

Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética

Lauro Figueroa-Valverde,^{*1} Francisco Díaz-Cedillo,² Abelardo Camacho-Luis,³
Maria López Ramos¹

¹Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar, Col Buenavista C.P. 24039 Campeche Cam., México

²Laboratorio de Química Orgánica de la Esc. Nal. de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. D.F. C.P. 11340 Santo Tomas, México

³Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Durango, Dgo., México

RESUMO: “Efeitos induzidos por *Ruta graveolens* L., Rutaceae, *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, Euphorbiaceae, e *Citrus aurantium* L., Rutaceae, nos níveis de glicose, colesterol e triacilglicéridos num modelo do rato diabético”. Diversas plantas com propriedades hipoglicêmicas foram usadas na medicina popular e em sistemas tradicionais de curas em torno do mundo. A finalidade deste trabalho foi avaliar os efeitos induzidos por *Ruta graveolens* L., Rutaceae, *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, Euphorbiaceae, e *Citrus aurantium* L., Rutaceae, em modelo do rato diabético onde níveis da glicose foram determinados a cada 24 h em um mês antes da administração gástrica do extrato das plantas. Colesterol e triacilglicéridos foram avaliados usando técnicas enzimáticas. Os resultados mostraram que a administração de *Cnidoscopus chayamansa* a dose de 0,5 a 1,5 g/kg induz um aumento hipoglicêmico (< 200 mg/dL). Outros dados indicam que *Cnidoscopus chayamansa* exerce variações nos níveis de triacilglicéridos (80-90 mg/dL) e colesterol (88-96 mg/dL). A administração de *Citrus aurantium* nas mesmas doses não foi suficiente para diminuir os níveis de glicose (> 200 mg/dL). Outros resultados, mostraram que *Citrus aurantium* exerce mudanças na concentração de triacilglicéridos (158-172 mg/dL) e colesterol (120-128 mg/dL). Finalmente, a administração de *Ruta graveolens* na dose de 0.5 g/kg induziu um efeito hipoglicêmico (< 200 mg/dL). *Ruta graveolens*, na dose de 0.5 a 1.5 g/kg, induziu variações nos níveis de triacilglicéridos (110-120 mg/dL) e colesterol (116-124 mg/dL). Em conclusão, a administração de *Cnidoscopus chayamansa* exerce efeitos hipoglicêmicos numa maneira dose dependente em comparação com *Ruta graveolens* e *Citrus aurantium*. As plantas avaliadas induzem mudanças nos níveis de lipídeos dependente da dose.

Unitermos: Diabetes, *Cnidoscopus chayamansa*, *Ruta graveolens*, *Citrus aurantium*, Wistar.

ABSTRACT: “Induced effects by *Ruta graveolens* L., Rutaceae, *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, Euphorbiaceae, and *Citrus aurantium* L., Rutaceae, on glucose, cholesterol and triacylglycerides levels in a diabetic rat model”. Several plants with hypoglycemic properties have been used in folk medicine and traditional healing systems around the world. The purpose of this work was to evaluate the effects of *Ruta graveolens* L., Rutaceae, *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, Euphorbiaceae, and *Citrus aurantium* L., Rutaceae, in a diabetic rat model to which the glucose levels were quantified every 24 hours by one month before of gastric administration of plants extract. Additionally, the cholesterol and triacylglycerides were evaluated using standard enzymatic techniques. The results showed that increases in the dose (0.5 to 1.5 g/kg) of *Cnidoscopus chayamansa* induce a high hypoglycemic effect (< 200 mg/dL). Another data indicate that *Cnidoscopus chayamansa* exerts variations in triacylglycerides (80-90 mg/dL) and cholesterol (88-96 mg/dL). Nevertheless, the administration of *Citrus aurantium* in the same doses was not sufficient for diminish the glucose levels (> 200 mg/dL). Other results, showed that *Citrus aurantium* exert changes in the concentration of triacylglycerides (158-172 mg/dL) and cholesterol (120-128 mg/dL). Finally, the administration of *Ruta graveolens* at dose of 0.5 mg/kg induces a hypoglycemic effect (< 200 mg/dL). Additionally, *Ruta graveolens* at dose of 0.5 to 1.5 g/kg induce variations in the triacylglycerides (110-120 mg/dL) and cholesterol (116-124 mg/dL) levels. In conclusion the administration of *Cnidoscopus chayamansa* it exerts hypoglycemic effects in a manner dose-dependent in comparison with both *Ruta graveolens* and *Citrus aurantium*. In addition, the plants evaluated induce changes in lipids levels dose-dependent.

Keywords: Diabetes, *Cnidoscopus chayamansa*, *Ruta graveolens*, *Citrus aurantium*, Wistar.

RESUMEN: Varias plantas con propiedades hipoglucémicas se han utilizado en medicina popular y sistemas curativos tradicionales en todo el mundo. El propósito de este trabajo fue evaluar los efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., Rutaceae, *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, Euphorbiaceae, y *Citrus aurantium* L., Rutaceae, en un modelo de rata diabética, a la que se le cuantificaron los niveles de glucosa cada 24 horas por un mes después de la administración gástrica del extracto de las plantas. Además, el colesterol y los triglicéridos fueron evaluados usando técnicas enzimáticas. Los resultados mostraron que la administración de *Cnidoscopus chayamansa* a dosis de 0.5 a 1.5 g/kg induce un aumento hipoglucémico (< 200 mg/dL). Otros datos indican que *Cnidoscopus chayamansa* ejerce variaciones en los niveles de triacilglicéridos (80-90 mg/dL) y colesterol (88-96 mg/dL). Sin embargo, la administración de *Citrus aurantium* en las mismas dosis no fue suficiente para disminuir los niveles de glucosa (> 200 mg/dL). Otros resultados, mostraron que *Citrus aurantium* ejerce cambios en la concentración de triacilglicéridos (158-172 mg/dL) y colesterol (120-128 mg/dL). Finalmente, la administración de *Ruta graveolens* a dosis de 0.5 g/kg induce un efecto hipoglucémico (< 200 mg/dL). Además, *Ruta graveolens* a dosis de 0.5 a 1.5 g/kg induce variaciones en los niveles de triacilglicéridos (110-120 mg/dL) y colesterol (116-124 mg/dL). En conclusión la administración de *Cnidoscopus chayamansa* ejerce efectos hipoglucémicos en una manera dosis dependiente en comparación con *Ruta graveolens* y *Citrus aurantium*. Además, las plantas evaluadas inducen cambios en los niveles de lípidos dependiente de la dosis.

