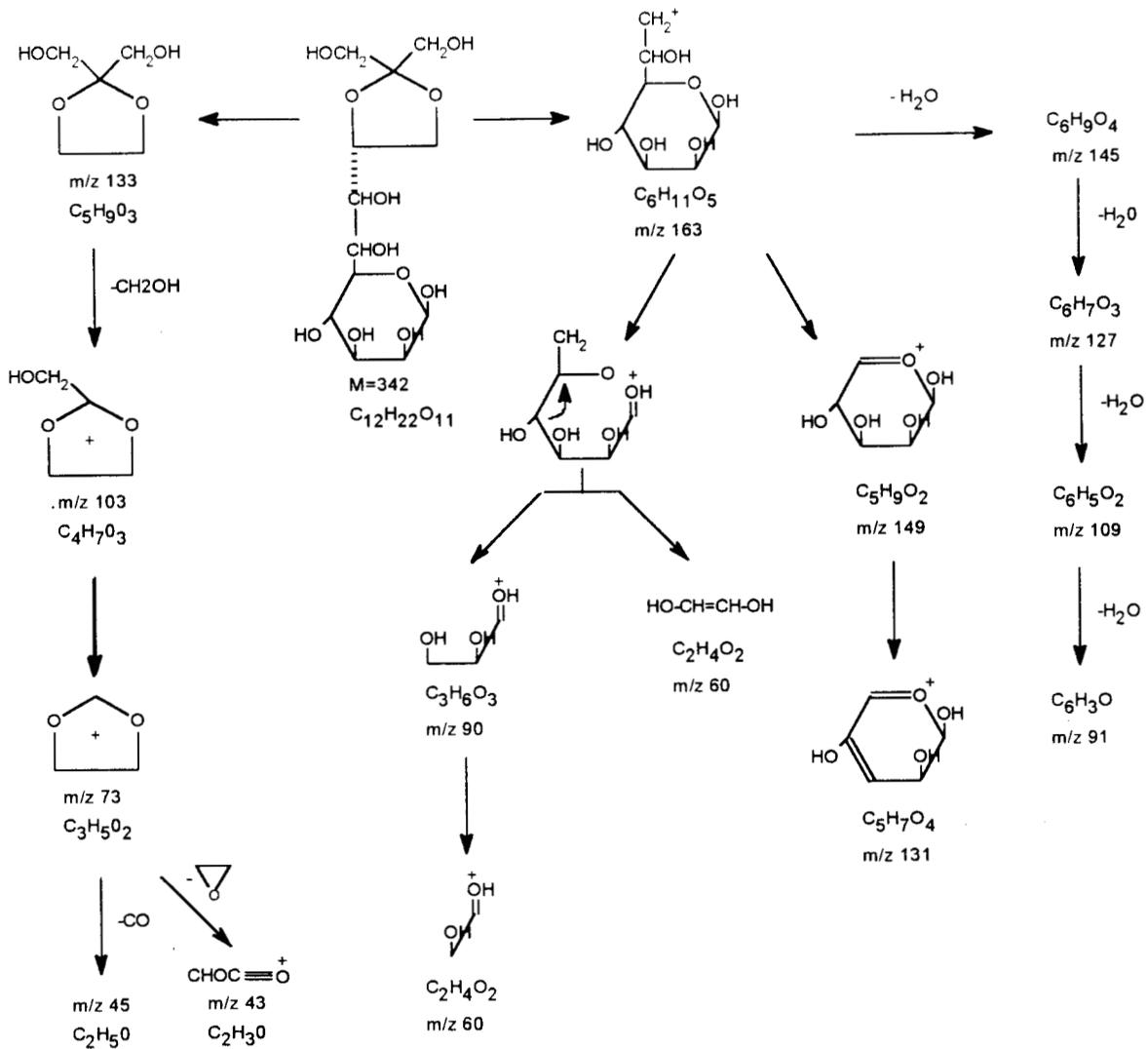


Figura 26.- Patrón de fragmentación propuesto para el saliriol

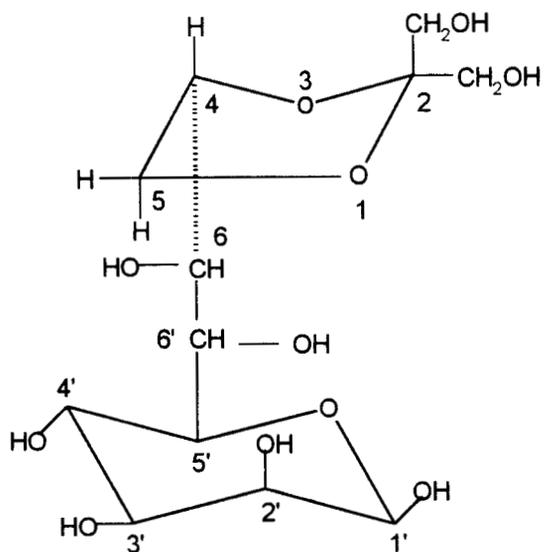


Figura 27.- 6'-(2-2 dihidroximetil-4-hidroxi metilen- 1,3-dioxolano)-β- D-manopiranososa.

El compuesto aislado de la *S. arenarius* presenta una importante disminución del nivel de glucosa sanguínea en ratones hiperglucémicos . A dosis de 50 mg/kg de saliriol el máximo efecto hipoglucémico se observa a las 6 h con 39.8% de disminución de glucosa sanguínea, comparado con la tolbutamida (50 mg/kg), cuyo efecto fue de -58.1%, al mismo tiempo. En ambos casos el nivel de glucosa sanguínea las 24 h presenta una disminución de -6.88 % y -8.24% respectivamente.

El efecto hipoglucémico de diferentes dosis de saliriol (25, 50 y 100 mg/kg) y tolbutamida (50 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos se presenta en la Figura 28 (Tabla 12) . Cuando el compuesto aislado se administró a diferentes dosis se encontró una respuesta dosis-dependiente. La máxima actividad hipoglucemiante de este compuesto (61 %) se observó entre las 4.5 y 6 h después de la administración del saliriol a dosis de 100 mg/kg. Los niveles de glucosa persisten por un periodo mayor de 24 h con 10.3% de disminución de glucosa sanguínea. El efecto mínimo se observó a las 1.5 h (20.2% reducción) seguido de la administración del compuesto. Al comparar los resultados con los obtenidos con la tolbutamida a la misma concentración (50 mg/kg) se encontró que ésta produce el 36.1% de disminución de glucosa sanguínea a la 6 h después de la administración, en cambio el saliriol (50 mg/kg) produce una disminución en los niveles de glucosa de 39.8% en el mismo tiempo.

Los resultados de la actividad hipoglucemiante del saliriol en ratones normoglucémicos a dosis de 50 y 100 mg/kg se presentan en la Figura 29 (Tabla 13). Esta sustancia produce una disminución en el nivel de glucosa sanguínea de 55.4 % a las 3 h después de la administración de una dosis de 100 mg/kg. El nivel de glucosa sanguínea fue de 18.1% (reducción) a las 24 hrs lo que indica que el efecto hipoglucémico de este compuesto es de duración similar al de la tolbutamida.

El efecto del saliriol en la prueba de tolerancia a la glucosa (Figura 30, Tabla 13) mostró que en los animales del grupo control que recibieron solución salina seguida de una administración de glucosa por vía oral de 1 g/kg incrementa notablemente la concentración de

glucosa sanguínea de 282 a 312 mg/100 ml estos niveles permanecen altos en las siguientes 2 h. El compuesto aislado de la *S. arenarius* y la tolbutamida disminuyen significativamente estos niveles elevados de glucosa de 301 y 283 a 240 y 196 mg/100 ml, respectivamente, indicando con ello que disminuye la tolerancia a la glucosa. Los grupos tratados con saliriol mostraron solamente el 7.5% de reducción de la concentración de glucosa sanguínea después de 1 h. El efecto más importante en la tolerancia a la glucosa se presentó a las 4 h (20.2 % reducción). La tolerancia a la glucosa en ratas fue significativamente alterada por el saliriol presentando una marcada capacidad de utilización de la glucosa externa con un efecto comparable al de la tolbutamida (225).

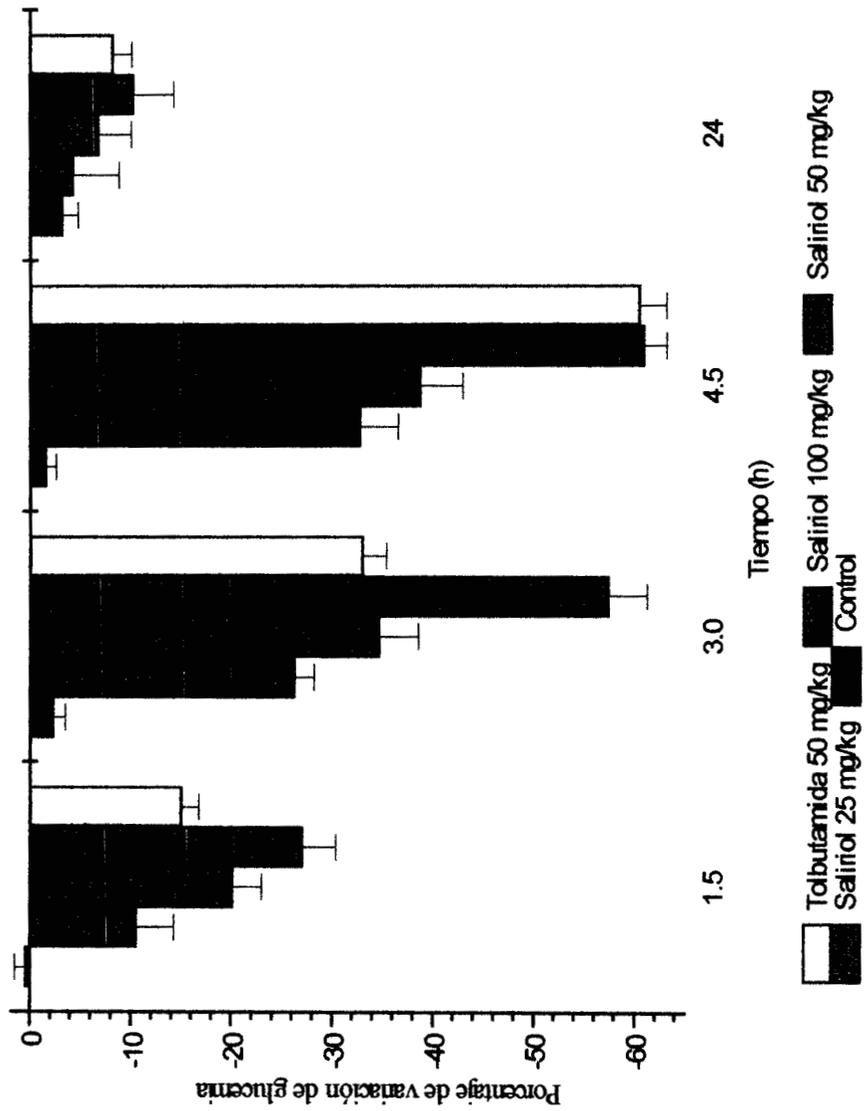


Figura 28.- Efecto de la administración del Salirol en ratones diabéticos.

Tabla 12.- Efecto de la administración del salirriol y de la tolbutamida en ratones con hiperglucemia inducida con aloxana

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)					
	Dosis (mg/kg)	Glucemia Inicial (mg/100 ml)	1.5 h	3.0 h	4.5 h	24 h
Control		216	216 ± 1.0	211 ± 1.2	212 ± 1.0	209 ± 1.0
Tolbutamida 50		234	198 ± 1.7*	156 ± 2.3	92 ± 2.7	214 ± 1.9**
Salirriol 25		256	229 ± 3.7	188 ± 1.9	172 ± 3.8*	245 ± 3.5
Salirriol 50		265	211 ± 2.8**	173 ± 3.9**	162 ± 4.0**	246 ± 2.3.
Salirriol 100		227	165 ± 3.3	96 ± 3.8*	88 ± 2.6	203 ± 4.2*

Significancia: \* p<0.001, \*\* p<0.01, n=8

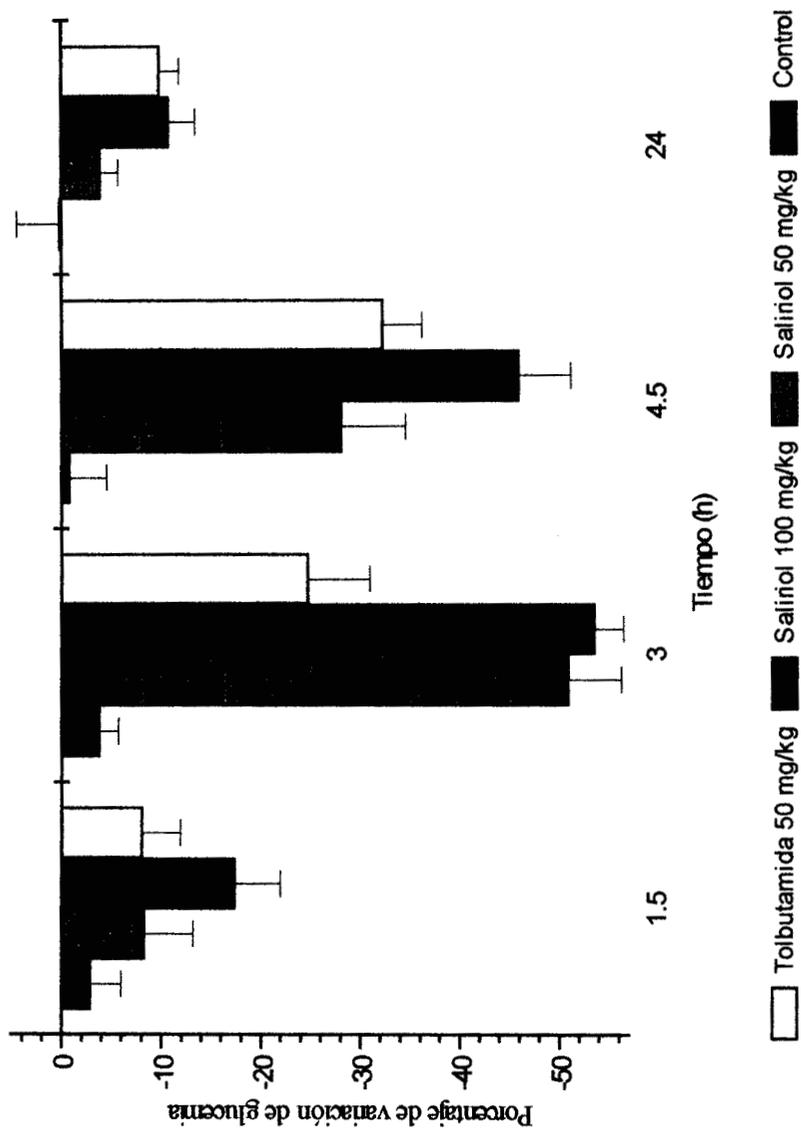


Figura 29.- Efecto de la administración del Saliníol en niveles de glucosa sanguínea en ratones normales.

Tabla 13. - Efecto de la administración del salirriol en niveles de glucosa sanguínea en ratones normales.

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M.H.D.E.)					
	Dosis (mg/kg)	Glucemia Inicial (mg/100 ml)	1.5 h	3.0 h	4.5 h	24 h
Control	107	103 ± 3.1	103 ± 1.9	103 ± 3.7	103 ± 2.98	
Salirriol 50	102	92 ± 4.9	80 ± 5.3*	73 ± 6.4	98 ± 3.67**	
Salirriol 100	98	82 ± 4.6**	54 ± 5.2*	46 ± 2.9	89 ± 2.56*	

Significancia: \*p<0.01, \*\* p<0.05, n=8.

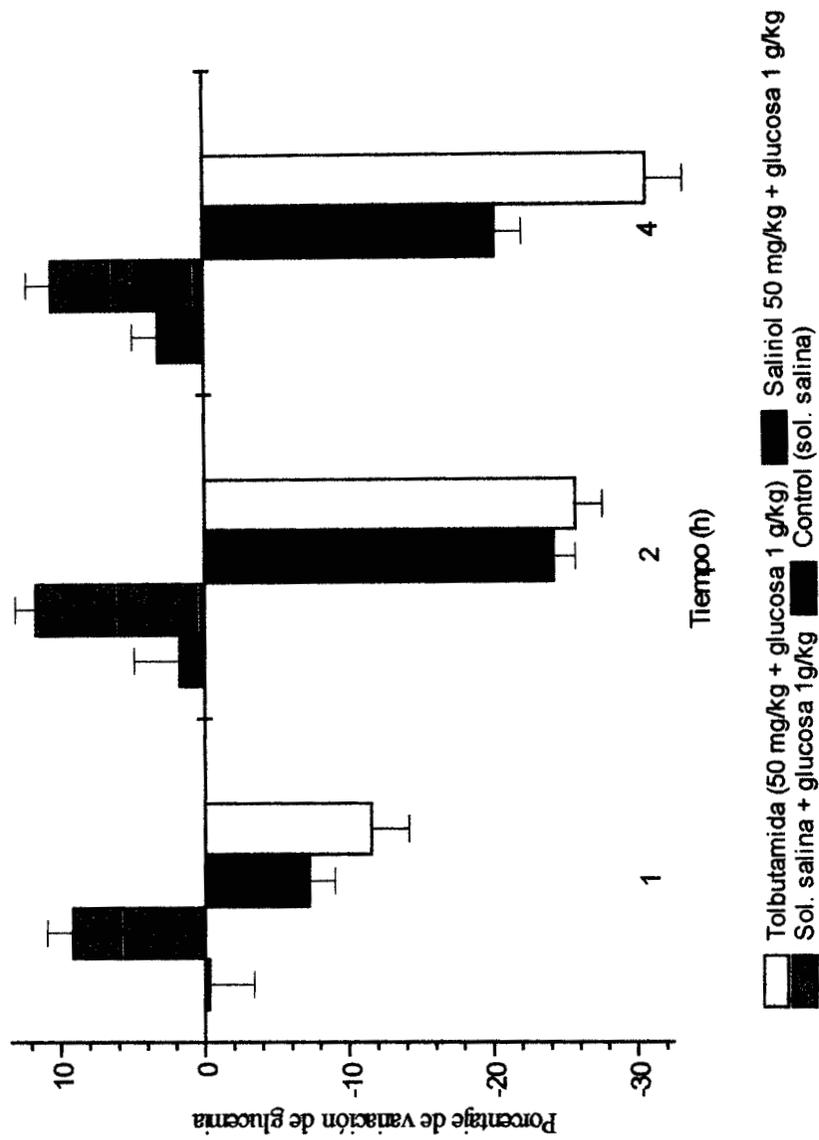


Figura 30.- Efecto de la administración del Salirol aislado de *Salpianthus arenarius* en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas.

Tabla 14.- Efecto de la administración del salinriol en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas inducida con aloxana.

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)			
	Glucemia Inicial (mg/100 ml)	1 h	2 h	4 h
Dosis (mg/kg)				
Salina (-)	279	278± 30.8	274± 30.4	270± 17.5
Salina (-) + glucosa	282	308± 17.2	315± 14.2	312± 14.2
Salinriol (50)+ glucosa	301	279± 17.2**	258± 15.2*	240± 17.8*
Tolbutamida (50) + glucosa	283	250± 25.7**	210± 23.1**	196±25.5 *

Significancia \*p<0.01, \*\*p<0.001, n = 10

El efecto hipoglucémico de la agaristina aislada de las hojas de *Agarista mexicana* en ratones diabéticos se presentan en la Figura 31 (Tabla 15). La administración de 50 mg/kg de este compuesto redujo la glucemia en 38.3% a las 3h y 52 % a las 4.5 h. En el estudio con la tolbutamida se observó que después de 3 h de la administración hay una disminución de los niveles de glucosa de 35.1% para la dosis de 50 mg/kg, y de 61.3.3% a las 4.5 h. El efecto hipoglucémico de ambos compuestos persistió por un periodo superior a las 24 h (- 9.25% para la agaristina y -8.42% para la tolbutamida). Los extractos hexánico y clorofórmico de *Agarista mexicana* no presentaron actividad hipoglucémica.

Los resultados de la actividad hipoglucemiante de la agaristina en ratones normoglucémicos se presentan en la Figura 32 (Tabla 16). Con la administración de 50 mg/kg de agaristina la máxima actividad hipoglucemiante (38.4% de reducción) se observó después de 4.5 h de la administración. La mínima actividad antidiabética (9.6% de reducción) se presentó a las 1.5 h. y el efecto persistió por un periodo mayor a las 24 h.

Los resultados del efecto de agaristina sobre la tolerancia a la glucosa se presentan en la Figura 33 (Tabla 17). El compuesto aislado de la *Agarista mexicana* y la tolbutamida disminuyen significativamente los niveles elevados de glucosa sanguínea de 244, 251 mg/100 ml, a 164 y 172 respectivamente, indicando con ello que cambian el patrón de tolerancia de la glucosa. Los grupos tratados con agaristina redujeron la glucemia en 12.7% después de 1 h. El efecto más importante en la tolerancia a la glucosa se presentó a las 4 h (27.8 % reducción). La tolerancia a la glucosa en ratas fue significativamente alterada por el agaristina presentando una marcada capacidad de utilización de la glucosa externa con un efecto comparable al de la tolbutamida.

