

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

**AUTENTIFICACIÓN POR CÓDIGO DE BARRAS DE ADN (ADN Barcoding)  
DE LAS PLANTAS GUARUMBO (*Cecropia obtusifolia* Bertol) Y WEREQUE  
(*Ibervillea sonorae* Greene), EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TRABAJO RECEPCIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
PROMOCIÓN DE LA SALUD

PRESENTA:

**MARÍA DEL CARMEN FRANCO GONZÁLEZ**

Director del trabajo recepcional  
**Mtro. en B. Edgar del Carmen Sierra Palacios**

México, D. F. septiembre 2015.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

**El presente trabajo fue financiado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México a través del proyecto “*Estandarización de un método molecular para la identificación de adulterantes en productos comerciales elaborados con plantas medicinales*”, convenio UACM/OAG/ADI/006/2011.**

**Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo recibido para la impresión y empastado del mismo.**

## AGRADECIMIENTOS

*Primeramente agradezco a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento, Él ha sido mi fortaleza para superar todos los momentos difíciles.*

*A mi padre que me brindó su apoyo, cariño y comprensión en todo momento y que ya se encuentra en el cielo (†), sé que desde donde se encuentre compartirá los frutos de este logro y seguirá siendo mi guía.*

*A mi esposo por toda su comprensión, cariño y respeto, ya que has sido muy importante en mi vida y en mi carrera.*

*Agradezco especialmente a mis hijos por todo su apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de la vida, gracias por su comprensión y su paciencia. Esta meta es por y para ustedes. ¡¡¡Los amo!!!*

*Asimismo a todos mis familiares que de una u otra manera me brindaron su apoyo para salir adelante.*

*A mis profesores que a lo largo de la carrera contribuyeron a mi formación profesional.*

*A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por la apertura incondicional a quien le debo mi formación personal y profesional.*

*Asimismo por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto.*

*Finalmente agradezco de manera muy especial a:*

*M en B. Edgar Sierra Palacios quien me dirigió en esta investigación por todas las enseñanzas, dedicación y la paciencia que le caracteriza, para la realización de esta tesis. ¡¡¡ Gracias por su valiosa contribución!!!*

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	III
<b>ÍNDICE FIGURAS</b>	V
<b>ÍNDICE TABLAS</b>	VI
<b>ABREVIATURAS</b>	VII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA</b>	3
2.1 Plantas medicinales	4
2.1.1 Generalidades	4
2.1.2 Empleo de las plantas medicinales en México	5
2.1.3 Plantas medicinales para la diabetes mellitus tipo 2	9
2.1.4 El guarumbo y wereque	11
2.1.4.1 Guarumbo	11
2.1.4.2 Wereque	12
2.2 La diabetes mellitus tipo 2	13
2.3 Normatividad y control de calidad en plantas medicinales	16
2.4 Técnicas de identificación ó autenticación de plantas medicinales	18
2.4.1 Marcadores morfológicos	18
2.4.2 Marcadores químicos	18
2.4.2.1 Cromatografía de capa fina	19
2.4.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución	20
2.4.2.3 Cromatografía de gases	22
2.4.2.5 Espectrometría de masas	23
2.4.2.6 Espectroscopía de infrarrojo	23
2.4.2.7 Resonancia magnética nuclear	24
2.4.3 Proteínas	25
2.4.3.1 Isoenzimas	25
2.4.4 Marcadores de ADN	26
2.4.4.1 RFLP	28
2.4.4.2 RAPD	28
2.4.4.3 AFLP	28
2.4.4.4 Microsatélites o SSR	29
2.4.4.5 SCAR	29

2.4.4.6 SNP	29
2.4.4.7 Microarreglos y secuenciación masiva de nueva generación	30
2.5 Código de barras de ADN (ADN Barcoding)	30
2.5.1 Marcador ITS	31
2.5.2 Marcador <i>psbA-trnH</i>	32
<b>2.6 PROMOCIÓN DE LA SALUD</b>	<b>33</b>
2.6.1 Promoción de la salud y plantas medicinales	34
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>35</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos particulares	37
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>38</b>
6.1 Diseño experimental	38
6.2 Compra de las plantas medicinales guarumbo y wereque	38
6.3 Extracción de ADN	39
6.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	40
6.5 Reacción en cadena de la ADN Polimerasa (PCR)	43
6.5.1 Amplificación del marcador molecular ITS	45
6.5.2 Amplificación del marcador molecular <i>psbA-trnH</i>	46
6.6 Análisis de secuencias de ADN e identificación de plantas medicinales	47
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
7.1 Adquisición de muestras	48
7.2 Extracción de ADN	49
7.3 Amplificación por PCR del marcador molecular ITS2 de guarumbo y wereque	50
7.4 Amplificación por PCR del marcador molecular <i>psbA-trnH</i> de guarumbo y wereque	51
7.5 Obtención de las secuencias nucleotídicas de ADN	52
7.6 Identificación molecular	53