Palabras clave: Diabetes, *Cnidoscopus chayamansa*, *Ruta graveolens*, *Citrus aurantium*, Wistar.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que actualmente enfrenta la población mundial son las enfermedades cardiovasculares (Stamler et al., 1993; Srinath et al., 1998; Gaziano, 2005). Existen varios factores de riesgo entre los que se encuentran; el tabaquismo (Ezzati et al., 2005), el alcoholismo (Dyer et al., 1977) y altas concentraciones de lípidos (Gordon et al., 1989) entre otros, que incrementan la progresión de estos desordenes cardiovasculares. Además, es importante mencionar que existen estudios epidemiológicos (Baynes, 1991; Harris et al., 1998) y clínicos (Rubin et al., 1994) donde se ha demostrado que la diabetes puede ser un factor condicionante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Aquí cabe mencionar que la diabetes a su vez esta condicionada por incrementos en los niveles de glucosa sanguínea, es así que desde hace varias décadas se han desarrollado una infinidad de medicamentos para el control de la glucosa (Oliveira et al., 1998; Moller, 2001). En este sentido, la hiperglicemia puede ser tratada inicialmente con fármacos hipoglucémicos como son metformina (Knowler et al., 2002) y glibenclamida (O'Sullivan & Cashman, 1970) entre otros (Zarate y Tene, 1999). Sin embargo, algunos de estos medicamentos tienden a producir algunos efectos secundarios (Wongpaitoon et al., 1981; Salper et al., 2003) y además son relativamente costosos para países en vías de desarrollo. Por lo tanto, se requiere de alternativas farmacológicas que ayuden al tratamiento de la diabetes, en este contexto, desde hace varias décadas se ha usado la medicina tradicional como una alternativa, que involucra el manejo de plantas con finalidades terapéuticas en los países que se encuentran en vías de desarrollo (Mahair & Gulliford, 1997; Funke et al., 2006). Es así, que se ha

considerado que los fitofármacos derivados de las plantas poseen menor toxicidad que algunos fármacos sintéticos (Rates, 2001). En este sentido, existen reportes sobre el manejo de medicina tradicional para el control de la diabetes (Pérez et al., 1998; Andrade & Wiedenfeld, 2001), ejemplo de esto es el uso de *Cnidoscopus chayamansa* por una población del sur de Texas (Hitchcock et al., 1997) y en regiones mexicanas (Coronado et al., 2004) para el control de diabetes mellitus. En otros, estudios se han realizado experimentos en un modelo de rata diabética los cuales señalan que la administración subcrónica de *Cnidoscopus chayamansa* disminuye los niveles de glucosa y lípidos (Palos, 2007).

Por otro lado, existen datos reportados por Sugiura y colaboradores (2006) quienes señalan que la administración del extracto de *Citrus (unshiu)*, ejerce variación en los niveles de glucosa en un modelo de ratas (GK) diabéticas tipo 2. Aunado a esto, otros reportes realizados por Singh y Kar indican que la administración oral de *Citrus sinensis* (25 mg/kg) en ratones diabéticos induce disminución en los niveles de glucosa (Singh et al., 2007). Sin embargo otros estudios (Colker et al., 1999) muestran que la administración de 975 mg *Citrus aurantium* en jóvenes sanos de 21 años no afectaron los niveles de glucosa (89 mg/dL) en comparación con los varones de la misma edad usados como control (88 mg/dL). Por otro lado, otros estudios indican que algunas sustancias (Je et al., 2002) envueltas en otro tipo de plantas como es el caso de *Ruta graveolens* también pueden afectar los niveles de glucosa, sin embargo, es importante mencionar que existen reportes donde se señala que la administración de *Ruta graveolens* puede inducir efectos tóxicos (Agra et al., 2002).

Por lo anteriormente descrito, los estudios

enfocados a analizar los efectos que inducen *Cnidioscolus chayamansa*, *Ruta graveolens* y *Citrus aurantium* sobre los niveles de glucosa y la presión sanguínea, no solamente son escasos sino que han arrojado hasta la fecha resultados que son frecuentemente difíciles de interpretar y a menudo contradictorios. Parte de la dificultad en la interpretación puede ser el abordaje que cada investigador realiza ó por las diferentes dosis administradas. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo el propósito de evaluar el efecto que ejerce *Cnidioscolus chayamansa*, *Ruta graveolens* y *Citrus aurantium* sobre los niveles de glucosa, peso, colesterol y triacilglicéridos (*in vivo*) en un modelo de rata diabética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

La *Ruta graveolens*, la *Cnidioscolus chayamansa* y el *Citrus aurantium* fueron adquiridos en el mercado principal de la Cd. de Campeche proveniente de los municipios adyacentes. El material vegetal fue autenticado por personal académico de la Universidad Autónoma de Campeche con número de registro: *Ruta graveolens* (UCAM-4445), *Cnidioscolus chayamansa* (UCAM-4319), y *Citrus aurantium* (UCAM-10870).

Animales

Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Campeche, su aprobación se basó en la guía para cuidados y uso de animales de laboratorio, publicado por la Academia Nacional de Ciencias, Washington D.C., (Bayne, 1996). La cepa que se utilizó fue ratas machos Wisstar (220-250 g). Antes de su experimentación se mantuvieron a una temperatura de 22 °C y ciclo claro/oscuras de 12 h. Los animales fueron alimentados con una dieta balanceada (purina) y agua para mantenerlas en condiciones deseables.

Extractos

Metodo general

El extracto de las plantas de estudio (*Ruta graveolens*, la *Cnidioscolus chayamansa* y *Citrus aurantium*) fue preparado por medio de una extracción continua usando el aparato soxhlet (Hawthorne et al., 2000). La extracción de una muestra de 20 g de hojas previamente secas se realizó usando como disolvente 250 mL metanol (80%) por espacio de 8 h. Después del tiempo de extracción el volumen de la solución alcohólica se redujo a presión reducida en un rotovapor (Buchi B-490, Labor-technik, Zwitterland). Al producto obtenido se le adicionó una mezcla de disolventes cloroformo:agua (v/v, 4:1) para separar la fase orgánica de la acuosa. El volumen de la fase

orgánica se redujo hasta sequedad a presión reducida y la mezcla obtenida se restituyó con etanol (70%) para usarla como solución madre en este estudio.