Las figuras 34, 35 y 36 muestran la potencia relativa de la coyolosa, el saliriol y agarastina respectivamente. La dosis efectiva 50 fue de 1.65 para la coyolosa, 1.87 para el saliriol y 1.70 para la agarastina. Como en el caso de la tolbutamida los tres compuestos hipoglucemiantes presentan una relación dosis-efecto y de acuerdo a la posición de la curva la coyolosa, el saliriol y agarastina tienen potencia relativa de 0.85, 0.82 y 0.75 veces la de la tolbutamida, valores muy próximos a la de esta última.

El paralelismo de las curvas obtenidas de los tres principios activos y de la tolbutamida indican que posiblemente ejercen su efecto farmacológico a través del mismo mecanismo de acción. Es probable que la diferencia de potencia entre estos fármacos se deba a distintas afinidades por el mismo grupo de receptores o a una diferencia en la proporción de la dosis que llegue al punto o puntos de acción, o bien a una combinación de ambos factores.

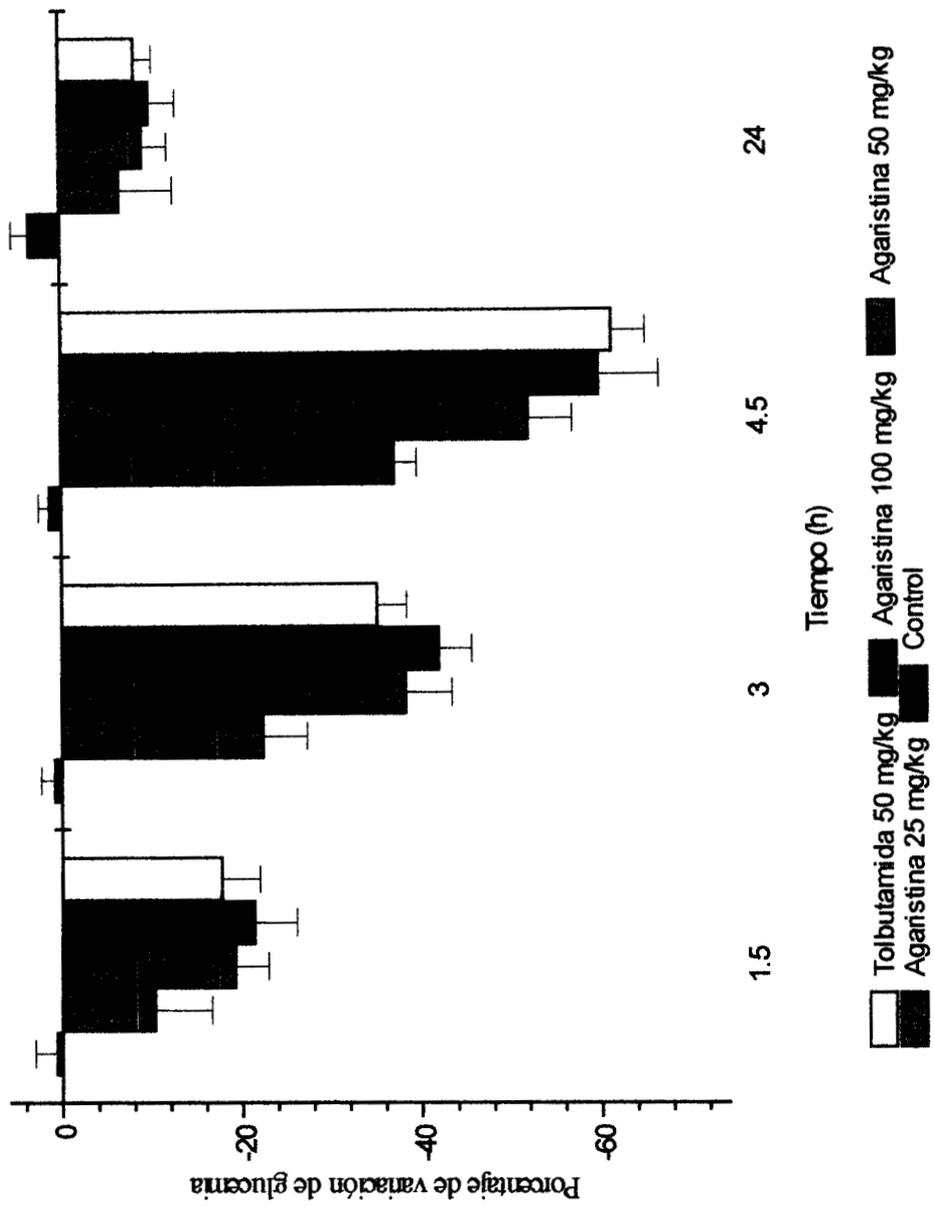


Figura 31.- Efecto de la administración de la Agaristina aislada de la *Agarista mexicana* en ratones hiperglucémicos.

Tabla 15.- Efecto de la administración de la agaristina aislada de *Agarista mexicana* en ratones con hiperglucemia

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Glucemia Inicial (mg/100 ml)	1.5 h	3 h	4.5 h	24 h
Dosis (mg/kg)					
Control	251	251±2.3	251±1.4	254±1.1	260±1.8
Tolbutamida 50	233	191±4.2**	151±3.3*	90±2.7*	213±1.9***
Agaristina 25	212	190±6.3**	164±4.1	133±2.5**	197±5.9*
Agaristina 50	276	222±3.6	170±5.1***	143±4.8*	250±2.7
Agaristina 100	242	190±4.7*	140±3.6	152±6.6***	217±2.8**

Significancia: \*p<0.001, \*\* p<0.001, \*\*\*p<0.005 n=8

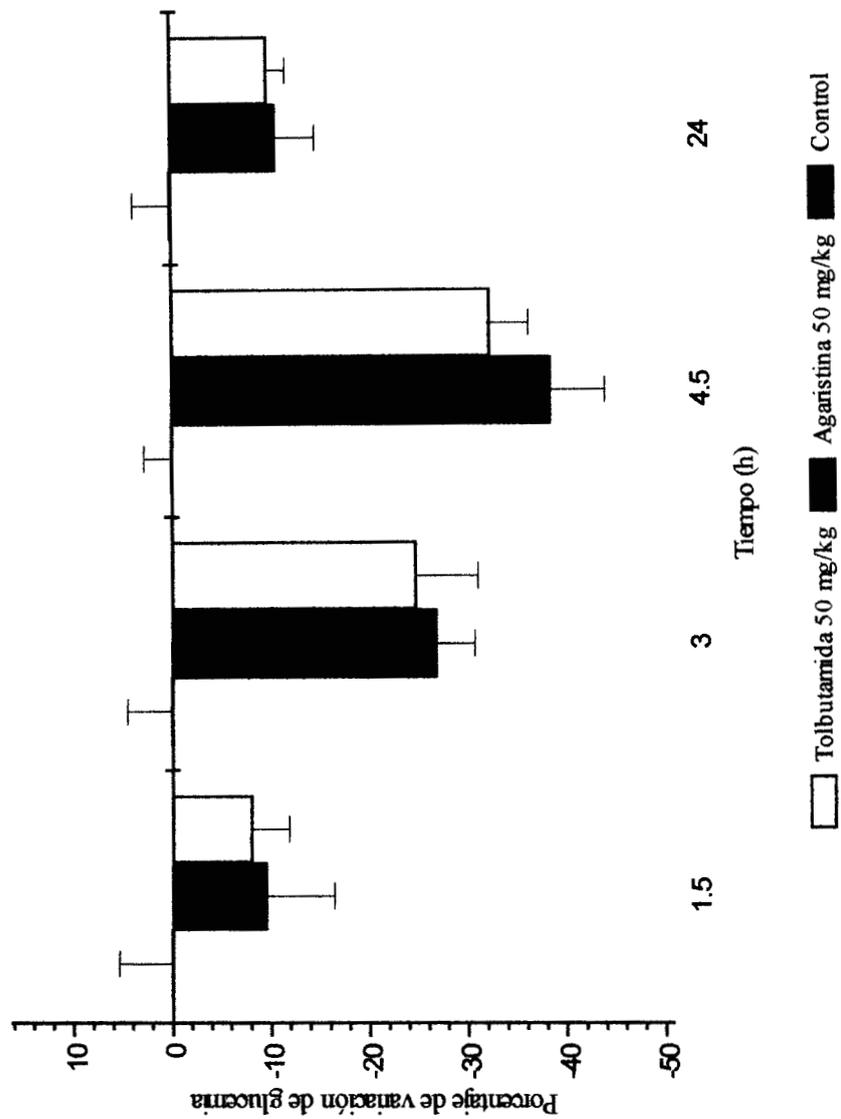


Figura 32.- Efecto de la administración de la Agaristina aislada de la *Agarista mexicana* en ratones normoglucémicos.

Tabla 16. - Efecto de la administración de la agaristina aislada de la *Agarista mexicana* en ratones normoglucémicos

Estudio		Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
Dosis (mg/kg)	Glucemia inicial (mg/100 ml)	1.5 h	3 h	4.5 h	24 h	
Control	97	97±5.3	97±4.4	97±2.7	98±3.6	
Agaristina 50	101	91±6.8**	73±3.9**	62±5.5	90±4.0*	

Significancia: \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 8$

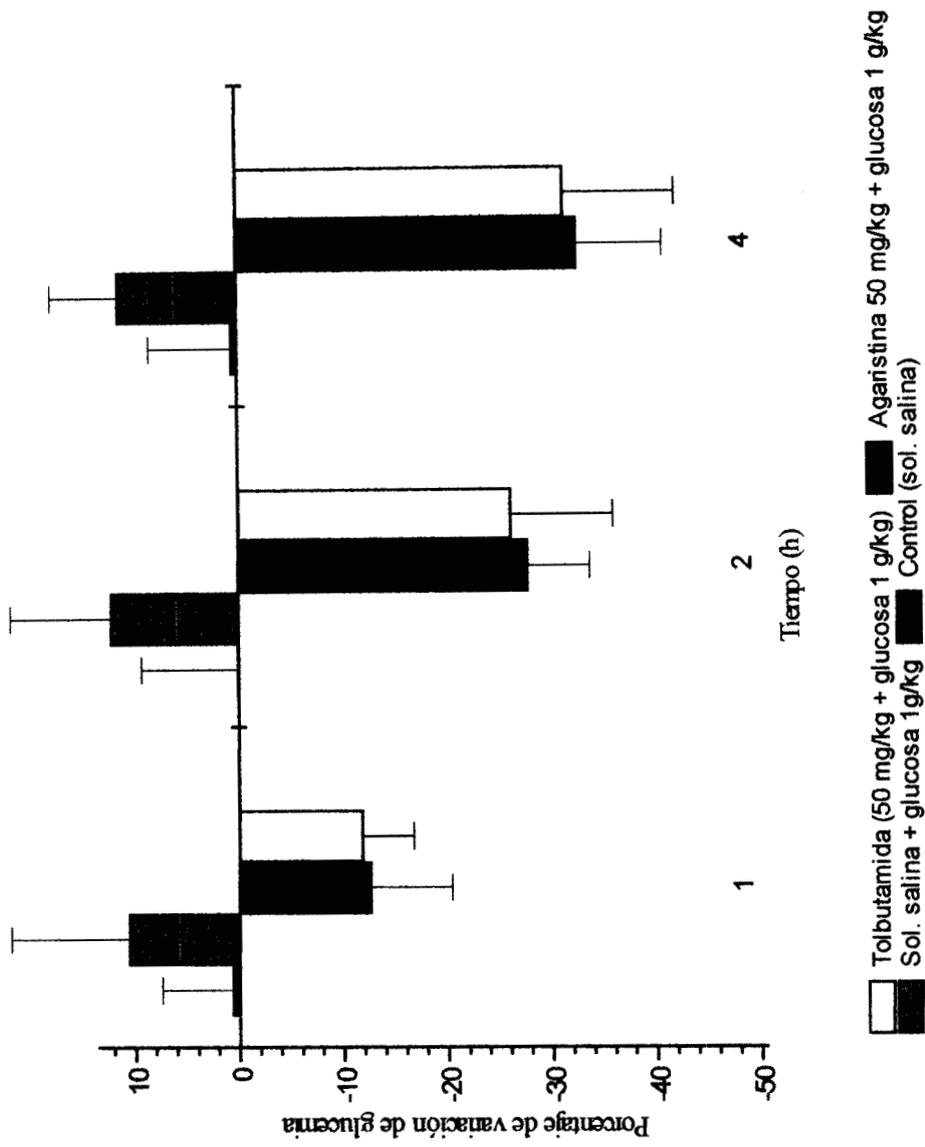


Figura 33.- Efecto de la administración de la Agaristina aislada de *Agarista mexicana* en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas.

Tabla 17.- Efecto de la administración de la agaristina aislada de *Agarista mexicana* en la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)				
	Dosis (mg/kg)	Glucemia Inicial (mg/100ml)	1 h	2 h	4 h
Salina (-)		171	171±6.7	171±9.2	172±7.8
Salina (-) + glucosa		236	261±11.2*	264±10.6	282±6.4**
Agaristina (50)+ glucosa		244	213±7.7	176±5.9*	164±8.1
Tolbutamida (50) + glucosa		251	221±4.8**	185±9.7	172±11.6*

Significancia: \*p<0.001, \*\*p<0.001, n = 10

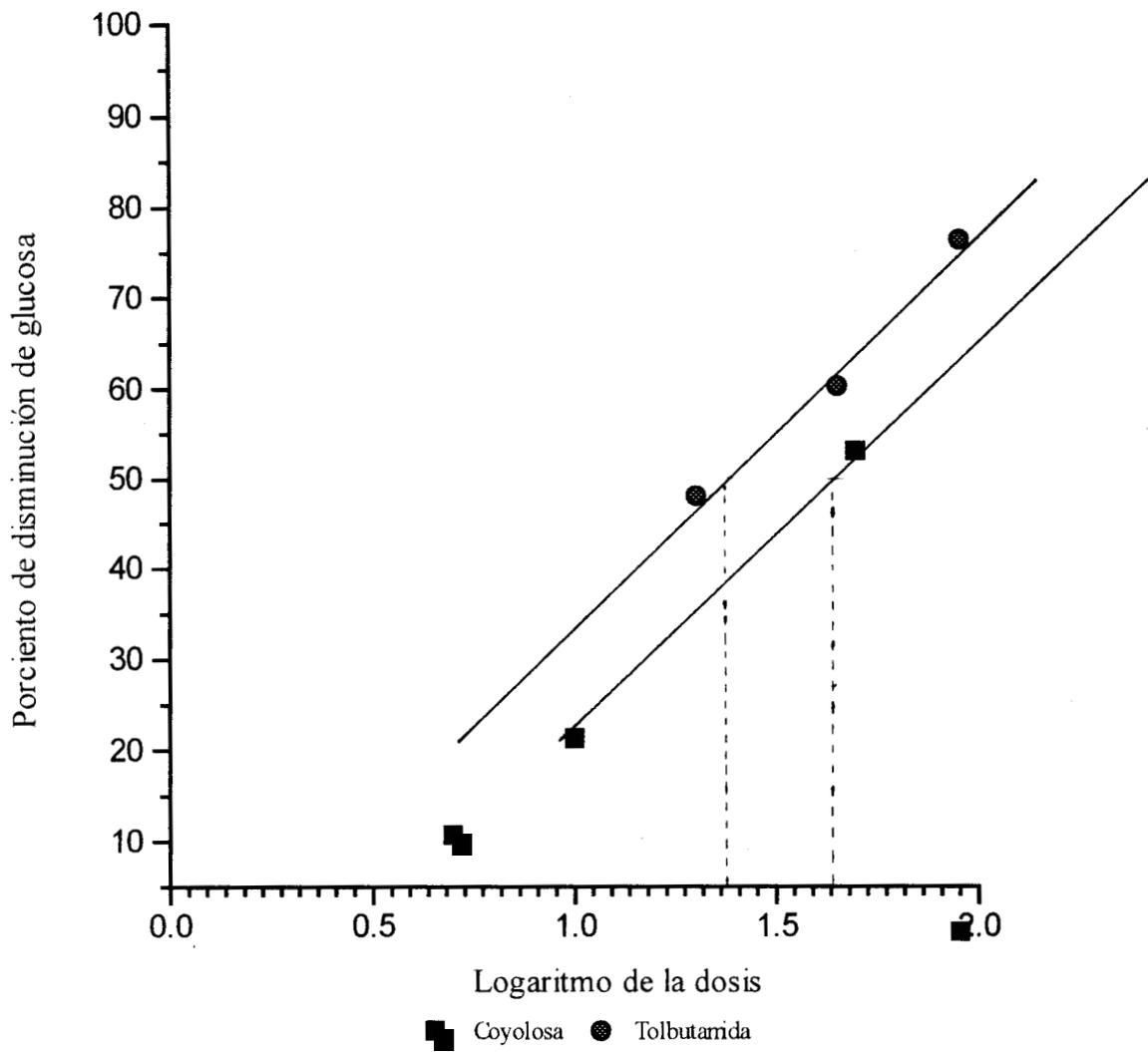


Figura 34. Determinación de la potencia relativa de la Coyolosa.

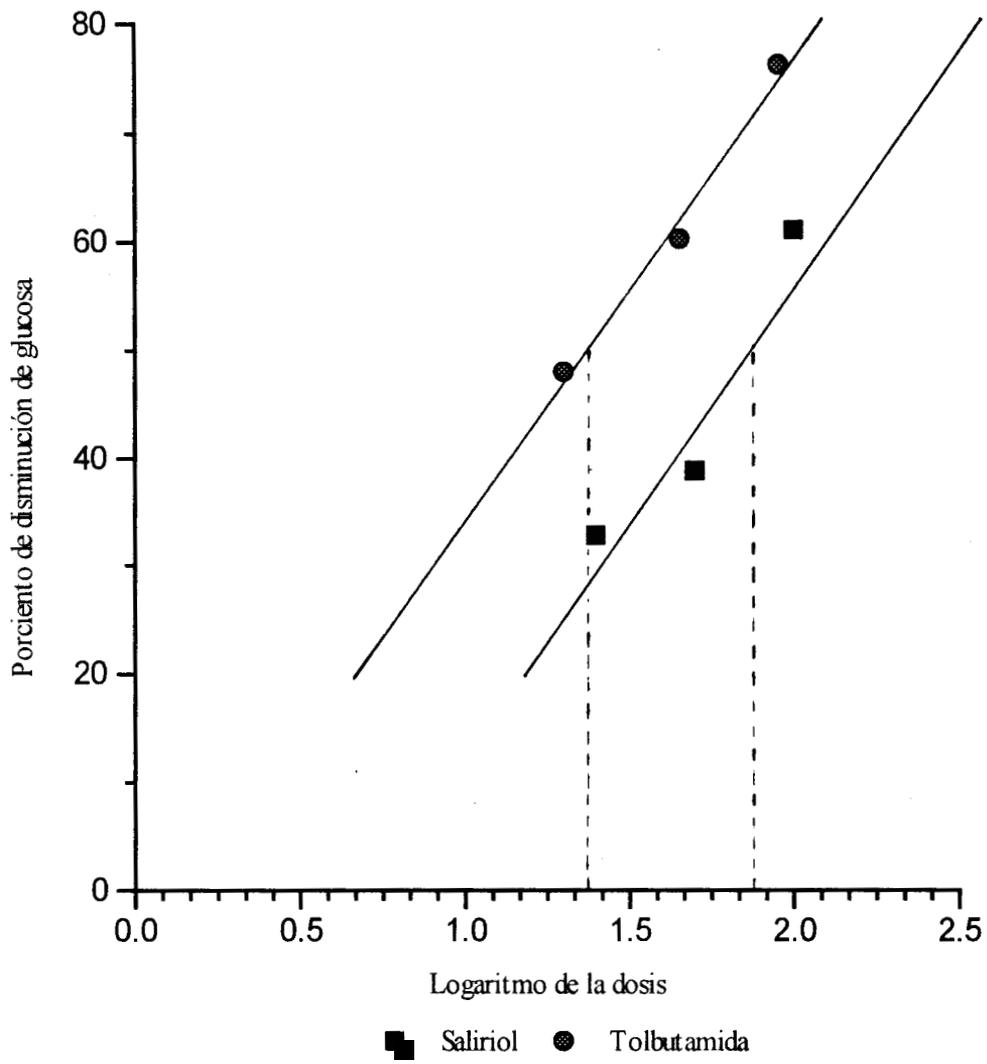


Figura 35. Determinación de la potencia relativa del Saliriol.