<b>8. DISCUSIÓN</b>	55
<b>9. CONCLUSIONES</b>	56
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	57
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	58

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plano de la ubicación del mercado de Sonora del D. F.	7
<b>Figura 2.</b> Plano de distribución de espacios del Mercado de Sonora	8
<b>Figura 3.</b> El árbol del guarumbo	11
<b>Figura 4.</b> La planta de wereque	12
<b>Figura 5.</b> Incidencia de diabetes mellitus tipo 2 en México	15
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de HPLC	21
<b>Figura 7.</b> Análisis por cromatograma de gases	22
<b>Figura 8.</b> Muestra analizada por espectro de infrarrojo	24
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN	25
<b>Figura 10.</b> Propuesta experimental para la autenticación molecular del guarumbo ( <i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol) y wereque ( <i>Ibervillea sonorae</i> Greene)	38
<b>Figura 11.</b> Preparación de un gel de agarosa	43
<b>Figura 12.</b> Muestras de plantas medicinales adquiridas en el mercado de Sonora	48
<b>Figura 13.</b> ADN genómico en electroforesis de agarosa	49
<b>Figura 14.</b> Electroforesis en agarosa del marcador molecular ITS2	50
<b>Figura 15.</b> Electroforesis en agarosa del marcador <i>psbA-trnH</i>	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Algunas plantas medicinales altamente empleadas en la herbolaria mexicana	8
<b>Tabla 2.</b> Compuestos hipoglucemiantes de algunas plantas medicinales	10
<b>Tabla 3.</b> Tipos de técnicas analíticas para la caracterización de metabolitos de plantas medicinales	19
<b>Tabla 4.</b> Localización de algunos marcadores moleculares de ADN para plantas medicinales	27
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN a separar	42
<b>Tabla 6.</b> Reacción de PCR en 50 µL para la amplificación de ITS	45
<b>Tabla 7.</b> Programa del termociclador para la amplificación de ITS	46
<b>Tabla 8.</b> Reacción de PCR en 50 µL para la amplificación de <i>psbA-trnH</i>	47
<b>Tabla 9.</b> Programa del termociclador para la amplificación de <i>psbA-trnH</i>	47
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la secuenciación del marcador de ITS2 de las muestras de guarumbo y wereque	52
<b>Tabla 11.</b> Porcentajes de similitud de las secuencias ITS2 obtenidas de las muestras de guarumbo y wereque y su valor E	54

## ABREVIATURAS

a. C.	Antes de Cristo
ADA	American Diabetes Association
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLPs	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente
ARN	Ácido ribonucleico
CBOL	Consortio de Código de Barras de ADN para la vida
CE	electroforesis capilar
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
DDBJ	Base de datos del National Institute of Genetics de Japón
DM	Diabetes mellitus
dNTPs	Nucleótidos (adenina, guanina, timina y citosina)
ENA-EMBL	European Nucleotide Archive- European Molecular Biology Laboratory
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
GC	Cromatografía de gases
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas del National Institutes of Health de Estados Unidos
g	Gramo
HPLC	Cromatografía de alta resolución
IB-UNAM	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México
IMSS	Instituto Mexicano Del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Espectroscopia infrarrojo
ITS1	Espaciador transcrito interno número 1
ITS2	Espaciador transcrito interno número 2
Kb	Kilopares de bases de ADN
Mb	Megapares de bases de ADN
mg	Miligramo
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
μl	Microlitros

ml	Mililitros
MS	Espectrometría de masas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ng	Nanogramo
NGS	Secuenciación masiva de nueva generación
NMR	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Par de base de ADN
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
Primer F	Primer forward
Primer R	Primer reverse
<i>PsbA-trnH</i>	Espaciador intergénico de cloroplasto
p/v	Peso entre volumen
RAPDs	Polimorfismos de productos amplificados al azar
RFLPs	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
SCARs	Regiones amplificadas caracterizadas por una secuencia
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SSR	Secuencias simples repetidas
TAE	Tris-Acético glacial-EDTA
Taq pol.	Enzima Taq polimerasa
TLC	Cromatografía de capa fina