Identificación de flavonoides

El análisis espectroscópico de los flavonoides involucrados en *Ruta graveolens*, *Cnidioscolus chayamansa* y *Citrus aurantium* fue realizado a una longitud de onda en un rango de 200 a 500 nm como lo señala Heimler et al. (1992). Es importante mencionar que se realizó una curva patrón utilizando *dihydromyricetina* y amentoflavona *rutina*, *quercetina*, *naringina*, *hesperidina* y *nobiletina*.

Inducción de diabetes

Las ratas fueron inyectadas con alloxan monohidratado disuelto en solución salina a una dosis de 150 mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal como lo describe Sharma et al. (2008). A partir de la primera semana después de la inyección, se monitorearon los niveles de glucosa y se estableció hiperglicemia cuando la concentración de glucosa fue ≥ 200 mg.

Determinación del peso

La determinación del peso corporal de los animales de estudio fue evaluado antes y después de cada tratamiento (cada 24 h) por 30 días.

Determinación de glucosa en forma aguda *in vivo*

Se evaluaron los niveles de glucosa antes y después de cada tratamiento (cada 24 h) por 30 días. La muestra sanguínea fue colectada del extremo de la cola de cada una de las ratas y puesta en las tiras reactivas para su análisis con el glucómetro Accu-Chek, Roche company U.S.A (Hawkins, 2005).

Administración de extractos y fármacos hipoglucemiantes

Las ratas fueron divididas en varios grupos después de la inducción de la diabetes (Tabla 1) a las cuales se les administró el extracto de cada una de las plantas involucradas en este trabajo como son; *Ruta graveolens*, *Cnidioscolus chayamansa* y *Citrus aurantium* en dosis de 0.5 mg/kg a 1.5 mg/kg usando un tubo intragástrico por 30 días. Las diferentes dosis administradas fueron disueltas en 1 mL de agua, misma que fue administrada a cada uno de los animales de estudio. Además se administraron Glibenclámda en una dosis de 600 μ g/kg (Rajasekaran et al., 2005) y dosis de 350 mg/kg de metformina (Penicaud et al., 1989) para ser usados como controles. Finalmente, se usaron como controles ratas sin diabetes/sin tratamiento y ratas con diabetes/sin tratamiento a las cuales solo se les

administro solución salina (1 mL).

Determinación de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en forma crónica

Para evaluar estos parámetros se sacrificaron los animales y se extrajo la muestra sanguínea (2 mL) y se depositó en tubos que contenían 0.46 mL de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para el análisis específico de cada uno de los parámetros de estudio.

Glucosa

Los niveles de glucosa fueron cuantificados por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa. Se adicionó 1 mL del reactivo de trabajo (Reactivo 4-aminofenazona/enzi-mas + Reactivo Fenol [solución de fenol 5 mmol/L en buffer de fosfato 100 mmol/L, pH = 7.0]). La solución obtenida se mezcló hasta homogenizar y se incubó durante 10 min a 37 °C. Aquí es importante mencionar que la glucosa se determina por oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa y el peróxido de hidrógeno formado, en presencia de peroxidada, oxida el cromógeno 4-aminofenazona/fenol. Los niveles de glucosa fueron cuantificados mediante lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 520 nm (Lott & Turner, 1975).

Triacilglicéridos

La concentración de triacilglicéridos se obtuvo mediante la técnica glicerol fosfato oxidasa/peroxidada (Fossati & Prencipe, 1982). A 10 µL de suero o plasma se le adicionó 1 mL del reactivo de trabajo que está compuesto de; piper (ácido 1,4-piperazina-dietano-sulfónico, 45 mmol/L), *p*-clorofenol (6 mmol/L), cloruro de manganeso (5 mmol/L), lipasa > 100 U/mL, glicerol quinasa > 1.5 U/mL, glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/mL, peroxidasa > 0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.75 mmol, ATP 0.9 mmol, pH 7.0. La solución obtenida se mezcló hasta homogenizar y se incubó durante 5 min a 37 °C. El registro de la absorbancia de la muestra se realizó a 500 nm y la concentración de triacilglicéridos se calculó por el método reportado por Bucolo (1973).

Colesterol

Los niveles de colesterol fueron cuantificados enzimáticamente usando la técnica de colesterol oxidasa/peroxidada (Allain et al., 1974). Se adicionó 1 mL del reactivo de trabajo (Reactivo 4-aminofenazona/Enzimas + Reactivo Fenol [solución de fenol 5 mmol/L en buffer de fosfato 50 mmol/L, pH = 7.0]) a 10 µL de muestra (plasma) y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. La solución obtenida se incubó a 37 °C durante 15 min a temperatura ambiente. La cuantificación de los niveles de colesterol se llevó a cabo mediante lecturas de absorbancia,

aquí es importante mencionar que la determinación de colesterol se basa en la conversión de colesterol a colest-4-en-3-ona, este compuesto tiene un espectro de absorción a 240 nm.

Análisis estadístico

Todos los análisis se desarrollaron usando el Software SPSS 12.0. Los valores obtenidos fueron expresados como la media ± error estándar de la media. Las diferencias se consideraron significativas cuando *p* tiene un valor igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

Identificación de flavonoides mediante espectrofotometría de ultravioleta

Los resultados del análisis de espectrofotometría de ultravioleta de los flavonoides evaluados en este estudio (Tabla 2) muestran variaciones en la longitud de onda para cada flavonoide en un rango de 240 a 380 nm.

Determinación del peso

Los resultados mostrados en la Tabla 3 (en un lapso de 30 días) señalan que la administración de *Cnidocolus chayamansa* y *Ruta graveolens* a dosis de 0.5 g/kg mostraron diferencias significativas (*p* = 0.005) con respecto al control (ratas diabéticas sin tratamiento), pero con respecto a las ratas no diabéticas. Otros datos, señalan que la administración de *Citrus aurantium* a dosis de 1.0 y 1.5 g/kg ejercieron incrementos en el peso de las ratas en comparación con las ratas control (normal y diabéticas sin tratamiento).