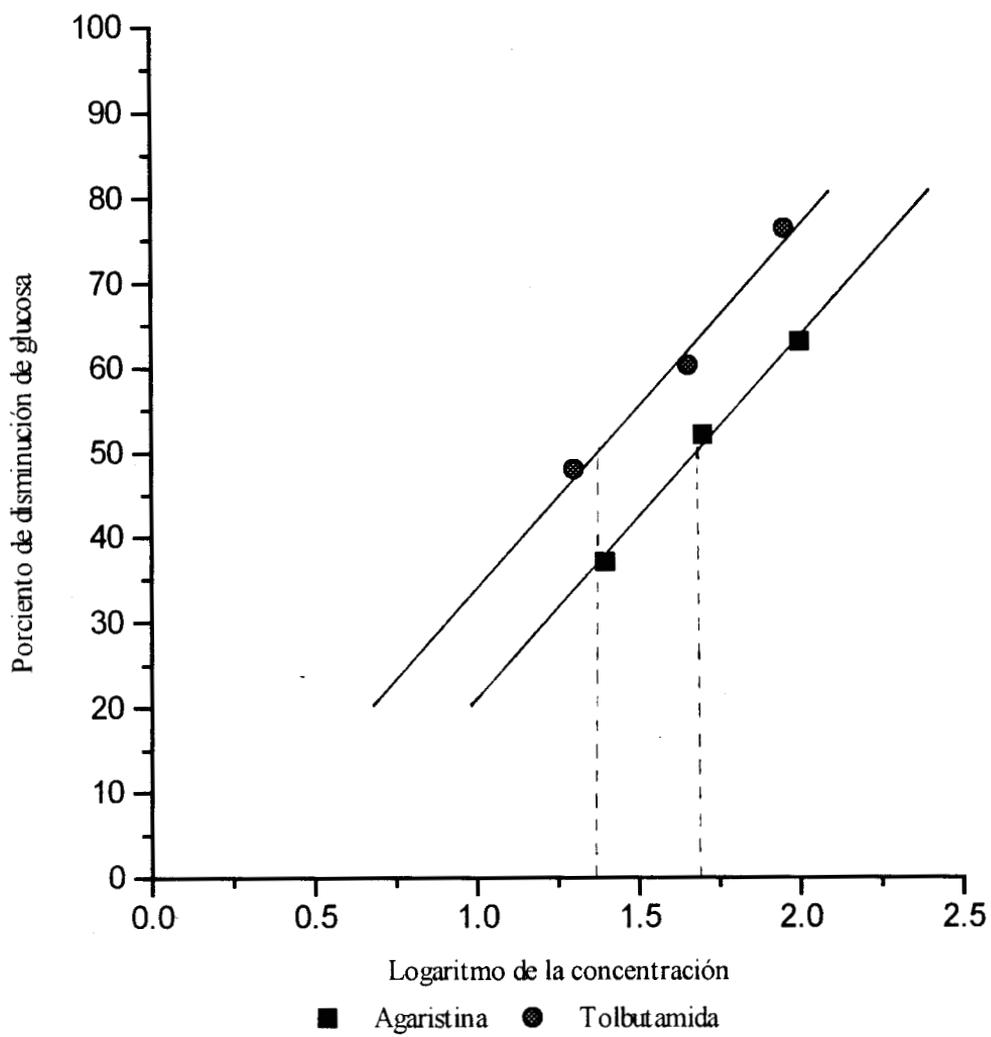


Figura 36. Determinación de la potencia relativa de la Agaristina.

Tabla 18.- Efecto de la administración de tolbutamida en ratones diabéticos

Estudio	Variación de la glucemia mg/100 ml (M±D.E.)	
Dosis (mg/kg)	Glucemia Inicial (mg/100ml)	4 h
Control	204	206± 3.6
Tolbutamida 20	238	123±5.1*
Tolbutamida 45	269	107±4.21*
Tolbutamida 90	242	58±2.45**

Significancia: \*p<0.001, \*\*p<0.001, n = 10

## CONCLUSIONES

- 1.- Las plantas *Verbecina persicifolia*, *Agarista mexicana*, *Acrocomia mexicana* y *Salpianthus arenarius* utilizadas en la medicina tradicional y folklórica para el tratamiento de la diabetes presentaron actividad hipoglucémica en ratones normales y diabéticos.
- 2.- A partir del extracto metanólico de la raíz de *Acrocomia mexicana* se aisló un nuevo disacárido al cual se le denominó “coyolosa” con propiedades hipoglucemiantes dosis-dependiente. El compuesto aislado se identificó como 6-O-β-D-galactopiranosil-6'-O-β-D-galactosa.
- 3.- La coyolosa presentó una disminución significativa en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos y normoglucémicos. En ratas diabéticas la coyolosa produce un cambio en el patrón a la tolerancia a la glucosa.
- 4.- El efecto hipoglucémico de la coyolosa es menor de 24 h en comparación con la actividad de la tolbutamida que es de duración más prolongada. Los resultados de este estudio muestran que el compuesto aislado de la raíz de la *Acrocomia mexicana* posee una importante actividad hipoglucemiante en animales normales e hiperglucémicos. Por lo que podemos decir que el efecto del compuesto en estudio comienza más rápidamente el de la tolbutamida pero el tiempo de duración de este último es más prolongado.
- 5.- A partir del extracto metanólico de la raíz de *Salpianthus arenarius* se aisló un compuesto con actividad hipoglucemiante, al cual se le denominó “saliriol”. El compuesto aislado se identificó como: 6'-((2,2-dihidroximetil-4-hidroxi metileno-1,3-dioxolano)-β-D-manopiranososa.
- 6.- El saliriol presentó actividad antidiabética en ratones normales y diabéticos mostrando una fuerte actividad hipoglucemiante dosis-dependiente. En ratas diabéticas el saliriol produce un aumento a la tolerancia a la glucosa.
- 7.- Los resultados de este estudio muestran que el compuesto aislado de la raíz de la planta *Salpianthus arenarius* posee una importante actividad hipoglucemiante en animales normales e hiperglucémicos. El efecto hipoglucémico del saliriol fue comparado con la actividad

hipoglucemiante de la tolbutamida mostrando que este efecto es de duración similar al de ésta.

8.- A partir del extracto clorofórmico de *Agarista mexicana* se aisló un compuesto con propiedades hipoglucemiantes al cual se le denominó "agaristina" con propiedades hipoglucemiantes dosis-dependiente.

9.- La agaristina presentó actividad hipoglucemiante en ratones normales y diabéticos. En ratas diabéticas la agaristina produce un aumento en la tolerancia a la glucosa.

10.- La actividad hipoglucemiante de la agaristina fue comparada con la actividad hipoglucemiante de la tolbutamida mostrando que es de duración similar a ésta.

11.- La coyolosa, el saliriol y agarastina tienen potencia relativa de 0.85, 0.82 y 0.75 veces la de la tolbutamida, valores muy próximos a la de esta última.

12.- Como producto de esta tesis se publicaron los siguientes artículos:

Actividad farmacológica de diferentes extractos de la raíz de *Salpianthus arenarius*. (1995) S.

Pérez G. M.A., Zavala, R.M., Pérez G. R., Vargas S., C. Pérez G. Rev. Mexicana de Ciencias

Farmacéuticas. Vol. 26, No 3, pp 22- 24

Effect of *Agarista mexicana* and *Verbecina persicifolia* on blood glucose level of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice and rats. R.M. Perez G., S. Perez G., M.A. Zavala S., C. Perez G.

(1996) Phytotherapy Research Vol 10, 351-353

Coyolosa a new hypoglycemic from *Acrocomia mexicana*. S. Perez G., R.M. Perez G., C. Perez

G. M.A., Zavala S. R., Vargas S. (1996). Pharmaceutica Acta Helvetiae 157: 342

REVIEW: Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. (1997). R.M. Perez G., S.

Perez G., M.A. Zavala S. Intern. J. Phytotherapy and Phytopharmacology (En prensa).

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Levin and Munksgaard. (1937). The Papyrus Ebers: The Greatest Egyptian Medical Document. Copenhagen, Levin and Munksgaard.
- 2.- Stocker, W. (1966). Aportación de la Historia de la Diabetes Mellitus. Edit. Therapiewoche, Buenos Aires, Argentina. pp. 102-163.
- 3.- Caádel, V.J. (1973) Libro de Diabetes. Ed. Rocas Barcelona, España. pp. 40-45.
- 4.- Peniche, F.M. (1979). Diabetes mellitus. Semana Médica de México. Vol. XLVI, (6). 234-241.
- 5.- Harrison, F; Tinsley, R; (1991). Medicina Interna. vol. 2. Editorial Interamericana México. pp. 321-342.
- 6.- Katosoyannis, P.G. (1963). Insulin peptides IX: the synthesis of A-chain of insulin and its combination with natural B-chain to generate insulin activity. J. Am. Chem. Soc. vol 85 2836-2865.
- 7.- Katosoyannis, P.G. (1966). The chemical synthesis of human and sheep insulin. Am. J. Med. vol. 40: 652-661.
- 8.- Stanley, L.R; Angel, A. (1978). Patología Básica. Segunda Edición. Ed. Interamericana México D.F. pp. 126-135.
- 9.- Jubiz, W. (1988). Endocrinología Clínica. El Manual Moderno: México. 107-123.
- 10.- Mehnert, F. (1977). Enfermedades del Metabolismo. Edit. Salvat. Madrid, España. pp. 45-49.

- 11.- Jarret, R.J.; Keen H. (1976). Hyperglycemia and diabetes mellitus. *The Lancet* vol. 6: 1009-1012.
- 12.- Krupp, M.A.; Chatton, M.J. (1983). *Current Medical Diagnosis & Treatment*. Lange Medical Publications pp.743-756.
- 13.-World Health Organization: Definition, diagnosis and classification. Diabetes mellitus Report of a WHO Study Groups. Geneva, World Health. Org. 1985 (Tech. Rep. Ser. No 727).
- 14.- Shimada, A.; Charlton, B.; Taylor, C.; Fathman, G. (1996).  $\beta$ -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in obese diabetic mice. *Diabetes* vol. 45: 1063-1067.
- 15.-Simpson, H.C.; Carter, R.; Lousley, S.(1993) The diabetes control and complications trial. Research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes. *N. Eng. J. Med.* vol. 329: 977-986.
- 16.- Kahn, S.E.; Prigeon, R.L. (1993) Quantification of the relation between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. *Diabetes* vol. 42: 1663-1672.
- 17.- Soo, K.; Furler, S.M.; Samaras, K.; Jenkis, A.; Campbell, L.; Chistholm, D. (1996). Glycemic responses to exercise in IDDM after simple and complex carbohydrate supplementation. *Diabetes Care* vol. 19: 575- 579.
- 18.- Koivisto, V.; Felig, P. (1978) Effects of leg exercise on insulin absorption in diabetic patients. *N. Engl. J. Med.* vol. 298: 79-83.
- 19.- Zinman, B.; Murray, F.T.; Vranic, M.; Albisser, A.M.; Leibel, B.S.; Mcclean, P.A. (1977). Glucoregulation during moderate exercise in insulin treated diabetics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*vol. 45: 641-652.
- 20.- Melander, A. (1988) Non-insulin-dependent diabetes mellitus; Treatment with sulphonylureas. *Clin. Endocrinology and Metabolism* 455-476.

- 21.- Hanson, R.; Pettitt, D.; Bennett, P.H.; Narayan, K.M.; Fernandes, R.; Courten, M.; Knowler, C. (1996). Familial relationships between obesity and NIDDM. *Diabetes* vol. 45: 418-422.
- 22.- Barnett, A.H.; Eff, C. (1981) Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* vol. 20: 87-93.
- 23.- Kaprio, J.; Tuomilehto, J.; Koskenvuo, M.; Romanov, K.; Reunanen, A.; Eriksson, J.; Stengard, J. (1992). Concordance for type I insulin-dependent and type 2 non-insulin-dependent diabetes mellitus in a population based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* vol. 35: 1060-1067.
- 24.- Knowler, W.C.; Pettitt, D.J.; Savage, P.J.; Bennett, P.H. (1981). Diabetes incidence in Pima Indians: contributions of obesity and parental diabetes. *Am. J. Epidemiol.* vol. 113: 144-156.
- 25.- Lee, E.T.; Anderson, P.S.; Bahr, C.; Conoglionone, T.; Cleves, M. (1985). Diabetes parental and obesity in Oklahoma Indians. *Diabetes Care* vol. 8: 107-113.
- 26.- Morris, R.D.; Rimm, D.L.; Hartz, A.J.; Kalhoff, R.K. (1989) Obesity and heredity in etiology of non-insulin-dependent diabetic mellitus in 32,662 adult white woman. *Am. J. Epidemiol.* vol. 130: 112-121.
- 27.- Rich, S.S. (1990). Mapping genes in diabetic genetic epidemiological perspective, *Diabetes* vol. 39:1315-1319.
- 28.-Bouchard, C. (1989). Genetic factors in obesity. *Med. Clin. North. Am.* vol. 73, pp 67-81.
- 29.- Knowler, W.C.; Pettit, D.J.; Saad, M.F.; Bennett, P.H. (1991) Obesity in the Pima Indians; its magnitude and relationship with diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* vol. 53: 1543S-1551S.
- 30.- Fujimoto, W.Y.; Leonetti, D.L.; Newell, M.; Shuman, W.P. (1990). Relationship of absence or presence of family history of diabetes to body weight and body fat distribution in type 2 diabetes. *Int. J. Obes.* vol 15: 111-120.

- 31.- Hara, T.; Nakamura, J.; Koh, N.; Sakakibara, F.; Takeuchi, N. (1996). An importance of carbohydrate ingestion for the expression of the effect of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor in NIDDM. *Diabetes Care* vol. 19: 642-647.
- 32.- American Diabetes Association: Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus. (1995). *Diabetes Care* vol. 18 (Suppl.1), 16-19.
- 33.- British Diabetes Association's Medical Advisory Committee Nutrition Sub-Committee: dietary recommendations for the 1980s: a policy statement by the British Diabetes Association (1982). *Hum. Nutr. Appl. Nutr.* vol. 36: 378-386.
- 34.- Turner, R.; Hattersley, T.; Shaw, J.; Levy, J. (1996) Perspectives in diabetes type II diabetes: Clinical aspects of molecular biological studies. *Diabetes* vol 46: 1-10.
- 35.- Eriksson, J.; Franssila, A.; Ekstrand, A.; Saloranta, C. (1989) Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* vol. 321: 321-337.
- 36.- Beard, J.C.; Ward, W.K.; Halter, J. (1987). Relationship of islet function to insulin action in human obesity *J. Clin. Endocrinol. Metab.* vol. 65: 59-64.
- 37.- Rudenski, A.S.; Hadden, P.R.; Arkinson, A. (1988). Natural history of pancreatic islet beta-cell function in type 2 mellitus studied over six years by homeostasis model assessment. *Diabetes Med.* vol. 5: 34-41.
- 38.- Zamora, A. (1989). *Diabetes Mellitus Bases para su Tratamiento*, Ed. Trillas. México D.F. pp. 67-78.
- 39.- Hodge, A.; Montgomery, J.; Dowse, G.; Mavo, B. (1996). A case- control study of diet in newly diagnosed NIDDM in the Wainigela people of Papua New Guinea. *Diabetes Care* vol 19: 457-560.
- 40.-American Diabetes Association: Policy statement; nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus. (1994). *Diabetes Care* vol.17: 519-522.

- 41.- Parillo, M.; Giacco, R.; Ciardullo, A.V.; Rivelles, A.A. (1996) Does a high-carbohydrate diet have different effects in NIDDM patients treated with diet alone or hypoglycemic drugs. *Diabetes Care* vol. 10: 498-500.
- 42.- Garg, A.; Bonanome, A.; Grundy, S.M.; Zhang, Z.J.; Unger, R.H. (1988) Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated-fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* vol. 319: 828-834.
- 43.- Hollenbeck, C.B.; Coulston, A.M. (1991) Effects of dietary carbohydrate and fat intake on glucose and lipoprotein metabolism in individual with diabetes mellitus. *Diabetes Care* vol.14: 774-785.
- 44.-Riccardi, G.; Rivelles, A.A. (1991) Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoproteins metabolism in diabetic patients . *Diabetes Care* vol. 14: 1115-1125.
- 45.- Abbott, W.G.; Boyce, V.L.; Grundy, S.M; Howard, B.V. (1989) Effects of replacing saturated fat with complex carbohydrate in diets of subjects with NIDDM. *Diabetes Care* vol. 12: 102-107.
- 46.- Muller-Wieland, D.; Streicher, R.; Siemeister, G.; Krone, W. (1993). Molecular biology of insuline resistense. *Exp. Clin. Endocrinol.* vol. 101: 17-29.
- 47.- Charles, R; Graig, D; Robert, E; Stitzel, F. (1990). *Modern Pharmacology*. Third Edition, Little Brown and Company, USA. pp.98-143.
- 48.- Meyer, F.H;; Juwats, F;; y Golfein, A. (1987). *Manual de Farmacología Clínica*. El Manual Moderno, S.A. México pp. 424-440.
- 49.- Krail, L. (1980). *Manual de Diabetes*. CECSA. México D.F. pp. 23-45.
- 50.- Goldstein, A;; Aronow, L, ; Kalman, M. (1990). *Farmacología* . Editoreal Limusa. 3 edición México D.F. pp. 138-142.
- 51.- Goodman, A.S; Gilman, L. (1992). *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica* Ed. Interamericana, septima edición, Editorial Médico Panamericana, México .pp. 1270-1292.

- 52.- Burton, B. Human Nutrition (1978) Third edition. Mc Graw-Hill Book Company. pp. 280-285.
- 53.- Rizza, R.a.; Gerich, J.E.; Haymond, M.W.; Westland, R.E.; Hall, L.D.; Clemens, A.H.(1980). Control of Blood sugar in insulin-dependent diabetes: comparison of an artificial endocrine pancreas, continuous subcutaneous insulin infusion, and intensified conventional insulin infusion, and intensified conventional insulin therapy. N. Engl.J. Med. vol. 303: 1313-1318.
- 54.- Kawamori, R.; Bando K.; Yamasaki, Y.; Kubota, M.; Watarai, T.; Iwata, N.(1989). Fasting plus prandial insulin supplements improve insulin secretory ability in NIDDM subjects. Diabetes Care vol.12: 680-685.
- 55.- Tattersall, R.B.; Fajans, S. (1975). Diabetes and carbohydrates tolerance in 199 offspring of 37 conjugal diabetic patients. Diabetes vol. 24: 452-462.
- 56.- Slavina, E.S.; Madanat, Y.; Pankov, Y.; Syrkin, A.L. (1987). Diabetes mellitus and arteriosclerosis . N. Eng. J. Med. vol. 318: 317-836.
- 57.- Stout, R. W. (1994). Impact of insulin upon arteriosclerosis. Horm. Metab. Res. vol.26: 125-128.
- 58.- Ito, H.; Harano, Y.; Susuki, M.; Hattori, Y.; Takeuchi, M.; Inada, H.; Inoue, J.; Kawamori, R.; Murase, T.; Ouchi, T. (1996). Risk factor analyses for macrovascular complication in obese NIDDM patients. Diabetes vol. 45: S19-S23.
- 59.- Hokskinsen, P.; Manttari, M.; Manninen, V.; Huttunen, J.K. (1992). Coronary heart disease incidence in NIDDM patients in the Helsinki heart study. Diabetes Care vol.15: 820-825.
- 60.- Takeda, R.; Shimizu, M. (1994) Ischemic heart disease in patients with diabetes mellitus. Diabetes Res. Clin. Pract. vol. 24 (Suppl.): S199-S203.
- 61.- Kameyana, M.; Fushini, H.; Udaka, F. (1994) Diabetes mellitus and cerebral vascular disease. Diabetes Res. Clin. Pract. vol. 24 (Suppl.): S205-S208.

62.- Kannel, W.B.; McBee, D.L.(1979) Diabetes and cardiovascular risk factors: The Framingham study. *Circulation* vol. 59: 8-13.

63.- Randle, P.J.; Garland, P.B.; Hales, C.N.; Newsholme, E.A.; Denton, R.M. (1966) Interaction of metabolism and the physiological role of insulin. *Recent Prog. Horm. Res.*vol. 22: 1-48.

64.- Heinemann, L.; Richter, B. (1993) Clinical pharmacology of human . *Diabetes Care* vol. 16 (suppl. 3): 90-100.

65.- Amiel, S.A.; Sherwin, R.S.; Simonson, D.C.; Tamborlane, W.V. (1988) Effect of insulin therapy on glycemic threshold for counterregulatory release. *Diabetes* vol. 37: 901-907.

66.-Egger, M.; Smith, G.D.; Imboof, H.; Teusher A. (1991) Risk severe hypoglycemic in insulin treated diabetic patients transferred to human insulin case-control study. *Br. Med. J.* vol. 303: 617-621.

67.- Susuki, M.; Ikebuchi, M.; Shinozaki, K.; Hara, Y.; Tsushima, M.; Matsuyama, T.; and Harano, Y. (1996). Mechanism and clinical implication of insulin resistance syndrome. *Diabetes* vol. 45: S52-S54.

68.- Pfeiffer, E.F. (1987) On the way to the automated blood glucose regulation in diabetes: The dark past, the grey present and the rosy future. *Diabetologia* vol.30: 51-65

69.- Unger, R.H.; Foster, D.W. (1985) Diabetes mellitus In: *Williams text-book of Endocrinology* 7th ed. W.B. Saunders Philadelphia. pp. 1018-1080.

70.- Ferner, R.E. (1988) Oral hypoglycemic agents. *Med. Clin. N. Amer.* vol. 72:1323-1335.

71.- Beck-Nielsen, H.; Vaag, A.; Damsbo, P.; Handberg, A.; Nielsen, O.H. (1992) Insulin resistance in skeletal muscle in patients with NIDDM. (1992) *Diabetes Care* vol. 15: 418-429.

72.- Sistori, C.R.; Pasik, C. (1994) Reevaluation of a biguanide, metformin: mechanism of action and tolerability. *Pharmacol. Res.* vol. 30: 187-228.

73.- Peters, A.L.; Sgambato, S.; Pizza, G.; Passariello, N.; Varricchio, M. (1991) Insulin plus a sulfonylurea agent for treating type II diabetes. *Ann. Intern. Med.* vol. 115: 45-53.

74.- Olefsky, M.; Kolterman, O. (1982). Insulin action and resistance in obesity and non-insulin dependent type II diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* vol. 243: E15-E30.

75.- Brunzell, J.D.; Lerner, R.L.; Hazzard, W.R.; Porte, D.; Bierman, E.L. (1971) Improved glucose tolerance with high carbohydrate feeding in mild diabetes. *N. Eng. J. Med.* vol. 284: 521-524.

76.- Parillo, M.; Rivellese, A.A.; Ciardullo, B.; Giacco, A.; Genovese, S. (1992) A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* vol. 41: 1373-1378.