Cuantificación de glucosa en forma aguda

Los datos obtenidos mostraron que los niveles de glucosa en condiciones control (ratas diabéticas sin tratamiento farmacológico) fluctuaron entre 405 a 490 mg/dL (Figura 1) en un lapso de 30 días. Otros resultados encontrados en el grupo de ratas con tratamiento farmacológico mostraron 1) la aplicación de glibenclamida indujo una reducción significativa (*p* = 0.005) en los niveles de glucosa (490 a 110 mg/dL) través del tiempo; 2) la administración de metformina mostró un efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas (450 a 150 mg/dL; *p* = 0.005). Además, otros obtenidos de la evaluación de la administración de *Cnidocolus chayamansa* a dosis de 1) 0.5 g/kg mostraron un decremento en los niveles de glucosa (456 a 198 mg/dL); 2) 1.0 g/kg se encontró una reducción significativa (*p* = 0.005) en la concentración de glucosa (416 a 118 mg/dL); y 3) 1.5 g/kg mostró una disminución significativa (*p* = 0.005) en los niveles de glucosa (420 a 102 mg/dL).

Otros resultados de experimentos alternativos mostraron que el grupo de ratas diabéticas tratadas con *Ruta graveolens* (Figura 2) a dosis de a) 0.5 g/kg mostraron un decremento significativo ($p = 0.005$) en los niveles de glucosa (422 a 121 mg/dL); b) 1.0 g/kg se encontró una reducción en la concentración de glucosa en los rangos de 466 a 290 mg/dL; c) 1.5 g/kg mostraron una reducción en los niveles de glucosa (480 a 270 mg/dL).

Finalmente, los niveles de glucosa fueron determinados por la administración de *Citrus aurantium* (Figura 4). Los resultados mostraron que a dosis de 1) 0.5 g/kg hubo una reducción en la concentración de glucosa (458 a 266 mg/dL); 2) 1.0 g/kg mostraron una disminución de 434 a 245 mg/dL; y 3) 1.5 g/kg se hallaron niveles de glucosa que fluctuaron entre 444 y 260 mg/dL.

Tabla 1. Diseño experimental. Distribución de grupos y dosis administradas de sustancias involucradas en el estudio.

Grupo	Substancia	Dosis
Ratas normales (control 1)	Solución salina	1 ml
Ratas diabéticas (control 2)	Solución salina	1 ml
Ratas diabéticas (Grupo I)	<i>Glibenclamida</i>	600 µg/kg
Ratas diabéticas (Grupo II)	<i>Metformina</i>	350 mg/kg
Ratas diabéticas (Grupo III)	<i>Cnidoscopus chayamansa</i>	(0.5 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo IV)	<i>Cnidoscopus chayamansa</i>	(1.0 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo V)	<i>Cnidoscopus chayamansa</i>	(1.5 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo VI)	<i>Ruta graveolens</i>	(0.5 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo VII)	<i>Ruta graveolens</i>	(1.0 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo VIII)	<i>Ruta graveolens</i>	(1.5 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo IX)	<i>Citrus aurantium</i>	(0.5 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo X)	<i>Citrus aurantium</i>	(1.0 g/kg)
Ratas diabéticas (Grupo XI)	<i>Citrus aurantium</i>	(1.5 g/kg)

Tabla 3. Determinación de los niveles del peso y glucosa por la administración de *Cnidoscopus chayamansa*, *Ruta graveolens*, *Citrus aurantium* y los controles (glibenclamida y metformina) en ratas diabéticas en forma crónica.

Grupos	peso (g) *	Glucosa (mg/dL)*
Normal	240 ± 3.05	80 ± 8.06
Diabéticas (control)	190 ± 4.64	444 ± 3.30
Diabéticas + Glibenclamida (600 µg/kg)	259 ± 8.28	114 ± 6.10
Diabéticas + Metformina (350 mg/kg)	248 ± 6.34	146 ± 10.17
Diabéticas + <i>Cnidoscopus chayamansa</i> (0.5 g/kg)	232 ± 7.78	190 ± 6.18
Diabéticas + <i>Cnidoscopus chayamansa</i> (1.0 g/kg)	242 ± 5.08	122 ± 8.44
Diabéticas + <i>Cnidoscopus chayamansa</i> (1.5 g/kg)	244 ± 6.34	105 ± 8.04
Diabéticas + <i>Ruta graveolens</i> (0.5 g/kg)	240 ± 9.02	118 ± 10.02
Diabéticas + <i>Ruta graveolens</i> (1.0 g/kg)	248 ± 6.18	284 ± 8.80
Diabéticas + <i>Ruta graveolens</i> (1.5 g/kg)	230 ± 8.04	276 ± 7.78
Diabéticas + <i>Citrus aurantium</i> (0.5 g/kg)	230 ± 6.04	259 ± 8.04
Diabéticas + <i>Citrus aurantium</i> (1.0 g/kg)	308 ± 7.08	238 ± 10.02
Diabéticas + <i>Citrus aurantium</i> (1.5 g/kg)	358 ± 5.46	252 ± 8.24

*Los valores representan la media ± error estándar de la media.

Cuantificación de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en forma crónica

Determinación de glucosa

Los resultados mostrados en la Tabla 3 señalan que la administración de glibenclamida (114 mg/dL) mostró efectos hipoglucemiantes ≈ similares a dosis administrada de 1.5 g/kg de *Cnidoscopus chayamansa* (105 mg/dL) y a la dosis de 0.5 g/kg de *Ruta graveolens* (118 mg/dL). Sin embargo, la aplicación de *Citrus aurantium* mostró variaciones en las diferentes dosis (238-259 mg/dL).

Cuantificación de triacilglicéridos

En la Tabla 4 se muestran los niveles de triacilglicéridos encontrados por la administración de *Cnidoscopus chayamansa* señalan una variación de 80 a 90 mg/dL en las tres diferentes dosis. Otros datos indican que la aplicación de *Ruta graveolens* a las diferentes dosis fluctuaron entre 110 a 120 mg/dL. Finalmente, otros

Tabla 2. Análisis espectrofotométrico de ultravioleta. Espectros encontrados de los diferentes flavonoides presentes en *Cnidoscopus chayamansa*¹, *Ruta graveolens*² y *Citrus aurantium*³ en un rango de 200-400 nm.