77.- Riccardi, G.; Rivellese, A.A. (1993) An update on monounsaturated fatty acids. *Curr. Opin. Lipidology* vol. 4: 13-16.

78.- Shima, K.; Shi, K.; Mizuko, A.; Sano, T.; Ishida, K. (1996) Exercise training has a long-lasting effect on prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rats. *Metabolism* vol. 45: 475-480.

79.- Burstein, R.; Polychronakos, C.; Toews, C.J. (1985) Acute reversal of the enhanced insulin action in trained athletes. *Diabetes* vol. 34: 756-760.

80.- Mikines, K.J.; Sonne, B.; Farrell, P.A. (1988) Effect of physical exercise on sensitivity and responsiveness to insulin in humans. *Am J. Physiol.* vol. 254: E248-259.

81.- Leblanc, J.; Nadeau, A. (1981). Studies on the sparing effect of exercise on insulin requirements in human subjects. *Metabolism* vol. 30: 1119-1124.

82.- Kang, J.; Robertson, R.; Hagberg, J.; Kelley, D.; Goss, F.; DaSilva, S. (1996) Effect of exercise intensity on glucose and insulin metabolism in obese individuals and obese NIDDM patients. *Diabetes Care* vol. 19: 341-349.

83.- Kolaczynski, J.W.; Caro, J.F. (1994) Insulin-like growth factor-1 therapy in diabetes: physiologic basis, clinical benefits, and risks. *Ann. Intern. Med.* vol. 120: 47-55.

- 84.- Myers, W.O.; Schaff, H.V.; Gersh, B.J.; Fisher, L.D. (1989). Improved survival of surgically treated patients with triple vessel coronary disease and severe angina pectoris. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* vol. 97: 487-495.
- 85.- Califf, R.M.; Harrell, F.E.; Lee, K.L. (1989) The evolution of medical and surgical therapy for coronary artery disease: a 15 year perspective. *JAMA* vol.261: 2077-2086.
- 86.- Zuanetti, G.; Latini, R.; Maggioni, A.P.; Santoro, L. (1993) Influence of diabetes on mortality in acute myocardial infarction: data from GLSSI-2 study. *J. Am. Coll. Cardiol.* vol.22: 1788-1988.
- 87.- Herlitz, J.; Malmberg, K.; Karlson, B.W. (1988) Mortality and morbidity during a five-year follow-up in diabetics with myocardial infarction. *Acta Med. scand.* vol. 224: 31-38.
- 88.- Herlitz, J.; Brandrup, G.; Haglid, M.; Karlson, B.W.; Westberg, S. (1996). Mortality and morbidity in diabetic and nondiabetic patients during a 2-year period after coronary artery bypass grafting. *Diabetes Care* vol.19: 698-703.
- 89.- Gill, G.V. (1988) Problems of diabetic care in tropical countries. *Practical Diabetes* vol. 5: 156-158.
- 90.- Información Estadística Sector Salud y Seguridad Social. (1985). Vol. 3. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, México D.F.
- 91.- Información Estadística Sector Salud y Seguridad Social.(1993). Vol. 11. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, México D.F.
- 92.- Dirección General de Epidemiología: Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Sistema Nacional de encuestas de Salud. Mexico D.F. Secretaria de Salud (1993).
- 93.- De la Fuente J.R. (1995). El perfil de Salud: México, 1995. *Médico Moderno* Vol. 34: 20-28.
- 94.- British Diabetic Association (BDA). Programa "INTERLAC" of Electronic Mail. *Diabetes/faq/part 1*. Copyright 1993-1994 por Edward Reid.

- 95.- Center for Economic Studies in Medicine; direct and Indirect Cost of Diabetes in the United States in 1987. American Diabetes Association, Alexandria, VA.
- 96.- Bransome, E.D. (1992) Financing the care of diabetes mellitus in the US. *Diabetes Care* vol. 15 (Suppl.1): 1-5.
- 97.- Soejarto, D.D.; Farnsworth, N.R. (1989) Tropical rain forests; Potential source of new drugs. *Perspectives in Biol. and Med.* vol. 32: 244-256.
- 98.- Bailey, J.C.; Day, C. (1989). Traditional Plants Medicine as treatment for Diabetes. *Diabetes Care*, vol. 12 (8): 553-564.
- 99.- Pushpa, K.; Jain, S.C.; Panagariva, A.; Dixit, V.P (1981). Hypoglycemic activity of polypeptide from a plant source. *J. Nat Prod.* vol.44 (6): 648-655.
100. - Meir, P.; Yaniv, Z. (1982).The Insulin-reasing Activity of the tropical Plant *Momordica charantia*. *Act. Biol. Med. Cer.* vol. 41: 1229-40.
- 101.- Nagarajan, S.; Jain, H.C.; Aulakh, G.S. (1982) Indigenous plants used in the control of diabetes in cultivation and utilization of medicinal plants. Ed. Regional Research Laboratory Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi, India. pp 584-604
- 102.- Thorne, R.F. (1981) Phytochemistry and angiosperm phylogeny. A sumary statement, In: *Phytochemistry and angiosperm phylogeny* (D.A. Young D.S. Seiglet eds.). Praeger Scientific New York. pp 233-295.
- 103.-Alarcón, F.J; Román, R. R; Flores, S.; J.L. Plantas Medicinales Usadas en el Control de la Diabetes Mellitus. (1993). *Ciencia*, Vol. 44, num. 3: 363-380.
- 104.- Pelt, J.A. (1979). Las Plantas Medicinales Florecen de Nuevo. *El Correo de la Unesco*, Julio, año XXXII, vol. 9: 10-13.
- 105.- Tomoda, M.; Shimizu, N.; Oshima, Y.; Takahashi, M.; Murakami, M.; Hikino, H.; (1987) Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. *Planta Med.* vol. 106: 8-12.

106.- Takahashi, M.; Konno, C.; Hikino, H. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of anemarrans A,B,C, and D glycans of *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes, *Planta Med.* vol. 51: 100-102.

107.- Hikino, H.; Takahashi, M.; Konno, C. (1986). Isolation and Hypoglycemic activity of arborans A and B glycans of *Aloe arborescens* var *natalensis* . *International Journal of Crude Drug Research* vol. 24: 183-186.

108.- Konno, C.; Susuki, Y.; Oishi, K.; Munakata, E.; Hikino, H. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of attractans A,B and C glycans of *Atractylodes japonica* rhizomes. *Planta Med.* vol. 51: 102-103.

109.- Takahashi, M.; Konno, C.; Hikino, H. (1986). Isolation and hypoglycemic activity of coixan A, B and C of *Coix Lachryma-jobi* var *ma-yuen* seeds. *Planta Med.* vol. 52: 64-65.

110.- Hikino, H.; Konno, C.; Takahashi, M.; Murakami, M.; Kato, Y.; Karikura, M. (1986). Isolation and hypoglucemic activity of dioscorans A, B, C, D, E, and F glycans of *Dioscorea japonica* rhizophors. *Planta Med.* vol. 52: 168-171.

111.- Hikino, H.; Takahashi, M.; Konno, C. (1986). Antidiabetic drugs, isolation and hypoglycemic activity of eleutheran A, eleutheran B, eleutheran C, eleutheran D, eleutheran E, eleutheran F, eleutheran G glycans of *Eleutherococcus senticosus* roots J. *Nat Prod.* vol. 49: 293-295.

112.- Konno, C.; Mizuno, T.; Hikino, H. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of ephedrans A,B,C,D and E glycans of *Ephedra distachya* herbs. *Planta Med.* vol. 51: 162-163.

113.- Hikino, H.; Takahashi, M.; Oshima, Y.; Konno, C. (1988). Isolation and hypoglycemic activity of oryzabrans A,B,C and D glycans of *oryza sativa* Bran *Planta Med.* vol. 54: 1-3.

114.- Tomoda, M.; Gonda, R.; Kasahara, Y.; Hikino, H. (1986). Glycans structures of ganoderans B and C hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bondies. *Phytochemistry* vol. 25, 2817-2820.

- 115.- Masashi, T.; Noriko, S.; Ryoko, G.; Mieko, K.; Haruki, Y.; Hikino, H. (1990). Anti-complementary and hypoglycemic activities of the glycans from the seeds of *malva verticillata*. *Planta Med.* vol. 56 : 168-170.
- 116.- Konno, C.; Mizuno, T.; Hikino, H. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of lithospermas A, B and C glycans of *Lithospermum erythrorhizon* roots. *Planta Med.* vol. 51: 157-158.
- 117.- Hiroshi, H.; Miki, Y.; Yutaka, S.; Yoshiteru, K.; Chohachi, K. (1989). Isolation and hypoglycemic activity of thrichosans A,B,C,D and E glycans of *Trichosanthes kirilowii* roots. *Planta Med.* vol. 55: 349-350.
- 118.- Takahashi, M.; Konno, C.; Hikino, H. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of saccharans A,B,C,D,E and F glycans of *Saccharum officinarum* stalks. *Planta Med.* vol. 51: 258-260.
- 119.- Hikino, H.; Mizuno, T.; Oshina, Y.; Konno C. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root barks. *Planta Med.* vol. 51: 159-160.
- 120.-Viguera, L.M.; Casanueva, A. (1965). Hypoglycemic activity in the genus *Centaurea*. IV ammonium sulfate fractionate of active peptides. *Farmacognosia* vol. 25: 89-102.
- 121.- Kumar, G.P.; Sudheesh, S.; Vijayalakshmi, N.R. (1993). Hypoglycaemic effect of *Coccinia indica*. Mechanism of action . *Planta Med.* vol. 59: 330-332.
- 122.- Gomathy, R.; Vijayaleskdhmi, N.R.; Kurup, P.A. (1990). Hypoglycemic action of the pectin present in the juice of the inflorescence stalk of the plantain (*Musa sapientum*) J. *Biosci.* 15: 297-303.
- 123.- Tomoda, M.; Shimada, K.; Konno, C.; Sugiyama, K.; Hikino, H. (1984). Partial structure of panaxan A, a hypoglycemic glycan of *Panax Ginseng* roots. *Planta Med.* vol. 50: 436-437.
- 124.- Gueven, K.C.; Aktin, E.; Koyuncuoglu, H.; Bergisadi, N. (1974). Lipolytic and hypoglycemic compounds obtained from *Cystoseria barbata*. *Arzneim-Forsch* vol. 24: 144-147.

- 125.- Singh, K.N.; Chandra, V. (1977). Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of proteins of *Acacia milanoxyton* and *Bauhinia retusa* wild leguminous seeds in young albino rats. J. Indian Med. Assoc. vol. 68: 201-203.
- 126.- Oshima, Y.; Sato, K.; Hikino, H. (1987). Isolation and hypoglycemic activity of quinquefolans A,B, and C glycans of *Panax quinquefolium*. J. Nat. Prod. vol.53: 188-190.
- 127.- Leeds, A.R. Legume diets for diabetic (1981) J. Plant foods vol. 3: 219-223.
- 128.- Forestieri, A.M.; Galati, E.M.; Trovato, A.; Tumino, G. (1989) Effects of guar and carob gums on glucose, insulin and cholesterol plasma levels in the rats. Phytother. Res. vol.3: 1-4.
- 129.- Briani, G.; Bruttomesso, D.; Bilardo, D.; Giorato, G. (1987) Guar-enriched pasta and guar gum in the dietary treatment of type II diabetes,. Phytother. Res. vol. 1: 177-179.
- 130.- Tomoda, M.; Shimizu, N.; Gonda, R.; Kanari, M.; Murakami, M.; Hikino, H. (1990) Anti-complementary and hypoglycemic activities of the glycans from the seed of *Malva verticillata*. Planta Med. vol. 56: 168-170.
- 131.- Hikino, H.; Kobayashi, M.; Susuki, Y.; Konno, C. (1989) Mechanisms of hypoglycemic activity of Aconitan A, a glycan from *Aconitum carmichaeli* roots. J. Ethnopharmacol.vol. 25: 295-304.
- 132.- Susuki, Y.; Hikino, H. (1989) Mechanism of hypoglycemic activity of panaxans A and B glycans of *Panax ginseng* roots; Effects on key enzymes of glucose metabolism in the liver of mice. Phytother Res.vol. 3: 15-19.
- 133.- Hikino, H.; Konno, C.; Mirin, Y.; Hayashi, T. (1984) Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta Med. vol.55: 423-428.
- 134.- Sheehan, E.W.; and Zemantis, M.A. (1983). A constituent of *Pterocarpus marsupium* (-)-epicatechin, as a potential antidiabetic agent. J. Nat. Prod. vol. 46, No 2: 232-234.

- 135.- Khosa, R.L.; Pandey, V.B.; and Singh, J.P. (1985). Experimental studies on *Zizyphus rugosa* (lam) bark. *Indian Drugs* vol. 20: 241-243.
- 136.- Hii, C.S.T; and Howell, S.L. (1985). Effects of flavonoids on insulin secretion and  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  handling in rat islets of Langerhans . *J. of Endocrinology* vol. 107: 1-8.
- 137.- Coterill, P.; Scheinmannan, F.; Stenhouse, I. (1976). Kolaflavanone an new biflavone from *Garcinia kola*. *J. Chem. Soc. Perkins Trans.* 532-539.
- 138.- Basnet, P.; Kadota, S.; Shimizu, M.; Namba, T. (1994). Bellifolin: A potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica* .*Planta Med.*vol. 60: 507-511.
- 139.- Hii, C.S.T.; Howell, S.L. (1984). Effects of epicatechin on rat islets of Langerhans. *Diabetes* vol. 33: 291-296.
- 140.- Rahman, A.U.; Zaman, K. (1989). Medicinal plants with hypoglycemic activity *J. Ethnopharmacol.* vol. 26: 1-55.
- 141.- Cuellar, A.; Stevez, P. (1980). A phytochemical study of Cuban plants. *Rev. Cubana Farm.* vol.14: 63-68.
- 142.- Shigemasa, H. (1992). Partial purification of crude gymnemic acids by affinity chromatography and effects of purified fractions on the oral glucose tolerance test in rats . *Yonago Igaku Zasshi.* vol. 43: 350-364.
- 143.- Sampairo, E.M.; Furtado, F.A.S.; Furtado, J.S.; Cavalacante, MNM.; and Riedel, O.O. (1979). Hypoglycemic producing activities of raw coffee beans (*Coffea arabica*). *Rev. de Medicina da Universidade Federal Doceara* vol.19: 49-54.
- 144.- Harbone, J.B.; and Baxter, H. (1993). *Phytochemical dictionary and handbook of bioactive compound from plants.* Ed. Burgess Science Press Basingstoke London pp. 12-567.
- 145.- Nobrega, R.; Almeida, J.; Barbosa, J.M.; Ramnath, S.N. (1985). Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *Bumelia sartorum*. *J. of Ethnopharmacol.* vol. 14:173-185.

- 146.- Villar, A.; Paya, M.; Hortiguera, M.D.; Cortes, M. (1986). Tormentico acid , a new hypoglycemic agent from *Poterium ancistroides*. *Planta Med.*vol. 52: 43-45.
- 147.- Reza-Ul-Jalil, J.; Hasan, C.M. (1986). Hypoglycemic activities of the glycosides of *Momordica cochinchinensis*. *J. of Bangladesh Academy Science* vol.10: 25-30.
- 148.- Tommasi, N.; Simone, F.; Cirino, G.; Cicala, C.; and Pizza, C. (1991). Hypoglycemic effect of Sesquiterpene Glycosides and Polyhydroxylated Triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. *Planta Med.*vol. 47: 414-416.
- 149.- Smolyar, V.I.; Karpilovskaya, E.D.; Sali, N.S.; Tsapko, E.V.; Lavrushenko, L.F.; Gulich, M.P. (1992). Evaluation of saccharo, a new sweetening preparation from *Stevia rebaudiana* in experiments on rats. *Vopr. Pitan.* vol.1: 60-63.
- 150.- Chung , J.N.; Joo, H.K. (1986). Hypoglycemic action of ginsen saponins on streptozotocin induced diabetes in rats *Koryo Insam Sinica* vol. 21: 401-406.
- 151.- Yamahara, J.; Mibu, H.; Sawada, T.; Fujimore, H. (1981). Biologically active principles of crude drugs. Antidiabetic principles of *Corn fructus* in experimental diabetes induced by streptozotocin . *Yakugaku Zasshi* vol.101: 86-90.
- 152.- Mishinkinsky, S.; Goldschmied, A.; Altronson, Z.; Sulman, F.G. (1974). Hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum* and *Lipinus termis* (Leguminosae) seeds and their major alkaloids in alloxan-diabetic and normal rats. *Arch. Int. Pharmacodynamyc* vol. 210: 27-37.
- 153.-Hammouda, Y.; Amer, M.S. (1966). antidiabetic effect of tecomine and tecostanine. *J. Pharm. Sci.*vol. 55: 1452-1454.
- 154.- Iwu, M.; Okunji, C.O.; Akah, P. T. (1990). Dioscoretine the hypoglycemic principle of *Dioscorea dumetorum*. *Planta Med.* vol. 56: 119-120.
- 155.- Ferris, J.P. (1962). Isolation and structural studies of the alkaloids of *Decadon verticillatus*. *J. Org. Chem.* vol. 27: 2985-2990

- 156.- Petric, J.; and Kalodera, Z. (1982). Galeginin: Toxicity, antidiabetic activity and content determination. *Acta Pharm. Yugoslavica* vol. 32: 219-223.
- 157.- Boyadzhieva, N. (1982). Study on the influence of the plant *Lepidium ruderale* on the course of experimental sugar diabetes with absolute insuline insufficiency. *problemina-V-Treshinata Meditsina* vol. 10: 125-130.
- 158.- Mitsubischi Chemic Industries Co. LTD (1982). Lathyrines as hypoglycemic . *Japan Kokai Tokyo* vol. 82: 35- 51.
- 159.- Monsereenunurson, R. (1980). effect of *Capsaicum anuum* on blood glucose level . *Quaterly Journal of Crude Drug Research* vol. 18: 137-145.
- 160.- Qiming, C.; and Mingzhi, X. (1986). Hypoglycemic effect of *Coptis chinensis* extract and berberine . *Yaoxue Xuebao* vol. 21: 401-406.
- 161.- Svoboda, G.H.; Gorman, M.; Root, M.A. (1989) Alkaloids of *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*) XXVIII. A preliminary report on hypoglycemic activity. *Lloydia* vol. 27: 361-363.
- 162.- Noble, R.L.; Beer, C.T.; Cutts, J.H. (1958) Role of chance observation in chemotherapy. *Vinca rosea* .*Ann N.Y. Acad. Sci.* vol. 76: 882-894.
- 163.- De, A.U.; Saha, B.P. (1975) Indolizines II. Search for potential oral hypoglycemic agents. *J. Pharm. Sci.* vol. 64: 249-252.
- 164.- Satoshi, O.; Yuruzu, Y.; Yoko, S. (1976) Production of quinoline-2-methanol and quinoline-2-methanol-acetate by a new specie of *Kitasatoa* , *Kitasatoa griseophaeus*. *J. Antibiot.* vol. 29: 797-803.
- 165.- Karawya, M.S.; Wahab, S.M.; Farrag, N.M. (1984). Diphenylamine, a antyhyperglycemic agent from onion and tea *J.Nat. Prod.* vol. 47: 775-780.
- 166.- Manhajan, V.R.; Jolly, C.I. (1985). A new hypoglycemic agent from *Tinospora cordifolia* . *Miers Indian Drugs* vol. 23: 119-120.

- 167.- Kanamuro, T.; Shinagawa, S.; Asai, M.; Okazaki, H. (1985). Emeriamine and antidiabetic  $\beta$ -aminobetaine derived from a novel fungal metabolite. *Life Sciences* vol 27: 217-223.
- 168.- Stermeo, J. (1982). Pharmacology and mode of action of the hypoglycemic guanidine derivatives in oral hypoglycemic agents. Campbell GD. De. New York, Academic Press. pp.191-245.
- 169.- Senior, A.E.; and Sherratt, H.S.A. (1967). The effect of penta-4-enoic acid and somer simple related compounds on the oxidation of fatty acids by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* vol. 104: 56-59.
- 170.- Snell, K. (1979) Non-hormonal hypoglycaemic compounds. Hypoglycaemia caused by indole and quinoline derivatives. *Bioch. Soc. Trans.* vol. 7: 745-749.
- 171.- Augusti, K.T.; Roy, V.C.M. (1974) Effect of allyl propyl disulphide isolated from onion (*Allium cepa*) on glucose tolerance of alloxan diabetic rabbits. *Experientia* vol. 30: 119-120.
- 172.- Tanaka, K.; Isselbacher, K.J.; Shih, V. (1972) Isovaleric and  $\alpha$ -methylbutyric acidemias induced by hypoglycin A: mechanism of Jamaican vomiting sickness. *Science* vol.175: 69-71.
- 173.- Oliver, C.; Bever, B.; Zahnd, G.R. (1979) Plants with oral hypoglycaemic action *Quart.J. Crude Drug Res.* vol. 17: 139-196.
- 174.- Akhtar, M.S.; Khan, Q.M.; Khaliq, T. (1984). Effects of *Euphorbia prostata* and *Fumaria parviflora* in normoglycaemic and alloxan-teated hyperglycaemic rabbits. *Planta Med.* pp. 138-140.
- 175.- Akhtar, M.S.; Ali, M.R. (1985). Study of hypoglycaemic activity of *Cuminum nigrum* seeds in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Med.* pp. 81-85.
- 176.- Lamela, M.; Cadavid, J.; and Calleja, J.M. (1986). Effects of *Lythrum salicaria* extracts on hyperglycemic rats and mice. *J. of Etnopharm.* vol. 15: 153-160.
- 177.- Chuclá, M.T.; Lamela, M.; Gato, A.; and Cadavid, I. (1988). *Centaurea corcubionensis* stdy of its hypoglycaemic activity in rats. *Planta Med.* pp.107-109.

- 178.- Dhanmugasundaram, K.R.; Panneerselvam, C.; Samudram, P. (1983). Enzyme changes and glucose utilisation in diabetic rabbits: The effect of *Gymnema sylvestre*, Rbr. J. of Ethnopharm. vol.7: 205-234.
- 179.- Elfellah, M.S.; Akhter, M.H.; and Khan, M.T. (1984). Anti-hyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. J. of Ethnopharm.vol. 11: 275-281.
- 180.- Nobrega, R.A.; Almeida, J.M.; Barbosa, F.; Rammath, S.N. (1985). Chemistry and Pharmacology of an Ethanol Extract of *Bumelia sartorum*. J. Ethnopharmacol. vol.14: 173-185.
- 181.- Pérez, G.; R.M; Ocegueda, A; Muñoz, L; Avila, J.G. (1984). A Study of the Hypoglucemic Effect of Some Mexican Plants. J. of Ethnopharmacology vol.12: 253-256.
- 182.- Fansworth, N.O; Akerele, A; Bingel, D; Soejarto. (1989). Hypoglycemic effect of *Agrimonia eupatoria*. Bol. of Sanit. Panam. vol.107: 314-316.
- 183.- Mirsky, L.A.; Diengott, D.; Perisutti, G. (1956) The hypoglycemic and insulinase-inhibitory action of some plant growth regulators. Endocrinology vol. 59: 715-718.
- 184.- Oliver-Bever, B. (1980) Oral hypoglycemic plants in West Africa .J. Ethnopharmacol.vol. 2 : 119-127.
- 185.- Herold, K.C.; Tamara, N.; Vaiva, N.; Sun, Q. (1996) Diabetes Induced with low doses of streptozotocin is mediated by V $\beta$ 8.2+ T-cells. Diabetes vol. 44: 354-359,
- 186.- Rosen, P.; Herberg, L.; Reinauer, H.; Toput, B. (1986) Different types of postinsulin receptor defects contribute to insulin resistance in hearts of obese Zucker rats. Endocrinology vol. 119: 1285-1291.
- 187.- Kanamaru, T.; Shinagawa, S.; Asai, M.; Okazaki, H.; Sugiyama, Y.; Fujita, T.; Iwatsuka, H. (1985) And antidiabetic  $\beta$ -aminobetaine derived from a novel fungal metabolite. Life Sci.vol. 37: 217-223.

188.- Lenzen, S.; Panten, U. (1988) History and mechanism of action alloxana. Diabetologia vol. 31: 337-342.

189.- Noboyufi ,T.; Ichiro, K.; Takayuki, A. (1991). Streptozonin and Alloxan-Induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation and DNA Fragmentation in Pancreatic Islets. Diabetes. vol. 40:1141-1143.

190.- Fantus, I.G.; Chayoth, R.; Marliss, E.B.; Yale, J.F. (1987) Insulin binding and transport in adipocytes in neonatal streptozocin-injected rat model of diabetes mellitus. Diabetes vol. 36:654-660.

191.- Ricordi, C.; Finke, E.H.; Lacy, P.E. (1986) A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. Diabetes vol. 35: 649-653.

192.- Lienhard, G.E.; Slot, J.W.; Mueckler, M.M. (1992) How cells absorb glucose. Scientific Amer. vol. 266: 86-91.

193.- Salhanick A.L.; Konowitz, P.; Amatruda, J.M. (1983) Potentiation of insulin action by a sulfonyleurea in primary cultures of hepatocytes from normal and diabetic rats. Diabetes vol. 32: 206-212.

194.- McClain, D.A.; Olefsky, J.M. (1988) Evidence for two independent pathways of insulin-receptor internalization in hepatocytes and hepatoma cells. Diabetes vol. 37: 806-815.

195.- Susuki, Y.; Hikino, H. (1989) Mechanism of hypoglycemic activity of panaxans A and B glycosides of *Panax ginseng* roots; Effects on plasma level, secretion, sensitivity and binding of insulin in mice. Phytother Res. vol. 3: 20-24.

196.- Wright, P.H.; Makulo, D.R.; Vichick, D.; Sussman, K.E. (1971) Insulin immunoassay by back-titration. Some characteristics of the technique and the insulin precipitant action of alcohol. Diabetes vol. 20: 33-45.

197.- Yalow, R.S. (1978) Radioimmunoassay; a probe for the fine structure of biological systems. Science vol. 200: 1236-1245.

198.- Wayne, W. D.; (1992) Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a Ed. Limusa, Grupo Noriega Editores pp 48-56.

- 199.- Douglas, C. M.; (1991) Diseño y análisis de experimentos. Ed. Grupo Editorial Iberoamericano pp 48-52.
- 200.- Sidney, O.; Krasnoff (1967) Computer in Medicine. Ed. Springfield pp 67-78.
- 201.- Dixon, W.J. ; Brown, M.B. (1979) Biomedical computer programs P-series. Ed. BMDP, University of California Press, Berkeley. pp 210-217.
- 202.- Nie, H. N.; Hadlai, H.J.; Jenkis; K.S.; Bent, H. D.; (1975) SPSS Statistical Package for the Social Sciences, 2a Ed. Mc Graw-Hill, New York.
- 203.- The IMSL Library, vols. 1-3 (1979) International mathematical and statistical libraries, Ed. Inc. Dallas, Texas.
- 204.- Ryan, A. T.; Brian, L.J.; Ryan, B.F. (1976) Minitab Student Handbook Ed. Duxbury Press, North Scituate, Mass.
- 205.- Barr A.J.; Goodnight, J.P.; Helwing, J.T. (1979) A user's guide to SAS 79, Ed. Institute. Inc. Raleigh, N.C.
- 206.- Dixon, W.J. Jennrich R.L. (1972) Scope, impact, and status of packaged statistical programs. Annual Review of Biophysical and Bioengineering I, 505-528.
- 207.- Mart, H. (1836). History Natural Palm *Acrocomia mexicana* karw. United States National Herbarium vol. 3: 138-141.
- 208.- Amo, Rodríguez; Silvia. (1979) Plantas medicinales del Estado de Veracruz INIRB. Xalapa, Veracruz 279-280.
- 209.- Mendieta, R. M. (1981). Plantas Medicinales del Estado de Veracruz, Editorial CECSA INISRB. Xalapa, Veracruz. pp 428-430.
- 210.- Pérez ,G. S; Pérez, G.R.M; Perez, G. C; Vargas ,S. R. (1992). Hypoglycemic Effect of *Acrocomia mexicana* Karw. *φYTON* 53 : 39-42.

- 211.- Rzedowski, J. (1981). Vegetación de México. Editorial Limusa. México D.F. pp 29-22.
- 212.- Martinez, M. (1969) Plantas Medicinales de México. Ed. Botas, México D.F. pp 16-23
- 213.- Zavala, A.M.; Pérez, G. R.M.; Vargas, R.S.; Pérez, G. C. (1995) Actividad farmacológica de diferentes extractos de la raíz de *Salpianthus arenarius*. Rev. Mex. de Ciencias Farmacéuticas vol. 26: 22-24.
- 214.- R.M., Pérez G.; S. Pérez G. (1992). Parasympathomimetic Activity of Salpantiol a New Cyclitol from *Salpianthus arenarius*. Pharm. Acta Helv. vol. 67 : 5-6 156.
- 215.- Díaz, J.L. (1977). Monografías Científicas II. Uso de las Plantas Medicinales de México. pp 56-73
- 216.- Hafez, E.C. (1970). Reproduction and breeding. Techniques for laboratory animals Ed. E.S.E. Hafez Phil. Lea & Fehiger pp 126-135
- 217.- Turner, R. (1965). Screening methods in pharmacology. Academic Press USA pp 243-281
- 218.- Casamada, R. S.M. (1977) Tratado de farmacognosia. Ed. Científico-Médica Barcelona pp 26-28
- 219.- Rodríguez, G.H.; Pérez, G R.M.; Muñoz, M.H.; Pérez, G.C. (1975). Inducción de Diabetes en Ratón por Medio de Aloxana. Acta Medica Vol. 6: 33-36.
- 220.- Hyavariner, A.; Nikkita, E. (1962). Specific Determination of Blood Glucose with O-toluidine Clin. Chim. Acta. vol. 7: 140-143.
- 221.- Dulin, W.E. (1964). Basic pharmacological techniques for evaluating antidiabetic agent. Year Book Medical Publishers, Chicago. pp 210-250.
- 222.- Litchfield, J. T.; and Wilcoxon, F.A. (1949). Simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. vol. 96: 99-113.

- 223.- Barnes, C.D.; and Eltherington, L.G. (1973). Drug dosage in laboratory animals. University of California Press, London pp. 32-42.
- 224.- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination . J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- 225.- Tallarina, R.J.; Murray, R.B. (1981). Manual of pharmacologic calculations with computer programs. Springer-Verlag, New York pp 21-23.
- 226.-D uddeck, H.; Dietrich, W. (1989) Structure elucidation by modern NMR. Springer-Verlag, New York pp 196-197.
- 227.- Walker, T.E. London, R.E. Whayley, R. Barker, R. (1976) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Signal assignments and orientational dependence of germinal and vival carbon-carbon and carbon-hydrogen spin-spin coupling constants. J.Am. Chem. Soc. vol. 98: 5807-5813.
- 228.- Voelter, W.: Breitmaier, E. Rathbone, E.R. (1973). The influence of methylation <sup>13</sup>C on chemical shifts of galactose derivatives, Tetrahedron vol. 29: 3845-3848.
- 229.- Orihara, K.R.; Asakawa, K.; Tanaka. O. (1979) <sup>13</sup>C study of α- and β-anomeric pairs of D-mannopyranosides and L- rhamnopyranosides. Tetrahedron vol. 35: 1427-1432.
- 230.- Jochims, J.C.; Taigel, A.; Lutz, P.; Driesen, H.E.(1967). Stereospecific Long-Range Adams, B.; Lerner, E. (1994). Effect of Stereochemistry on Hydroxyl Proton Chemical Shifts and Coupling Constants in Carbohydrates. Mag. Reson. Chem. vol. 32: 225-230.
- 231.- Coxon, B.(1988). Complete Assignment of the <sup>13</sup>CNMR Spectra of the Ring Forms of Digitoxose by DEPT Spectrum Editing and Two-Dimensional Carbon-Proton chemical Shift Correlation Spectroscopy. Magn. Reson. Chem. vol. 24:1062-1067.
- 232.- Wright, B.; Hughes, L.; Quereshi, S.S.; Daidson, A.H.(1988) Identification of C-Gycopyranosides and C-Glycofuranosides by <sup>13</sup>CNMR and <sup>1</sup>HNMR. Complete Assignment of their Spectral Data Using Carbon-Proton Chemical Shift Correlation Spectroscopy. Mag. Reson. Chem. vol. 26:1062-1067.
- 233.- Bock, K.; Penderson, C. (1983) Advances in carbohidrates and biochemistry. Academic Press Inc. vol. 41: 27-64.
- 234.- Dorman, D.E.; Roberts, J.D.(1970). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. C-13 Spectra of Some Pentose and Hexose Aldopyranoses. J. Amer. Chem. Soc. vol.92 (5): 1355-1361.

- 235.- Gorin, Ap.; Mystosk, M. (1975) Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canad. J. Chem.* vol. 53: 1212-1223.
- 236.- Hall, L.D.; Black, S.A.; Slessor, K.N.; Tracey, A.S. (1972). Conformational studies on the 1,2;5,6-di-O-isopropylidene D-hexoses. *Canad. J. Chem.* vol. 50: 1912-1924.
- 237.- Abraham, R.J.; Chambers, J. (1994) Conformational analysis of 4-deoxy-4-fluoro-D-glucose and 6-deoxy-6-fluoro-D-galactose in solution. *Magn. Reson. Chem.* vol. 32: 248-254.
- 238.- Koechetkov, N.K.; Chizhov, O.S.; Molodtson, N.V. (1968) Mass spectroscopy of oligosaccharides. *Tetrahedron* vol. 24: 5587-5593.
- 239.- Waller, R.G. (1972) *Biochemical applications of mass spectrometry*. Ed. Wiley-Interscience, New York. pp 332-336.
- 240.- Wilbur, D.J.; Williams, C.; Allerhand, A. (1977). Detection of the furanose anomers of D-mannose in aqueous solution. Application of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy at 68 Mhz. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 99: 5450-5452.
- 241.- Eliel, E.L.; Rao, S.; Pietrosiewicz, A. (1979). Carbon 13 NMR spectra of saturated heterocycles. *Org. Magn. Reson.* vol. 12: 461- 466.
- 242.- Lemieux, R.U.; Stevens, J.D. (1966). The proton magnetic resonance spectra and tautomeric equilibria of aldoses in deuterium oxide. *Can. J. Chem.* vol. 44: 249-262.
- 243.- Inch, T.D.; Williams, N. (1970) Structural assignments of some 2,2,4-trisubstituted 1,3-dioxolans. *J. Chem. Soc. (C)*, vol. 9: 1201-268
- 244.- Mucci, A.; Schenetti, L.; Brasili, L.; Malmusi, L. (1995). Conformational and configurational study of 1,3-dioxolanes by proton and carbon NMR spectroscopy. *Magnetic Reson. in Chemistry.* vol. 33: 167-173.
- 245.- Benassi, R.; Schenetti, L.; Taddei, F. (1980) NMR spectra MO calculations of spin-spin coupling constants and conformational analysis of substituted 1,3 dioxolanes. *Org. Magn. Resonance.* vol. 13: 17-25.

246.- Willy, E.W.; Binsch, G. Eliel. E. L. (1970) Conformational analysis. XXIII. 1,3 dioxolanes. J. Am. Chem. Soc. vol. 92: 5394-5402.

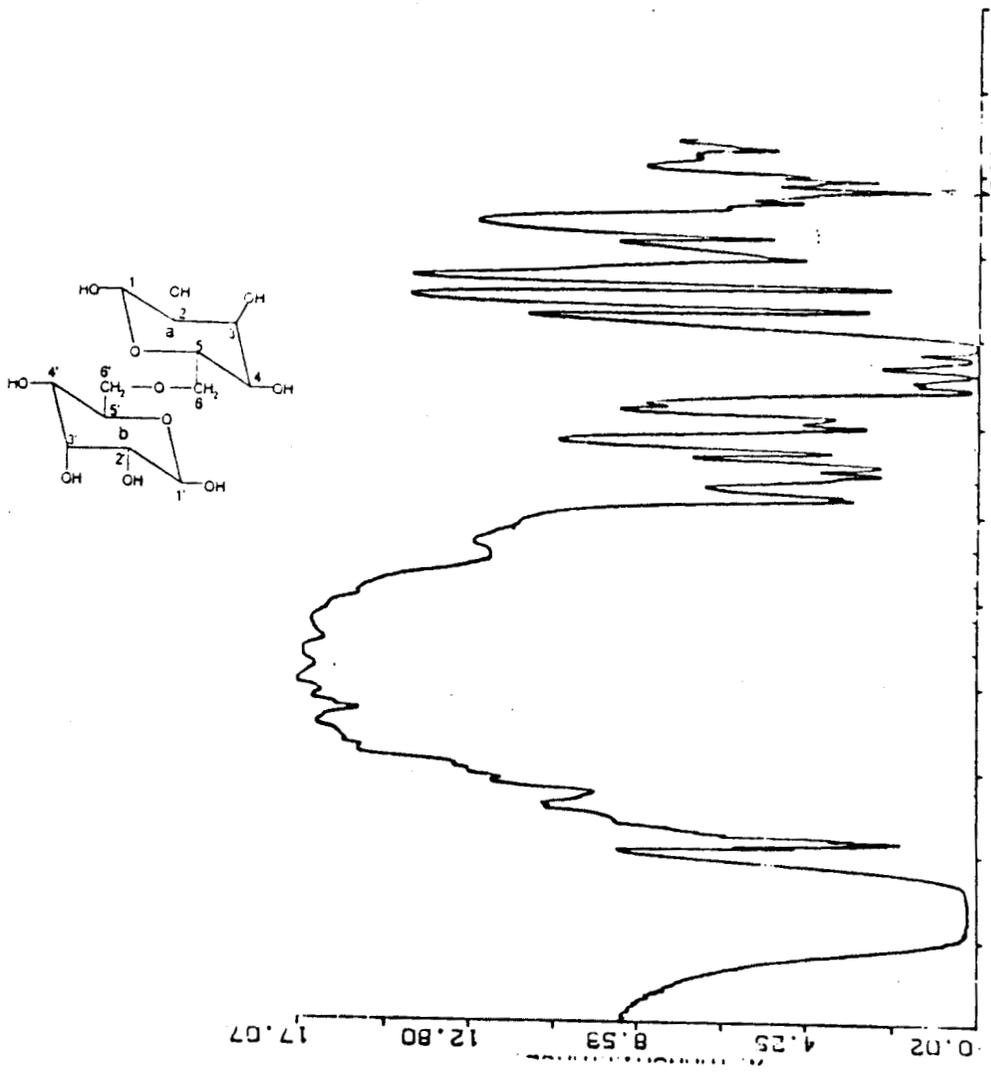
247.- Ray, J.; Djerassi, C. (1972) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems-CCXVI; Org. Mass. Spectr. vol. 6: 385-406.

248.- Marshall, J.T.B.; Williams, D.H (1967) Studies in mass spectrometry-XVIII (The relative ease of loss of alkyl radicals from ethylene acetals and ketals upon electron impact). Tetrahedron vol. 23: 321-333.

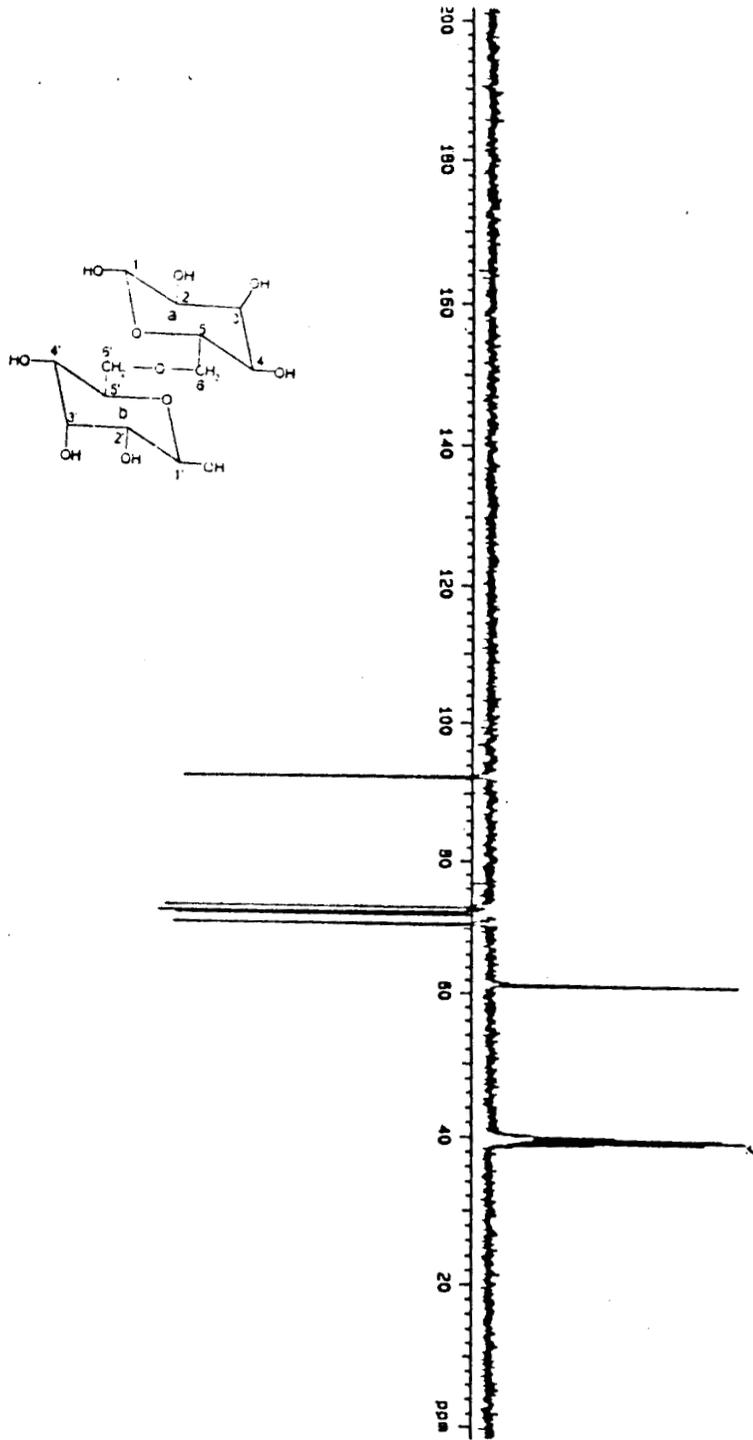
249.- Nakata, H.; Suzuki, M.; Harada, N.; Tatematsu, A. (1981). Site of Protonation and Bond Cleavages in Chemical Ionization Mass Spectrometry. Organ.Mass Spectr. vol. 16: 188-189.

250.- Faulkner, D.J.; Fenical, W.H. (1979) Atlas of carbon 13 NMR data Ed. Heyden & Limited, New York pp 217.