Flavonoide	λ_{\max} (ε)
<i>Dihidromiricetina</i> ¹	242
<i>Amentoflavona</i> ¹	330
<i>Rutina</i> ²	362
<i>Quercetina</i> ²	380
<i>Naringina</i> ³	372
<i>Hesperidina</i> ³	286
<i>Nobiletina</i> ³	334

Tabla 4. Datos obtenidos por la administración de *Cnidoscolus chayamansa*, *Ruta graveolens*, *Citrus aurantium* y los controles (glibenclamida y metformina) sobre los niveles de triglicéridos y colesterol en forma crónica en ratas diabéticas en forma crónica.

Grupos	peso (g) *	Glucosa (mg/dL)*
Normal	98 ± 7.74	78 ± 6.18
Diabéticas (control)	118 ± 6.64	106 ± 8.02
Diabéticas + Glibenclamida (600 µg/kg)	92 ± 8.04	118 ± 10.02
Diabéticas + Metformina (350 mg/kg)	79 ± 6.04	130 ± 6.20
Diabéticas + <i>Cnidoscolus chayamansa</i> (0.5 g/kg)	96 ± 6.68	80 ± 8.84
Diabéticas + <i>Cnidoscolus chayamansa</i> (1.0 g/kg)	90 ± 10.12	90 ± 8.02
Diabéticas + <i>Cnidoscolus chayamansa</i> (1.5 g/kg)	88 ± 7.02	88 ± 10.04
Diabéticas + <i>Ruta graveolens</i> (0.5 g/kg)	116 ± 6.64	120 ± 7.76
Diabéticas + <i>Ruta graveolens</i> (1.0 g/kg)	124 ± 8.46	110 ± 6.64
Diabéticas + <i>Ruta graveolens</i> (1.5 g/kg)	120 ± 9.02	112 ± 6.68
Diabéticas + <i>Citrus aurantium</i> (0.5 g/kg)	128 ± 6.64	158 ± 8.24
Diabéticas + <i>Citrus aurantium</i> (1.0 g/kg)	122 ± 10.02	164 ± 6.34
Diabéticas + <i>Citrus aurantium</i> (1.5 g/kg)	120 ± 8.34	172 ± 8.02

*Los valores representan la media ± error estándar de la media.

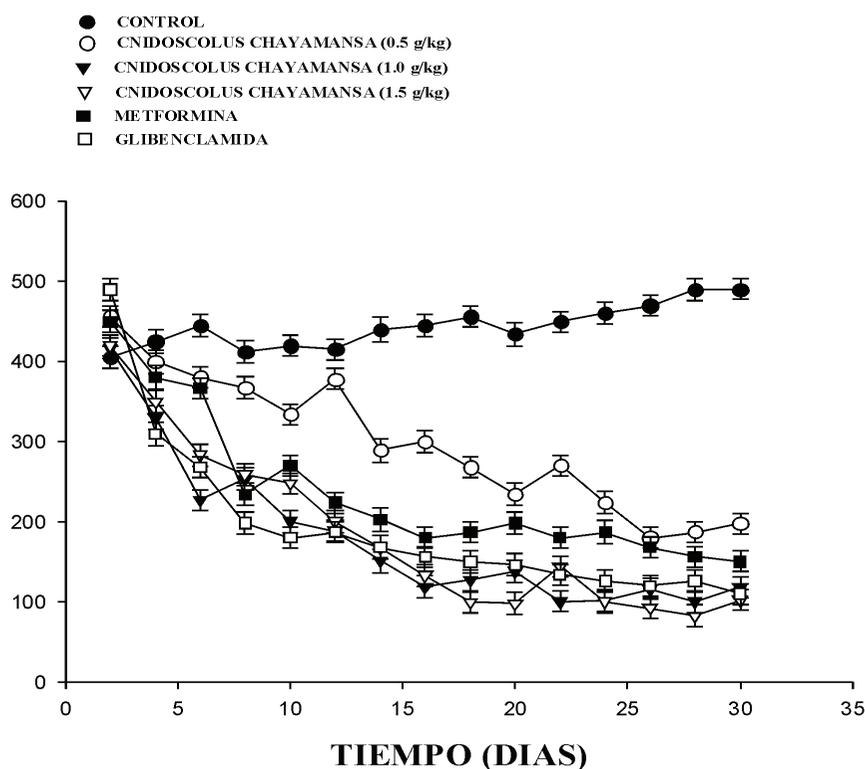


Figura 1. Efectos hipoglucemiantes de *Cnidoscolus chayamansa*. En la gráfica se observa que la glibenclamida (600 µg/kg) y la metformina (350 mg/kg) decremantan los niveles de glucosa en comparación con las condiciones control (ratas diabéticas sin tratamiento). Otros resultados muestran que *Cnidoscolus chayamansa* disminuye la concentración de glucosa dependiente de la dosis (0.5 a 1.5 g/Kg). Los efectos se expresan como área bajo la curva y cada punto representa la media ± error estándar de la media. Las comparaciones fueron realizadas entre grupos para el mismo período ($p \leq 0,05$).