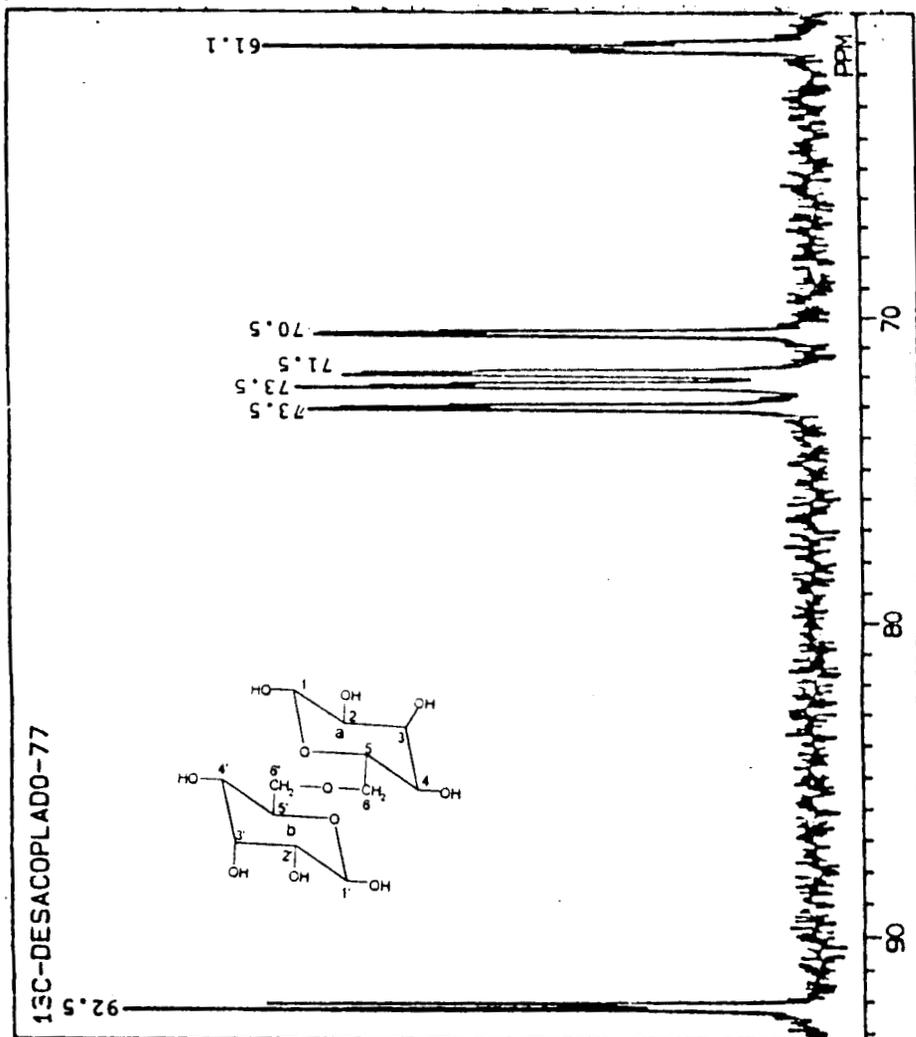
## **ANEXO I**



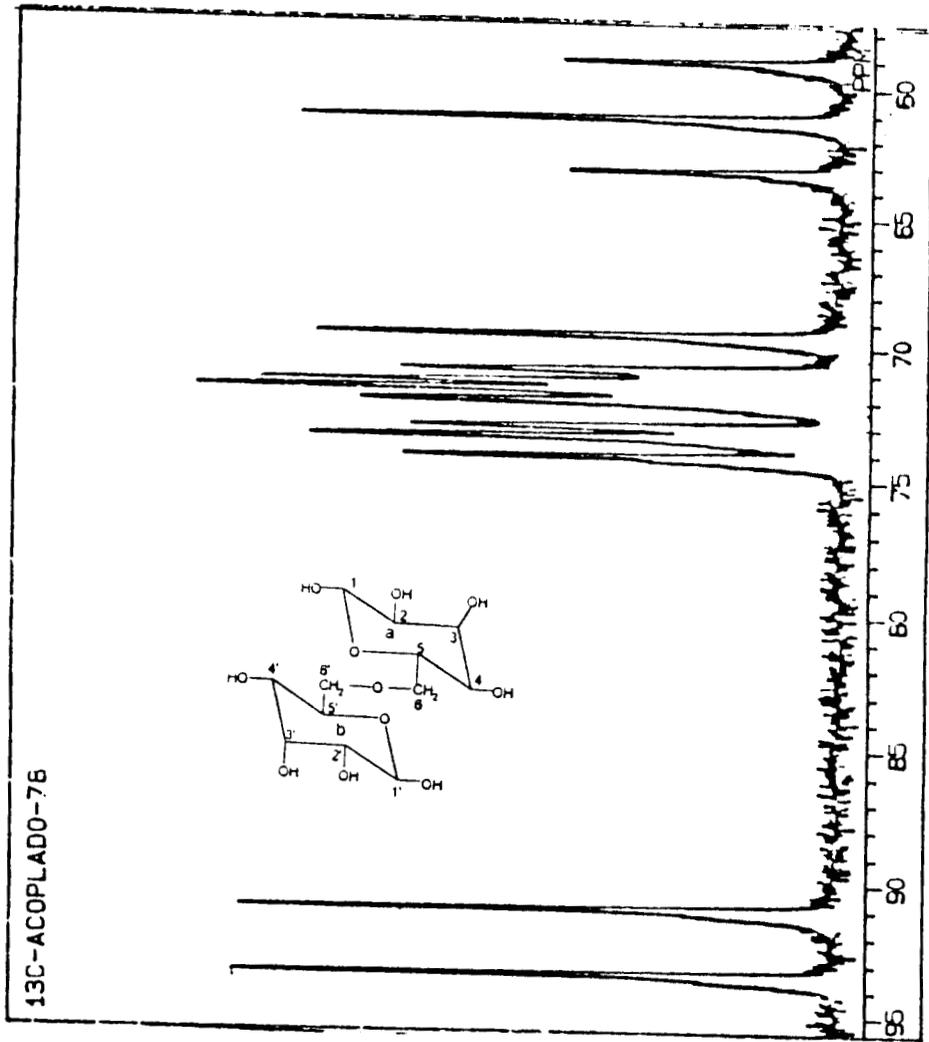
Grafica 1.- IR de la coyolosa.



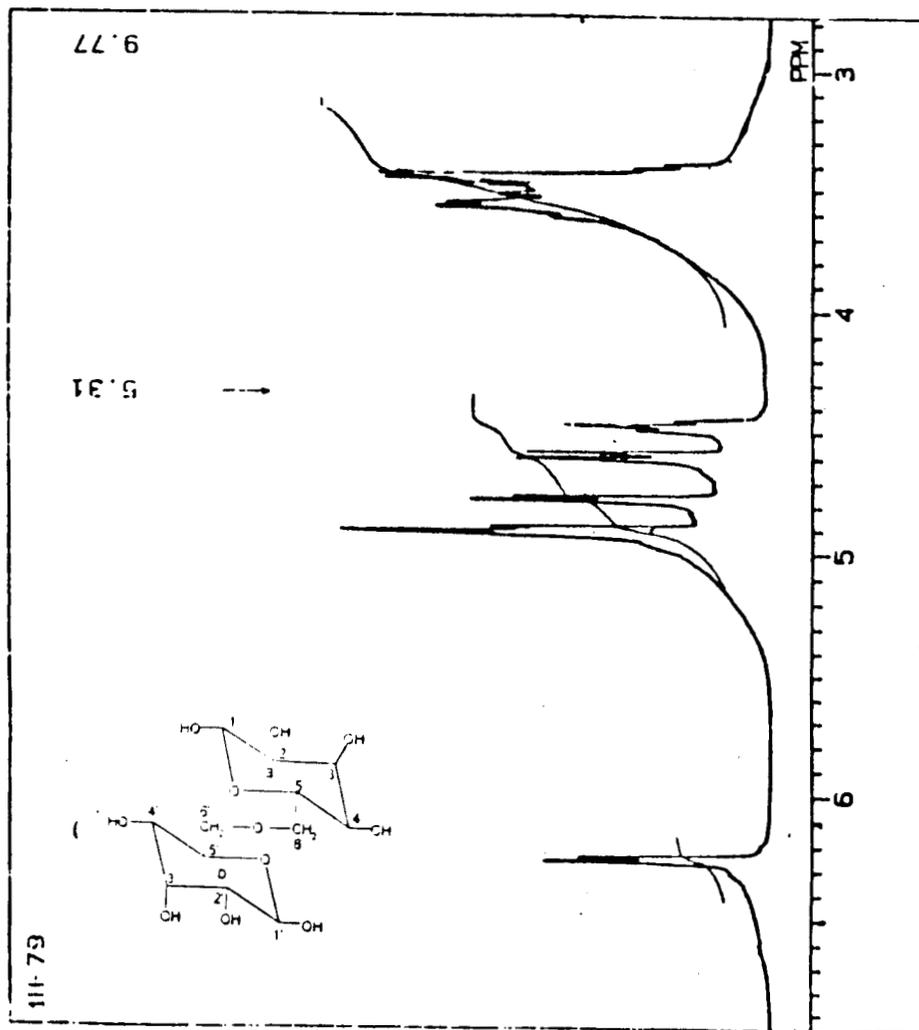
Grafica 2.-  $^{13}\text{C}$  CRMN de la coyolosa.



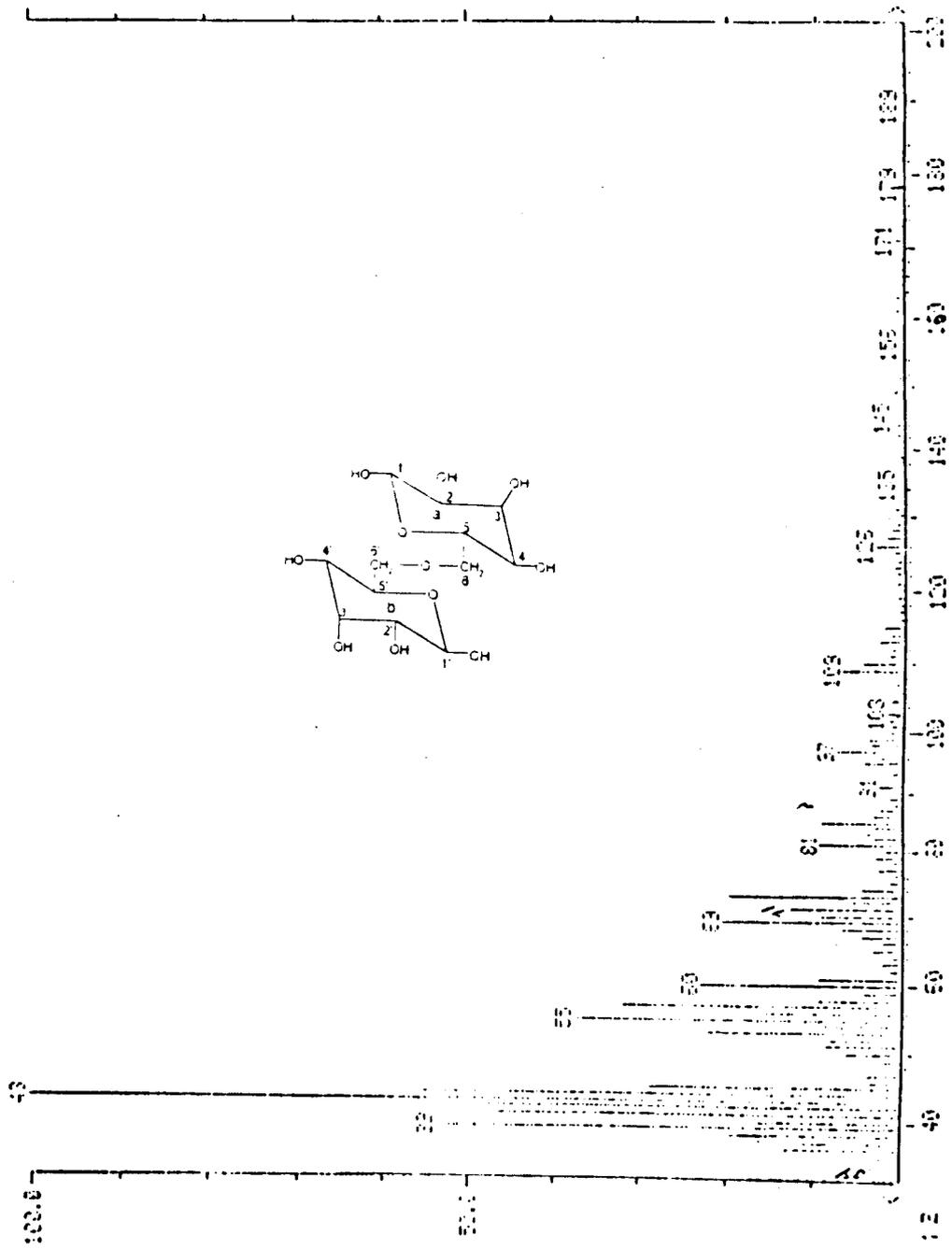
Grafica 3.-  $^{13}\text{C}$ CRMN de la coyolosa.



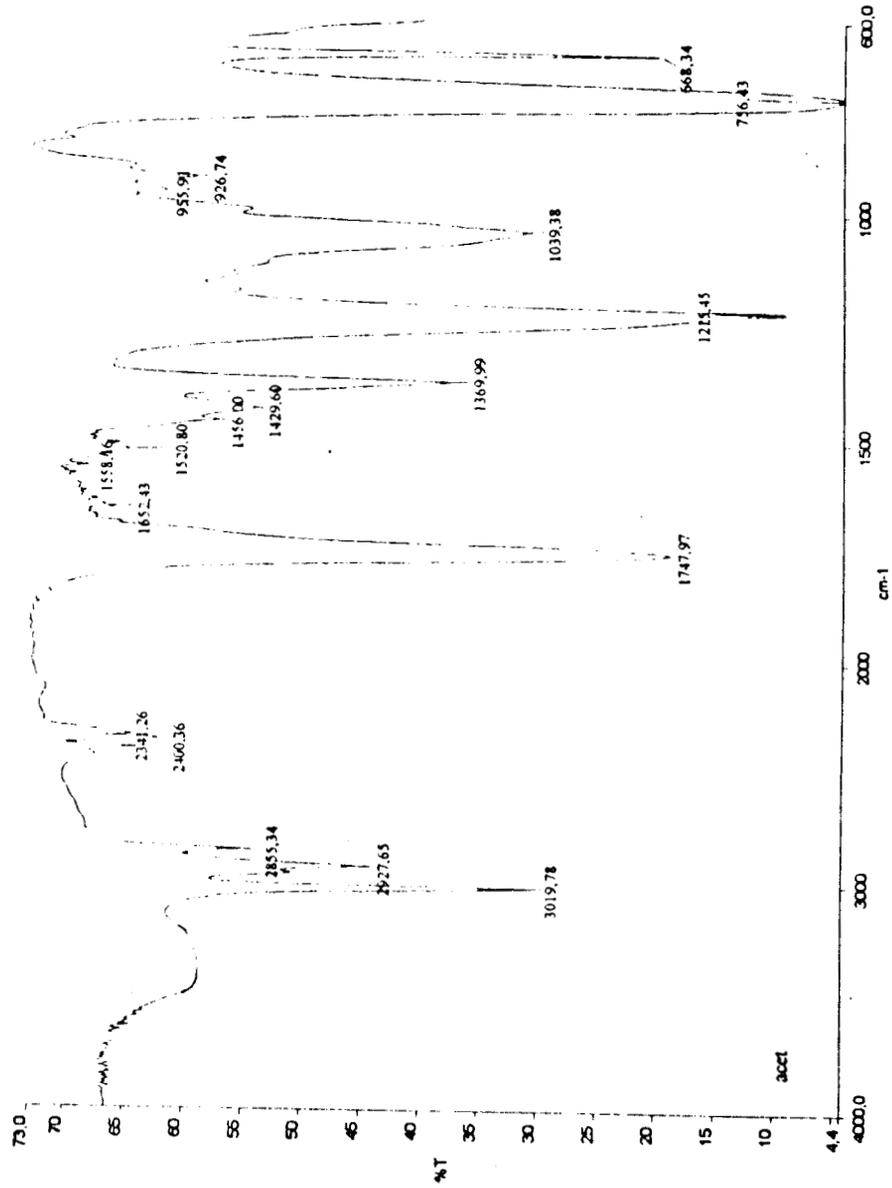
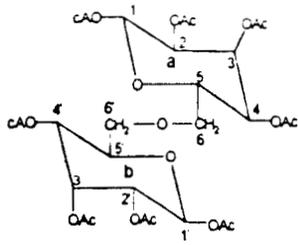
Grafica 4.-  $^{13}\text{C}$  CRMN de la coyolosa.



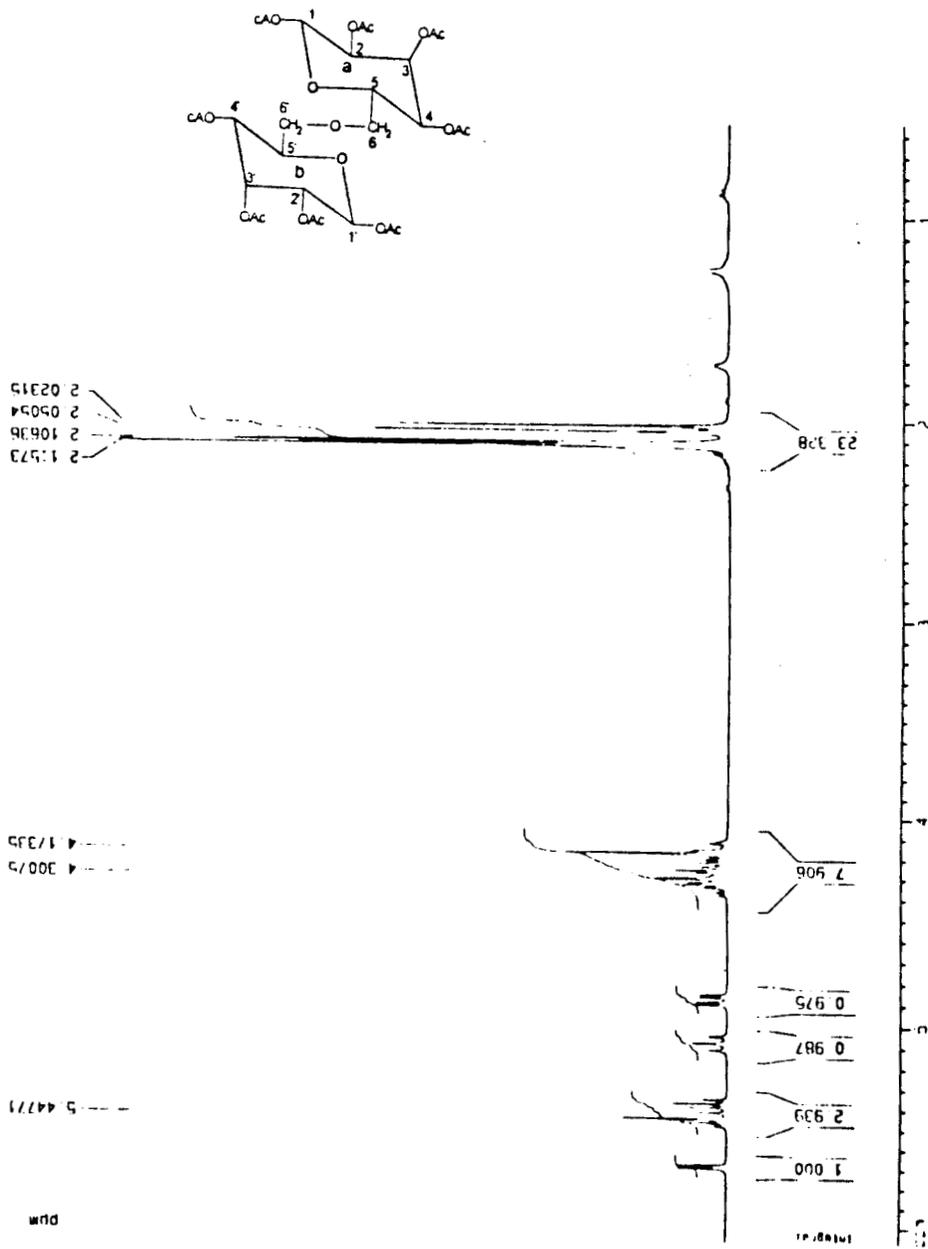
Grafica 5.- <sup>1</sup>HRMN de la coyolosa.



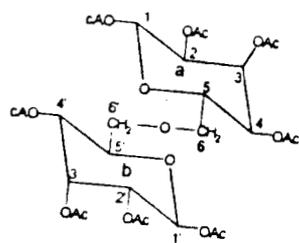
Grafica 6.- Espectro de Masas de la coyolosa.



Grafica 7.- IR del acetato de la coyolosa.



Grafica 8.- <sup>1</sup>HRMN del acetato de la coyolosa.



29.5

61.54

67.88

69.90

72.82

89.13

91.77

169.24

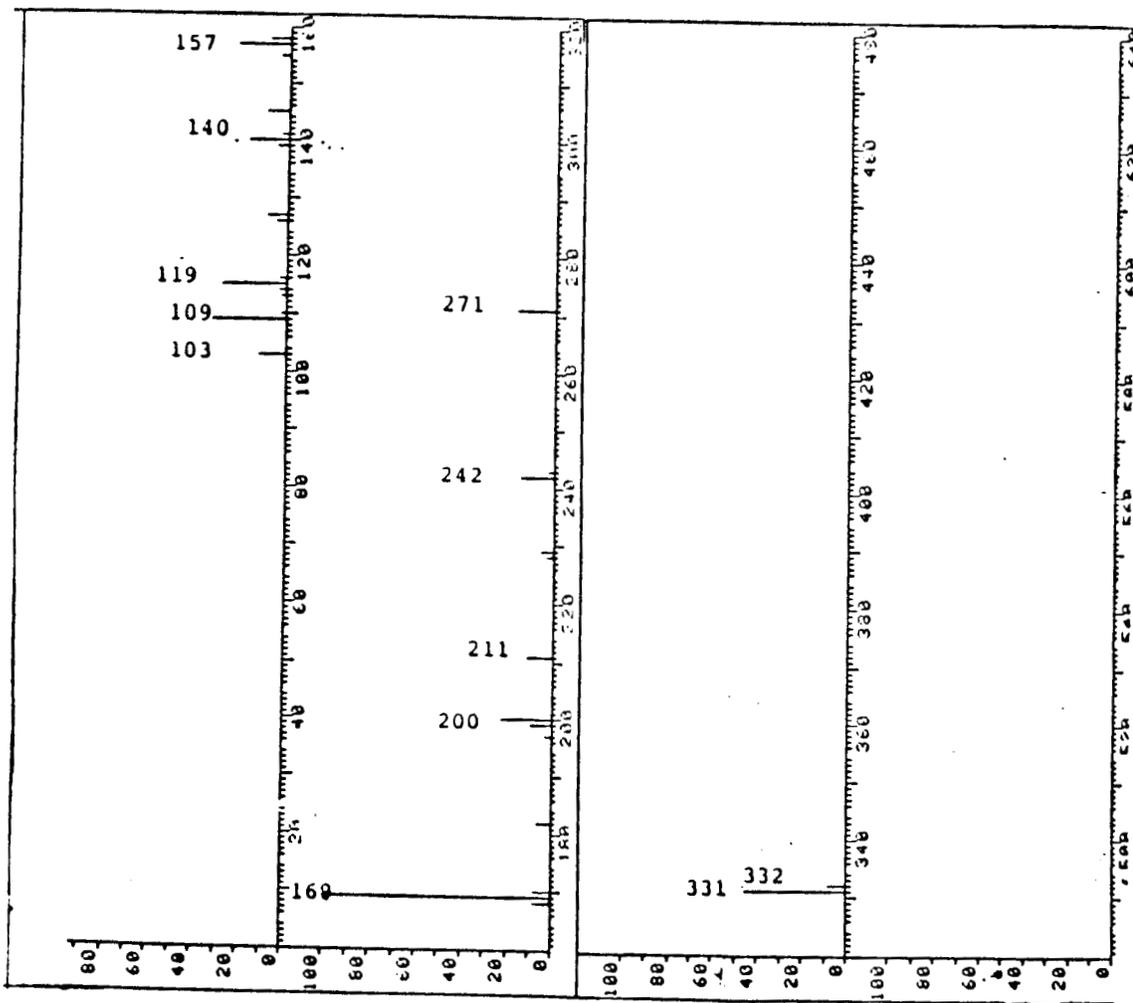
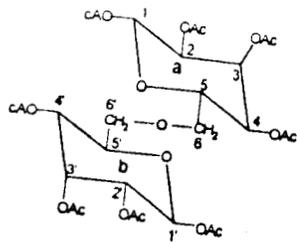
169.48

169.62

170.21

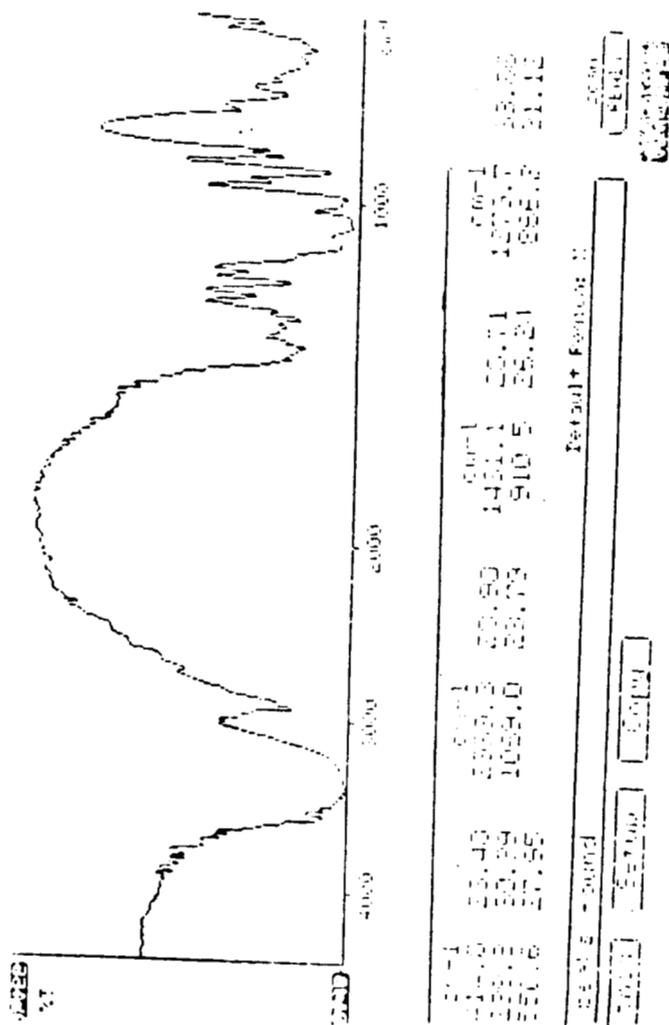
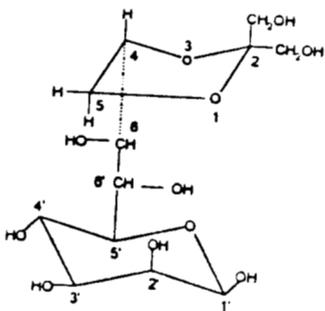
170.59

Grafica 9.- <sup>13</sup>CRMN del acetato de la coyolosa.

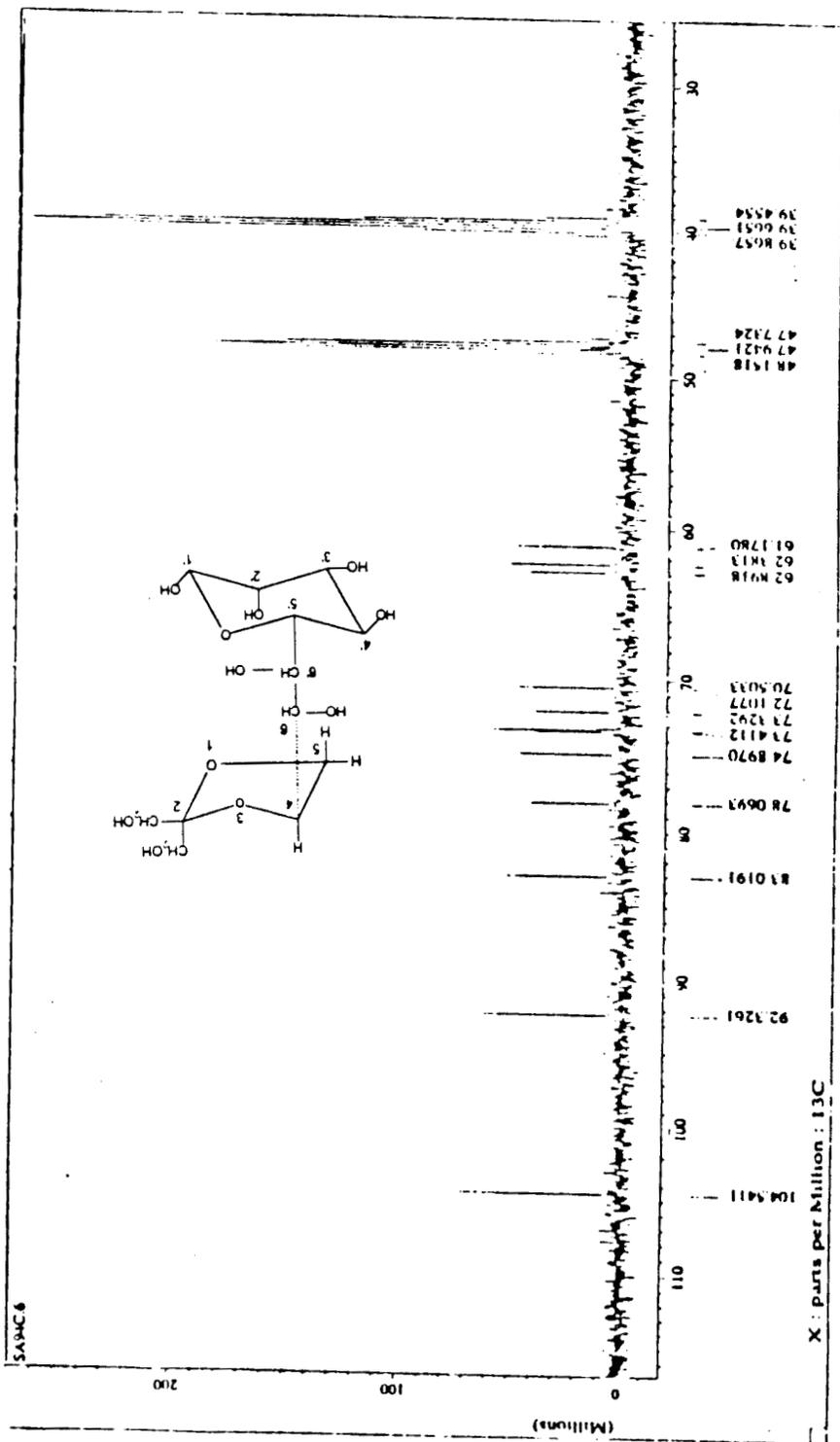


Grafica 10.- Espectro de Masas del acetato de la coyolosa.

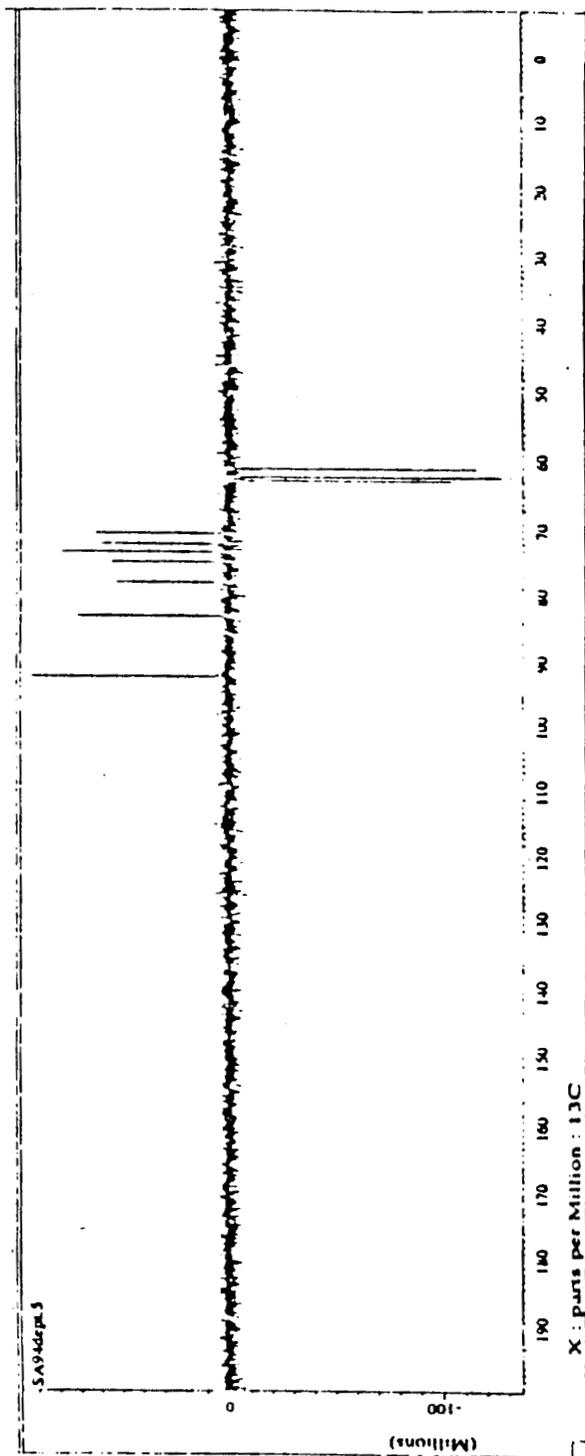
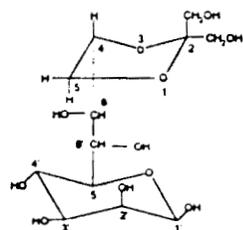
## **ANEXO II**



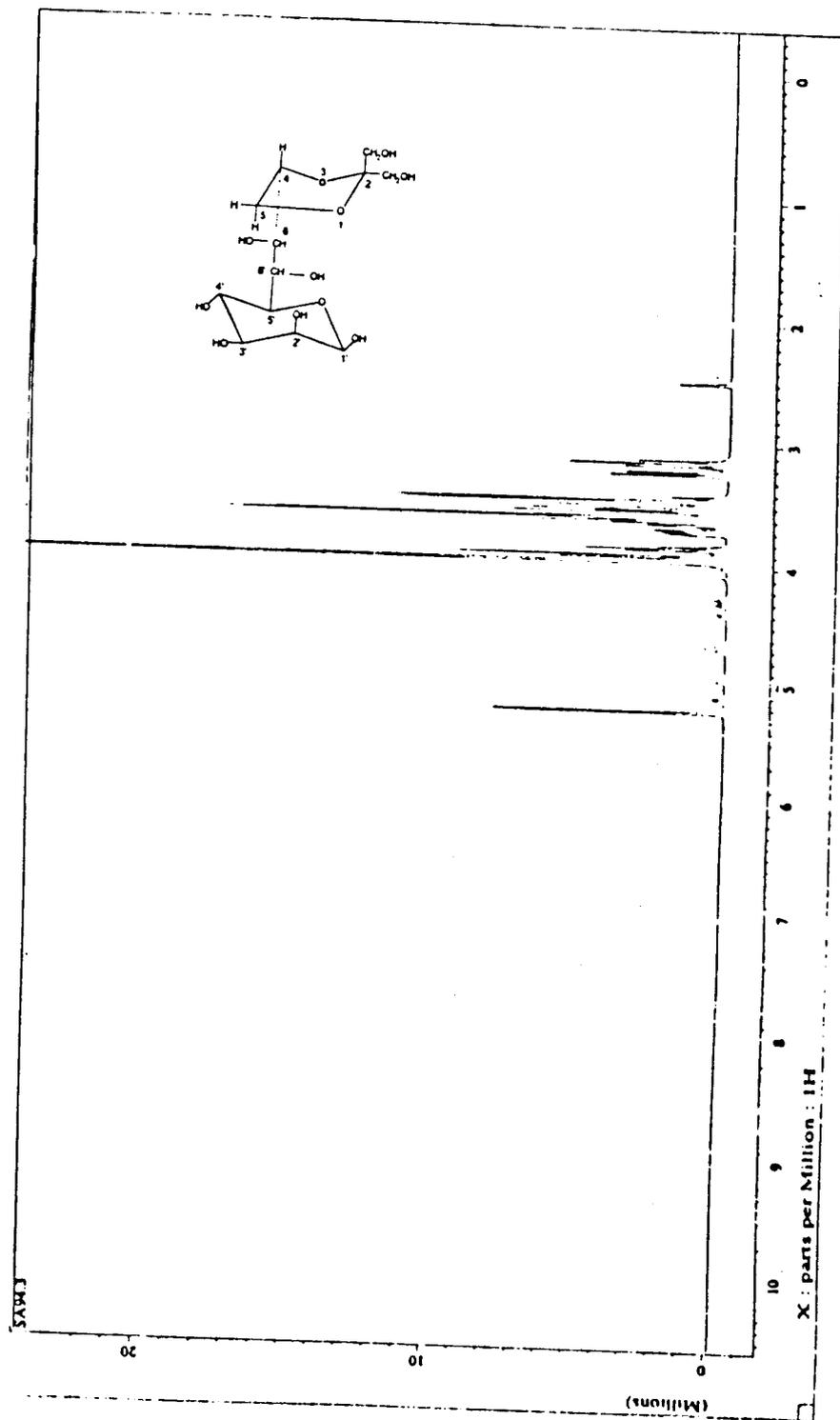
Grafica 11.- IR del saliciol.



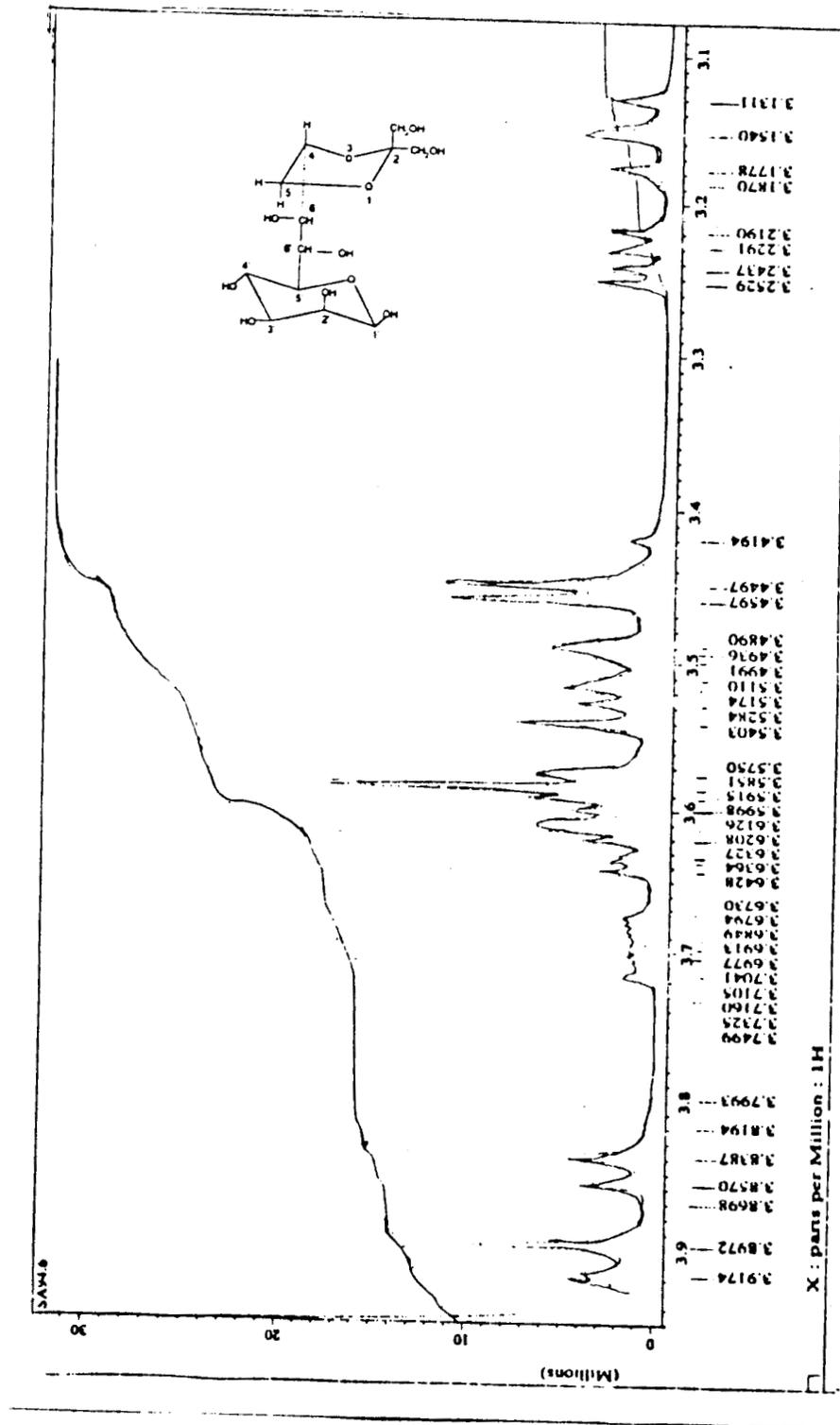
Grafica 12.-  $^{13}\text{C}$ RMN del saliriol.