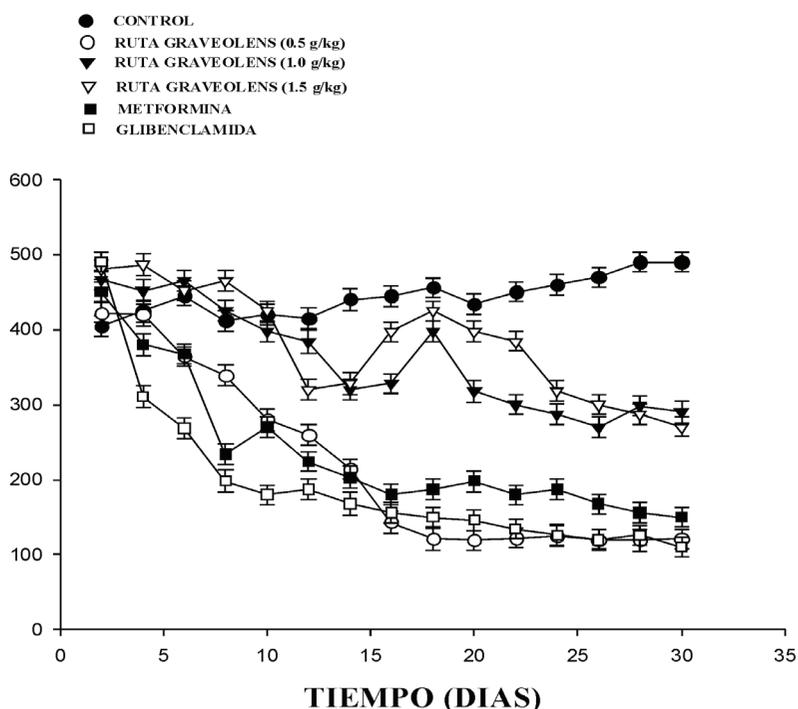


Figura 2. Actividad inducida por *Ruta graveolens*. En la grafica se observa el efecto inducido por glibenclamida (600 µg/kg) y la metformina (350 mg/kg) sobre los niveles de glucosa. Otros datos muestran que la *Ruta graveolens* disminuye los niveles de glucosa a dosis de 0.5 g/kg en comparación con las condiciones control (ratas diabeticas sin tratamiento). Los efectos se expresan como área bajo la curva y cada punto representa la media ± error estándar de la media. Las comparaciones fueron realizadas entre grupos para el mismo período ($p \leq 0,05$).

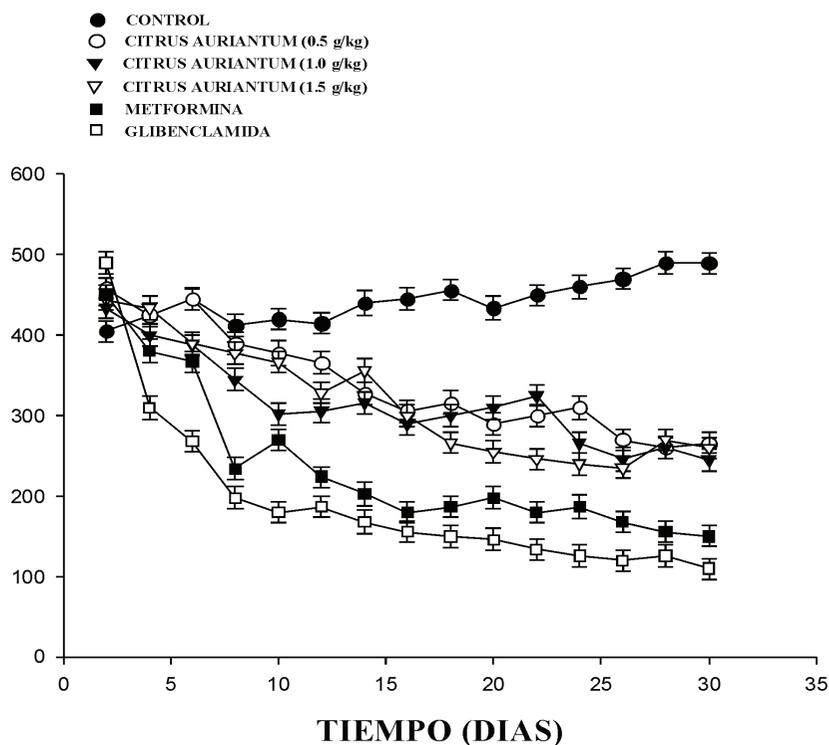


Figura 3. Efecto inducido por *Citrus aurantium* sobre los niveles de glucosa. Aquí se observa que la glibenclamida (600 µg/kg) y la metformina (350 mg/kg) disminuyen los niveles de glucosa. Otros datos señalan que *Citrus aurantium* induce variaciones en la concentración de glucosa en dosis de 0.5 a 1.5 g/kg en comparación con las condiciones control (ratas diabeticas sin tratamiento). Los efectos se expresan como área bajo la curva y cada punto representa la media ± error estándar de la media. Las comparaciones fueron realizadas entre grupos para el mismo período ($p \leq 0,05$).

datos encontrados señalan que la administración de *Citrus aurantium* a dosis de 0.5 a 1.5 g/kg mostraron variaciones de 158 a 172 mg/dL.

Evaluación de la concentración de colesterol

Los resultados mostrados en la Tabla 4, indican que la administración de *Ruta graveolens* ejerció variaciones en los niveles de colesterol (116 a 124 mg/dL) dependiente de la dosis. Además, otros datos señalan que la administración de *Citrus aurantium* a dosis de 0.5 a 1.5 g/kg mostraron variaciones entre 120 a 128 mg/dL. Finalmente, nuestros resultados señalan que los niveles de colesterol fluctuaron entre 88 a 96 mg/dL cuando se administro *Cnidoscolus chayamansa* en una manera dosis dependiente.

DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó el efecto que inducen *Cnidoscolus chayamansa*, *Citrus aurantium* y *Ruta graveolens* sobre los niveles de peso, glucosa, colesterol, triacilglicéridos (in vivo) en un modelo de rata diabética. Nuestros resultados indicaron que la administración de *Citrus aurantium* induce incrementos en el peso de las ratas diabéticas siendo este efecto dependiente de la dosis (1.0 a 1.5 g/kg) en comparación con los efectos inducidos por *Cnidoscolus chayamansa* y *Ruta graveolens*. Es valido, mencionar que estos datos son contrarios a los reportados por algunos investigadores, los cuales señalan que algunas sustancias contenidas en *Citrus aurantium* pueden inducir perdida de peso corporal (Fugh-Berman & Myers, 2004).

Por otro lado, los resultados de experimentos alternativos donde se evaluó el efecto ejercido por *Cnidoscolus chayamansa* sobre ratas diabéticas, mostraron que los niveles de glucosa disminuyeron significativamente por la administración de *Cnidoscolus chayamansa* en una manera dosis dependiente. Además, es importante mencionar que a dosis de 1.5 g/kg el efecto hipoglucemiante inducido por *Cnidoscolus chayamansa* fue similar al ejercido por la glibenclamida y diferente con respecto a la actividad hipoglucemiante ejercida por metformina. Por lo tanto, este fenómeno podría estar condicionado directamente por las características químicas de las sustancias usadas como control (glibenclamida y metformina) y por las sustancias involucradas en la estructura de *Cnidoscolus chayamansa*. Nosotros pensamos que posiblemente el efecto hipoglucemiante inducido por *Cnidoscolus chayamansa* podría depender de los flavonoides presentes en el extracto administrado en las ratas diabéticas. Por lo que en este trabajo fue realizado un análisis de espectrofotometría de ultravioleta con la finalidad de caracterizar cualitativamente los tipos de flavonoides presentes en los extractos obtenidos de *Cnidoscolus chayamansa*. Nuestros resultados mostraron dos señales para *dihydromyricetina* y *amentoflavona* siendo

similares a los reportados por otros investigadores (Heimler et al., 1992). En este sentido, es importante mencionar que se han encontrado flavonoides en las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* como son *dihydromyricetina* y *amentoflavona* [3',8"-diapigenin] (González et al., 2003) que pueden ser los responsable indirectos del efecto hipoglucemiente de *Cnidoscolus chayamansa*. Esta premisa es soportada por los estudios realizados por Cheng et al. (2008) donde se señala que la administración intragastrica de *dihydromyricetin* disminuye la concentración de glucosa en un modelo de ratas de intolerancia a la glucosa. Aunado a esto, existen datos reportados por Jong et al. (2000) los cuales muestran que la *amentoflavone* y otras sustancias pueden tener actividad sobre la alfa-glucosidasa y consecuentemente sobre los niveles de glucosa. Por lo tanto, estos flavonoides involucrados en la estructura de *Cnidoscolus chayamansa* pueden condicionar indirectamente los niveles de glucosa. Además, es importante los resultados de la administración de *Cnidoscolus chayamansa* mostraron diferencias en los niveles de colesterol y triglicéridos con respecto a las ratas diabéticas control (sin tratamiento), sin embargo en comparación con las ratas normales (no diabéticas/sin tratamiento) no se observo diferencias en la concentración lipídica. Estos últimos datos son similares a los reportados por otros investigadores (Palos, 2007), los cuales señalan que la administración *Cnidoscolus chayamansa* ejerce un efecto sobre el perfil lipídico.

Por otro lado, nos pareció importante comparar el efecto inducido por *Ruta graveolens* con el efecto ejercido por *Cnidoscolus chayamansa*. Nuestros resultados indican que *Ruta graveolens* mostró efectos contrarios a *Cnidoscolus chayamansa* dependientes de la dosis. Es así, que la administración de *Ruta graveolens* a dosis bajas (0.5 g/kg) mostró actividad hipoglucemiante, sin embargo cuando se incremento la dosis este efecto disminuyo significativamente. Este fenómeno podría deberse por un lado, a la presencia de diferentes tipos de flavonoides presente en *Ruta graveolens* como son la rutina y la quercetina (Saieed et al., 2006) en comparación con *Cnidoscolus chayamansa* y por otro, a la posibilidad de que al aumentar la dosis se este activando otro mecanismo por el cual los niveles de glucosa se incrementen. Por lo tanto, el efecto ejercido por *Ruta graveolens* al menos es inducido parcialmente a dosis bajas. Esta hipótesis, es avalada por los estudios realizados por Srinivasan et al. (2005) los cuales administraron rutina via-oral (200 mg/kg) en ratas con diabetes, sus resultados señalan que la rutina decremento parcialmente los niveles de glucosa. Otros datos, señalan que otro flavonoide involucrado en la estructura fotoquímica de la *Ruta graveolens* como es el caso de la quercetina tiene influencia sobre los niveles de glucosa, en este sentido, existen reportes donde se señala que la quercetina a dosis de 10 y 50 mg/kg promueve normalización en los niveles de glucosa en un modelo de ratas diabéticas (Nuraliev et al., 1992). Estos datos confirman que el efecto hipoglucemiante inducido por *Ruta*

graveolens puede involucrar este tipo de flavonoides.

Por otro lado, otros resultados señalan que la administración de *Ruta graveolens* no mostró diferencias en los niveles de colesterol con respecto a las ratas diabéticas control (sin tratamiento). Sin embargo, se observó un decremento en la concentración de triglicéridos de manera dosis-dependiente. Estos datos son parecidos a los reportados por Santos et al. (1999) quienes señalan que la administración de rutina indujo reducción en los niveles de triglicéridos. Aquí es importante señalar que pensando en la diferencias que encontramos sobre la actividad hipoglucemiante entre *Ruta graveolens* y *Cnidioscolus chayamansa*, en este trabajo se realizaron experimentos alternativos, donde se administró vía-oral *Citrus aurantium* a las mismas dosis. Los resultados encontrados mostraron variaciones en los niveles de glucosa, sin embargo no tiende a normalizar la concentración de la glucosa. Estos resultados, indican por que posiblemente este efecto este condicionado por los diferentes flavonoides presentes en la estructura de *Citrus aurantium* (*naringina*, *hesperidina*, *nobiletina*). Esta última premisa, puede ser avalada por estudios los cuales señalan que la naringina puede mantener el estado hiperglicémico en ratas diabéticas.

Por otro lado, la administración de *Citrus aurantium* a los grupos de animales de estudio no mostró diferencias en los niveles de colesterol con respecto a las ratas diabéticas control (sin tratamiento), sin embargo el efecto inducido por *Citrus aurantium* sobre los triglicéridos mostró incrementos dependientes de la dosis con respecto a los controles. Es importante mencionar que este fenómeno, es contrario a los reportes de Sharma et al. (2008), los cuales indican que la administración de un extracto de *Citrus aurantium* induce un efecto hipolipídico, sin embargo aquí cabe mencionar que en este reporte, el extracto fue disuelto en una solución alcohólica, lo que podría condicionar sus resultados.

En conclusión, estos datos y los resultados encontrados en este trabajo señalan: i) La *Cnidioscolus chayamansa* induce un efecto hipoglucemiante dependiente de la dosis y ejerce un efecto indirecto sobre el perfil lipídico; ii) A dosis bajas *Ruta graveolens* disminuye los niveles de glucosa, sin embargo el incremento en la dosis trae como consecuencia variación en la concentración de glucosa, colesterol y triacilglicéridos; iii) *Citrus aurantium* disminuye los niveles de glucosa, sin embargo este efecto no regula la concentración de glucosa en condiciones normales e incrementa los niveles de triglicéridos y peso corporal en una manera dosis-dependiente; y iv) Los efectos inducidos por *Cnidioscolus chayamansa*, *Ruta graveolens* y *Citrus aurantium* pueden depender del tipo de flavonoides presentes en la estructura de las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

Agraa SE, Badwi SM, Adam SE 2002. Preliminary observations on experimental *Ruta graveolens* toxicosis in Nubian

goats. *Trop Anim Health Pro* 34: 271-81.