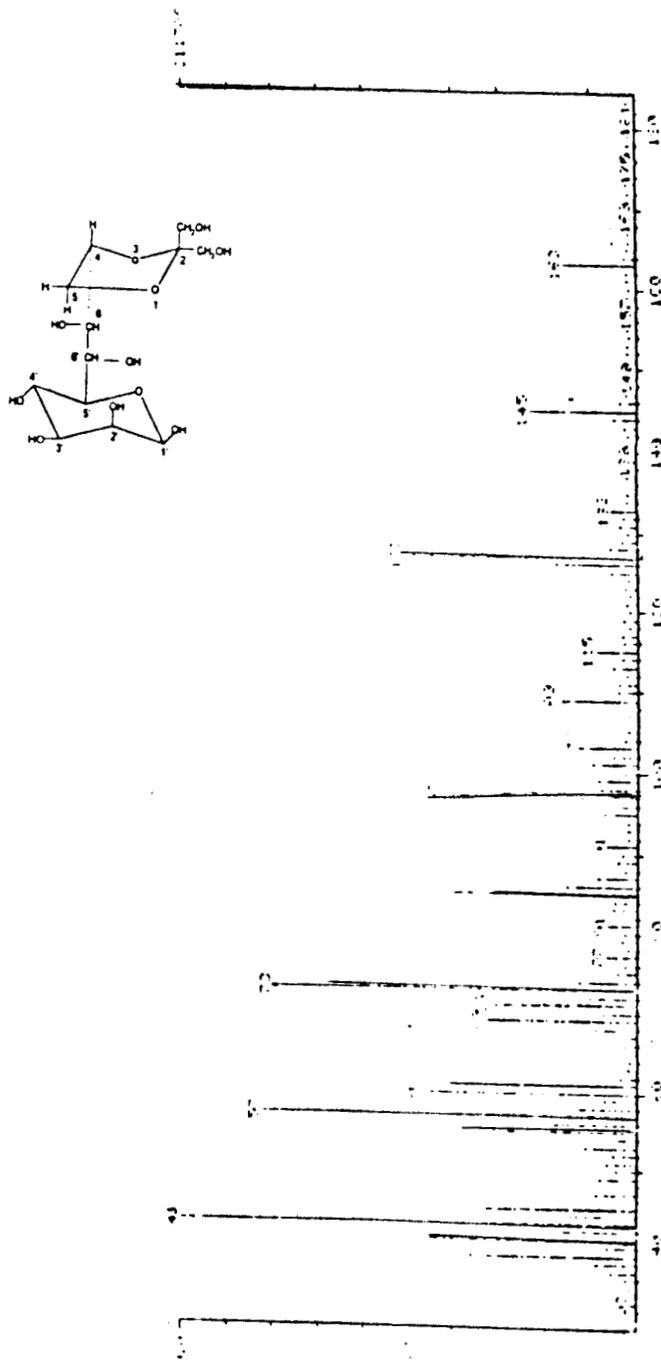
Grafica 13.-  $^{13}\text{C}$ RMN del salivariol.



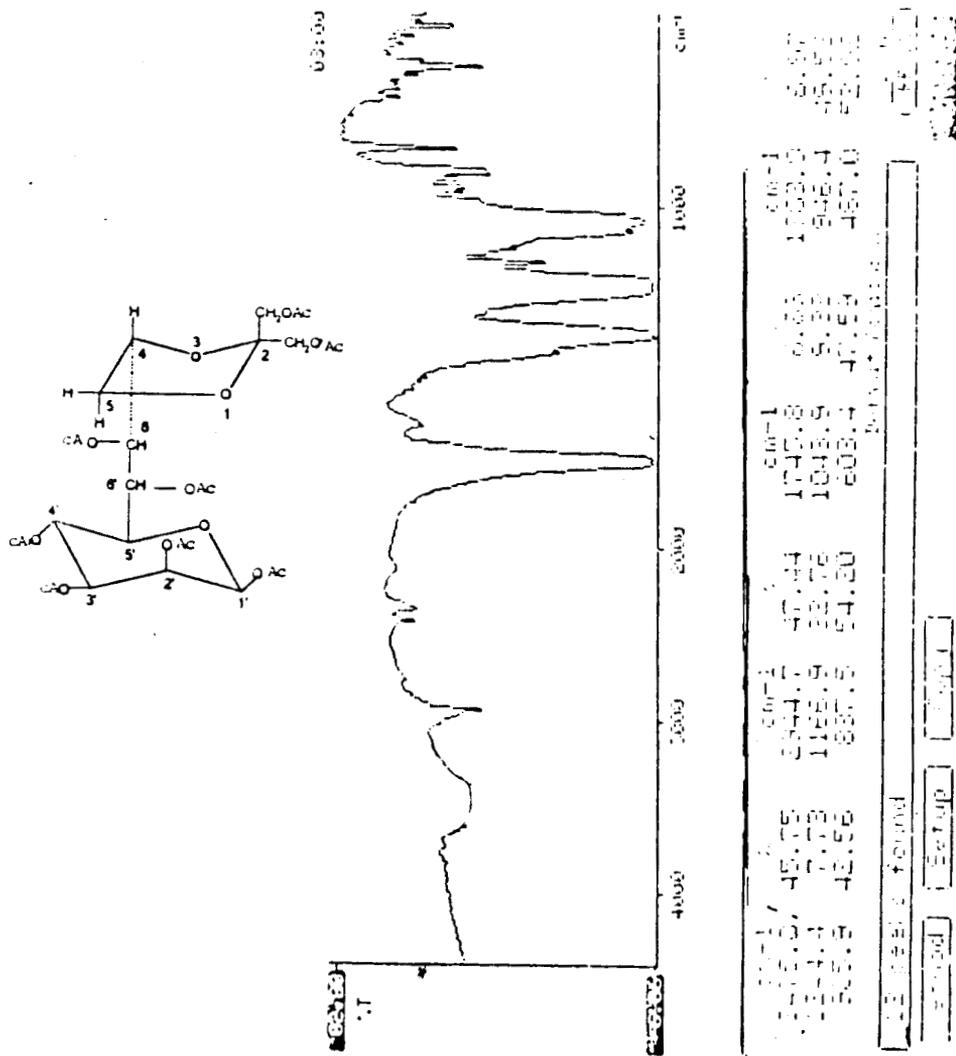
Grafica 14.-  $^1\text{H}$ RMN del saliriol (DMSO).



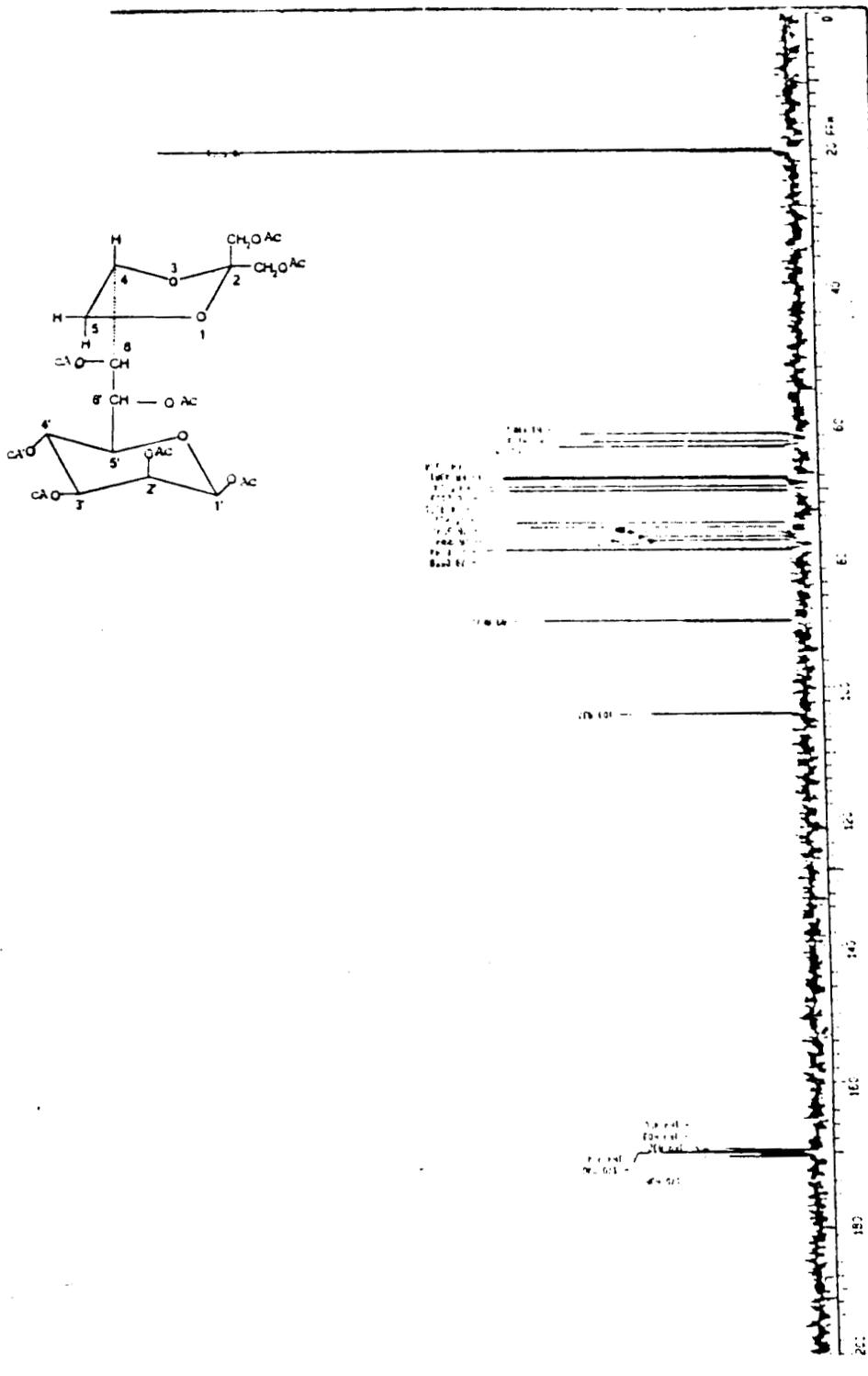
Grafica 15.- <sup>1</sup>HMRN del salicriol (D<sub>2</sub>O).



Grafica 16.- Espectro de Masas del saliriol.

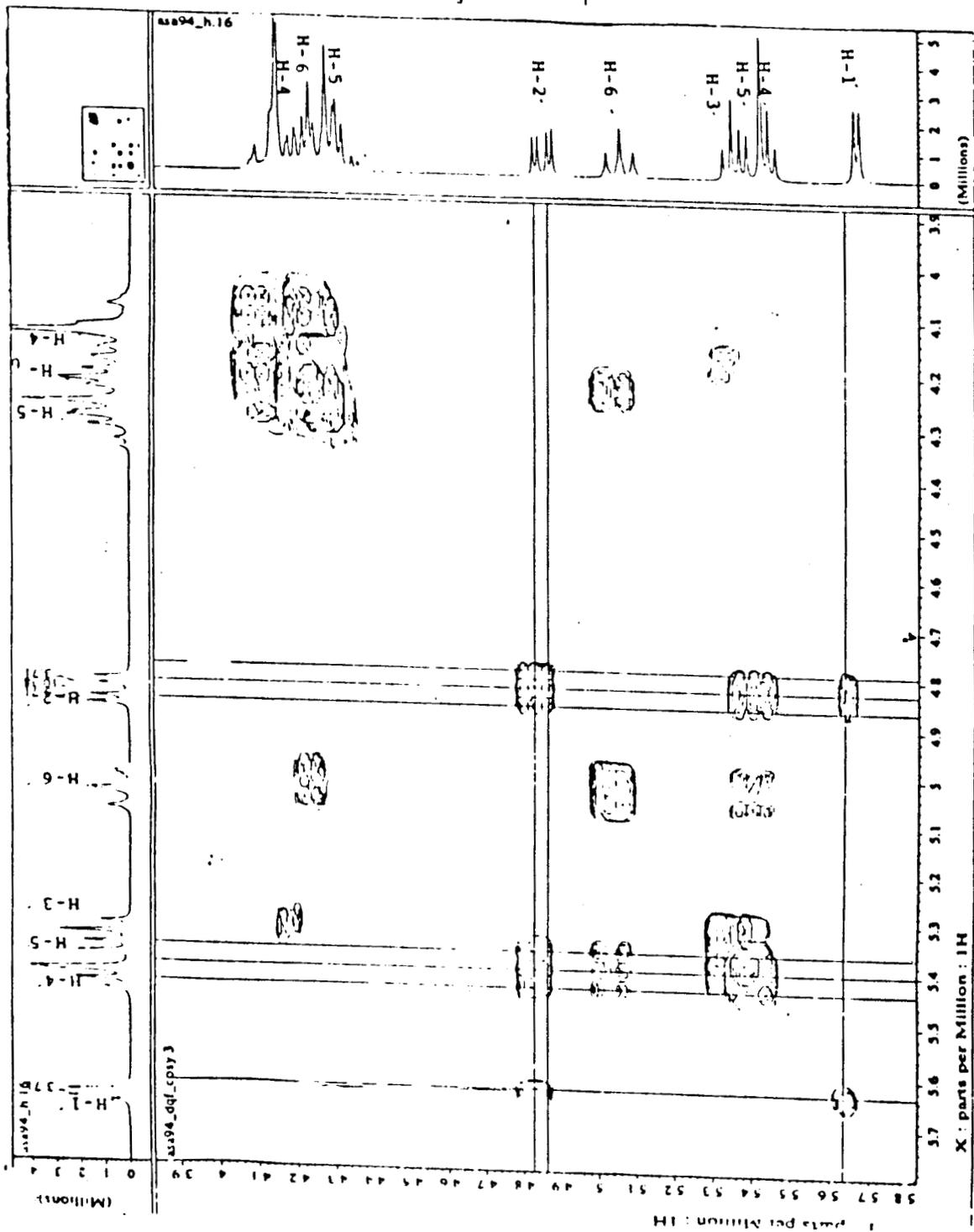
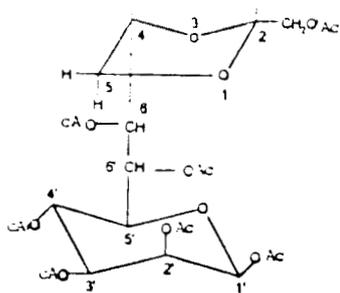


Grafica 17.- IR del acetato del salicilol.

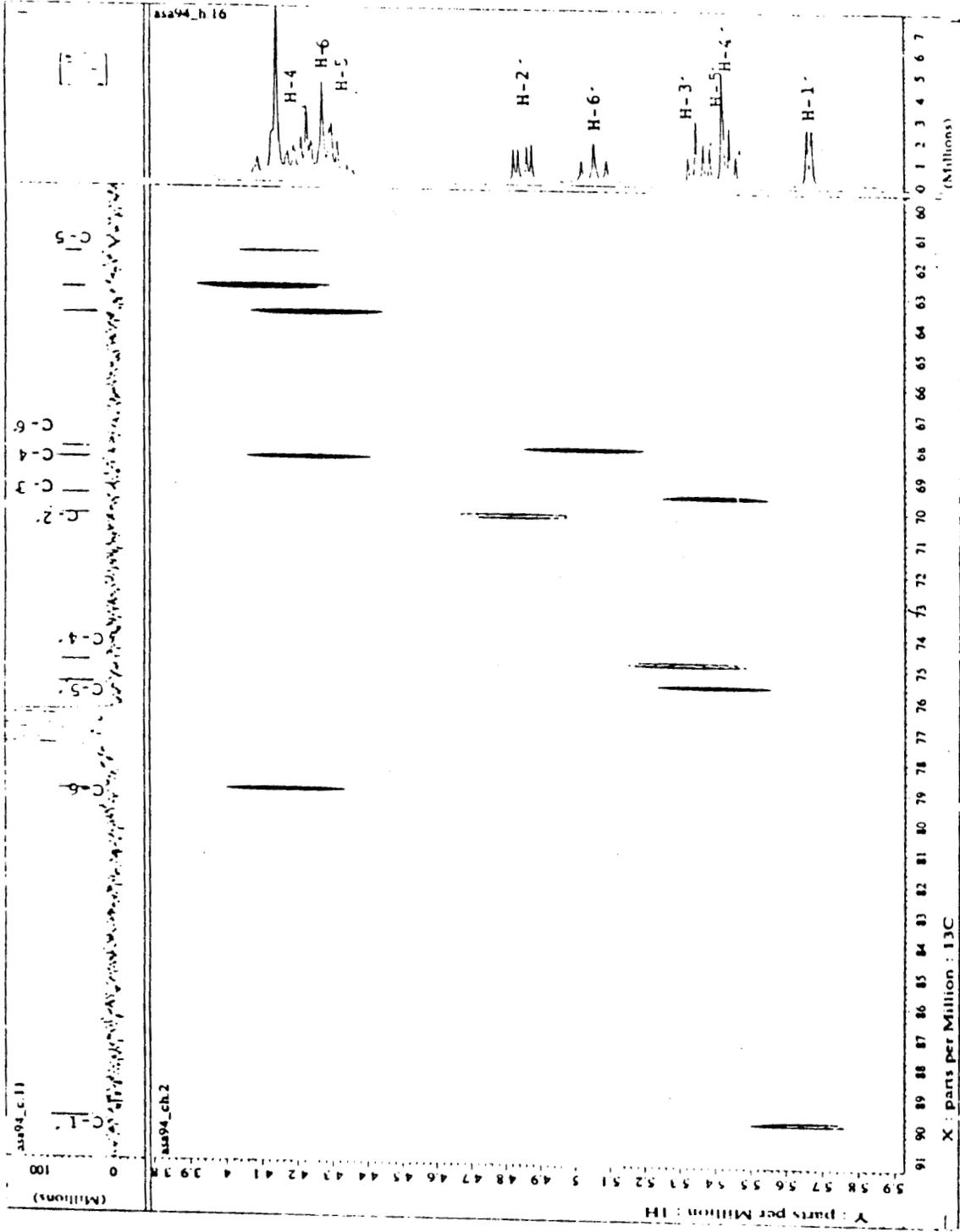
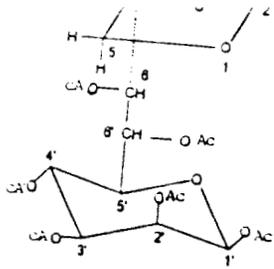


Grafica 18.-  $^{13}\text{C}$ RMN del acetato del salivariol.

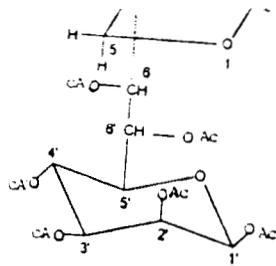
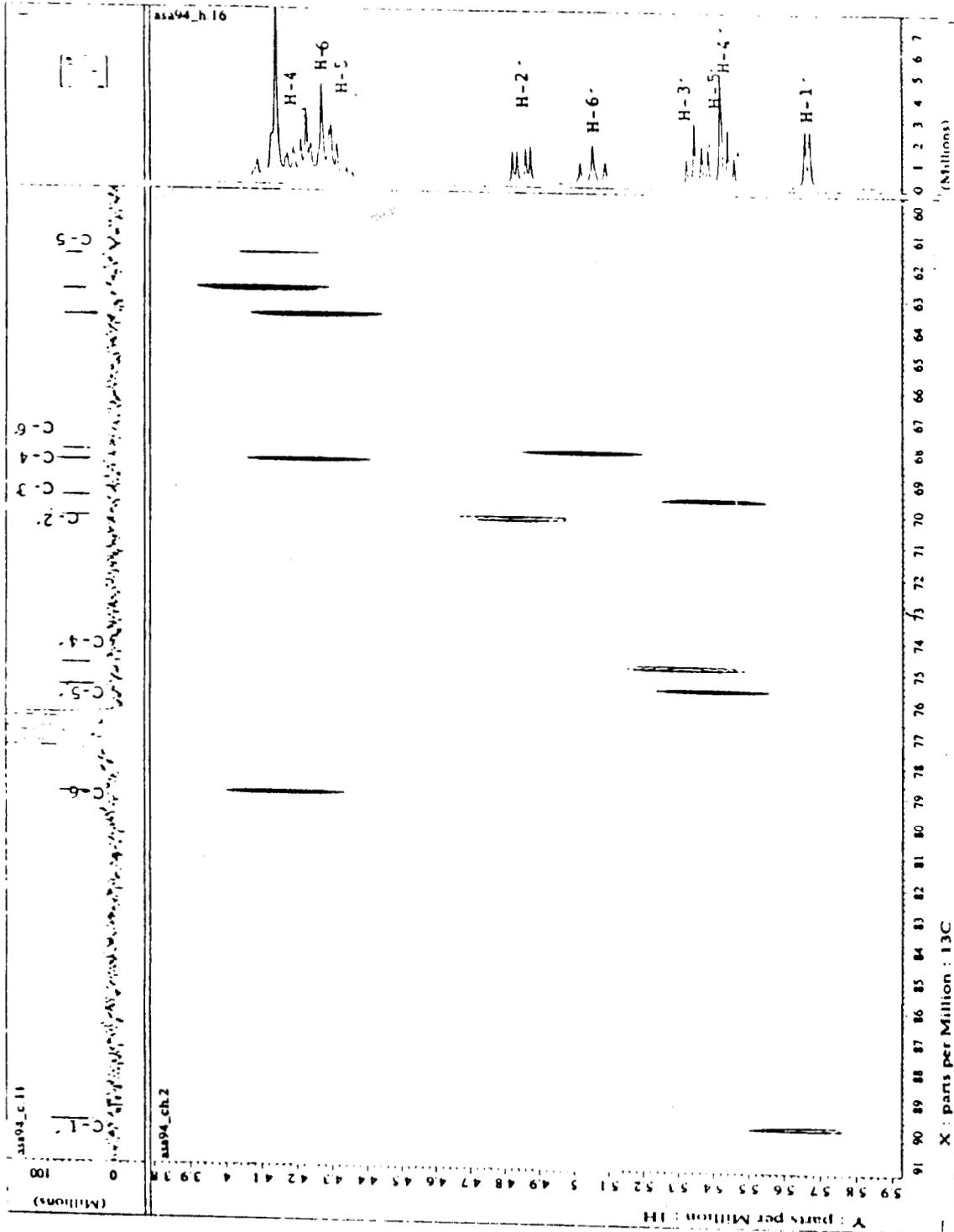




Grafica 20.- Espectro COSY H-H del acetato del saliriol.



Grafica 21.- Espectro COSY C-H del acetato del saliriol



Grafica 21.- Espectro COSY C-H del acetato del salivariol