Allain CC, Poon L, Chan SG, Richmond W, Fu P 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475.

Andrade A, Wiedenfeld H 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 78: 145-149.

Bayne K 1996. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *Am Physiol Soc Physiol* 39: 208-211.

Baynes J 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412.

Buccolo G, David H 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482.

Cheng Z, Jing C, Li-Na G, Yong C 2008. Influence of dihydromyricetin on the blood glucose concentration and early kidney's damage in impaired glucose tolerance rats. *Jingxi Hua Gong* 25: 966-969.

Colker C, Kalman D, Torina G, Perlis T 1999. Effects of *Citrus aurantium* extract, caffeine, and St. John's Wort on body fat loss, lipid levels, and mood states in overweight healthy adults. *Curr Ther Res Clin E* 60: 121-153.

Coronado G, Thompson B, Tejada S, Godina R 2004. Attitudes and beliefs among Mexican Americans about type 2 diabetes. *J Health Care Poor U* 15: 576-588.

Dyer A, Stamler J, Berkson O, Lepper M, McKean H 1977. Alcohol consumption, cardiovascular risk factors, and mortality in two Chicago epidemiologic studies. *Circulation* 56: 1067-1074.

Ezzati M, Henley J, Thun M, Lopez A 2005. Ole of smoking in global and regional cardiovascular mortality. *Circulation* 112: 489-497.

Fossati P, Prencipe L 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 28: 2077-2080.

Fugh-Berman A, Myers A 2004. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Exp Biol Med* 229: 698-704.

Funke I, Melzig M 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy-phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Rev Bras Farmacogn* 16: 1-5.

Gaziano AT 2005. Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. *Circulation* 112: 3547-3553.

Gonzales R, Flores M, Quintero M, Karchesy J 2003. Flavonoid and cyanogenic contents of Chaya (Spinach Tree). *Plant Food Hum Nutr* 58: 1-8.

Gordon D, Probstfield J, Garrison R, Neaton J, Castelli W, Knoke J 1989. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79: 8-15.

Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR 1998. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The third national health and nutrition examination

- survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 21: 518-24.
- Hawkins R 2005. Evaluation of roche accu-chek go and medisense optium blood glucose meters. *Clin Chim Acta* 353: 127-135.
- Hawthorne S, Grabanski C, Martin E, Miller D 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J Chromatogr* 892: 421-433.
- Heimler D, Pieron A, Tattini M, Cimato A 1992. Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in *Olea europae* L. leaves. *Chromatographie* 33: 349-373.
- Hitchcock P, Pugh J, Larme A, Marsh G 1997. The use of traditional plant medicines for non-insulin dependent diabetes mellitus in south Texas. *Phytother Res* 11: 512-517.
- Je H, Shin C, Park S, Yim S, Kum C 2002. Combination of vitamin C and rutin on neuropathy and lung damage of diabetes mellitus rats. *Arch Pharm Res* 25:184-190.
- Jong K, Chong K, Kun S 2000. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotech Bioch* 64: 2458-2461.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New Engl J Med* 346: 393-403.
- Lott J, Turner K 1975. Evaluation of trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem* 21: 1754-1760.
- Mahabir D, Gulliford M 1997. Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago. *Rev Panam Salud Publica* 1: 174-179.
- Moller D 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827.
- Nuraliev I, Avezov GA 1992. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. *Eksp Klin Farmakol* 55: 42-44.
- Oliveira E, Silva D, Gonçalves S, Danni F 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352: 837-53.
- O'Sullivan D, Cashman W 1970. Blood glucose variations and clinical experience with glibenclamide in diabetes mellitus. *Brit Med J* 2: 572-574.
- Palos SG del Rosario 2007. *Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (Cnidocolus chayamansa) en un modelo experimental de diabetes en ratas wistar*. Tesis Maestría en Tecnología Avanzada No. A50074. cicata-qro p. 1-106.
- Penicaud L, Hitier Y, Ferre P, Girard J 1989. Hypoglycaemic effect of metformin in genetically obese (fa/fa) rats results from an increased utilization of blood glucose by intestine. *Biochem J* 262: 881-885.
- Pérez R, Pérez C, Zavala M 1998. Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud Publ Mex* 40: 354-358.
- Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S 2005. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol Rep* 57: 90-96.
- Rates S 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Rubin RJ, Altman WM, Mendelson DN 1994. Health care expenditures for people with diabetes mellitus, 1992. *J Clin Endocr Metab* 78: 809A-809F.
- Saieed P, Reza R, Abbas D, Seyyedvali R 2006. Inhibitory effects of *Ruta graveolens* L. extract on guinea pig liver aldehyde oxidase. *Chem Pharm Bull* 54: 9-13.
- Salpeter S, Greyber E, Pasternak G, Salpeter E 2003. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 163: 2594-2602.
- Santos K, Oliveira T, Nagem T, Pinto A, Oliveira M 1999. hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacol Res* 40: 493-496.
- Sharma M, Fernandes J, Ahirwar D, Jain R 2008. Hypoglycemic and hypolipidimic activity of alcoholic extract of *Citrus aurantium* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline* 3: 161-171.
- Siguira M, Ogawa K, Masamichi Y 2006. Effect of chronic administration of fruit extract (*Citrus unshiu* Marc.) on glucose tolerance in GK rats, a model of type 2 diabetes. *Biosci Biotech Bioch* 70: 293-295.
- Singh P, Kar A 2007. Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors* 31: 17-24.
- Srinath R, Yusuf S 1998. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation* 97: 596-601.
- Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P 2005. Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Indian J Pharmacol* 37: 327-328.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D 1993. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care* 16: 434-44.
- Wongpaitoon V, Mills P, Russell R, Patrick R 1981. Intrahepatic cholestasis and cutaneous bullae associated with glibenclamide therapy. *Postgrad Med J* 57: 244-246.
- Zárate A, Tene C 1999. Nuevos fármacos en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Med Mex* 135: 91-93.