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son un recurso que el hombre ha empleado desde hace millones de años para tratar sus padecimientos de salud. No se conoce una fecha exacta del inicio del empleo de las plantas medicinales por parte del ser humano, sin embargo se tiene indicios que las primeras plantas medicinales empleadas con fines terapéuticos fue en la cultura china, esos conocimientos fueron plasmados en compendios de los cuales el más importante es el llamado “Pen tsao kang-mou” escrito en el año 2697 a. C. En él se describen aproximadamente 8,160 formulaciones medicinales, algunas de ellas son estudiadas hasta nuestros días. Uno de los papiros egipcios más famosos es el papiro de Ebers (1,550 a. C.) en él se dan a conocer más de 1,000 recetas, los egipcios clasificaron aquellas plantas y animales que tenían el poder de curar. Al especificar la enfermedad y el remedio adecuado para su tratamiento, así como la composición farmacológica y el tipo de administración. Posteriormente varias culturas hicieron de esta práctica algo cotidiano, lo que llevó a una mayor riqueza en el conocimiento de la herbolaria (Cortez y col; 2004).

En México las culturas prehispánicas desarrollaron a altos niveles la herbolaria, una tradición que hasta nuestros días se mantiene. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que aproximadamente el 80% de la población mundial en algún momento ha empleado tratamientos herbolarios, esa cifra es similar en el caso de la población mexicana, como lo comentan algunos especialistas en herbolaria del país (Katewa et al; 2004; Muñetón, 2009).

México es un país megadiverso, es el segundo lugar por el número de plantas medicinales registradas con 4,500 solo por abajo de China la cual tiene reportadas 5,000 especies medicinales. Según el Jardín Botánico de la UNAM actualmente existen 3,000 ejemplares que forman parte de una red internacional de colecciones etnobotánicas, los usos mejor representados son el comestible, el medicinal y el artesanal (Gernandt, 2012).

En investigaciones realizadas por el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social, se pudieron encontrar con 4,400 especies que la población mexicana

ocupa para el tratamiento de los distintos padecimiento de salud (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

Actualmente ante la aparición cada vez más frecuente de ciertas enfermedades en la población mexicana, como es el caso de la diabetes, las personas tratan de aliviar dicho padecimiento con medicamentos alternativos. La diabetes en México es un problema bastante serio. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 el 9.2% de la población adulta ha sido diagnosticada con diabetes, lo que representa un gasto al sector salud de cerca de 54,880 millones de pesos en su atención y complicaciones (Gutiérrez et al; 2012).

Ante los datos antes mencionados el sector salud cada vez se ve rebasado por la demanda de atención, lo que lleva a los pacientes diabéticos a la búsqueda de tratamientos alternativos eficaces y económicos. Una de estas formas alternativas de tratar la diabetes es el empleo de plantas medicinales. De acuerdo a la información obtenida de los comerciantes de plantas medicinales del Mercado de Sonora del D. F. y por estudios etnobotánicos realizados por nuestro grupo de investigación, el guarumbo (*Cecropia obtusifolia Bertol*) y el wereque (*Ibervillea sonorae Green*) son las plantas más utilizadas para combatir la diabetes.

Ante el aumento de la demanda del consumo de las plantas medicinales y la carencia de un programa que integre efectivamente los distintos aspectos relacionados con la comercialización, permite que los proveedores y comerciantes realicen prácticas de adulteración o sustitución de las plantas con actividad terapéutica (Betancourt y Gutiérrez, 1999). Por lo que es importante poder desarrollar técnicas que permitan autenticar las plantas medicinales, con el objetivo de no poner en riesgo la salud del consumidor y garantizar la efectividad de dichas plantas.

## 2. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

El uso de las plantas medicinales es quizá tan antiguo como el hombre mismo, ha estado presente a lo largo de la historia del ser humano. A pesar del avance de la farmacología, las personas recurren al uso de plantas medicinales para aliviar sus enfermedades comunes, por ello su consumo representa un aporte significativo ya que son parte de los recursos materiales con los que cuenta la población según su padecimiento, cultura, región, religión y poder adquisitivo; forman parte del patrimonio natural del país.

Se cree que éste conocimiento data por lo menos de 3,500 años a. C., provenía de los primeros hombres de América que vinieron de Asia, estos grupos conocedores de las propiedades curativas de la flora silvestre, heredaron su sabiduría a los pueblos agrícolas, origen de las diversas culturas del México antiguo. Su origen se remonta a las épocas prehispánicas, se tiene como testimonio los códices y los murales de Tepantitla en Teotihuacán, donde quedaron plasmadas las pinturas de especies medicinales autóctonas. Es en el siglo XVI cuando se reúne y escribe el conocimiento médico herbolario indígena; la obra de Martín de la Cruz traducida al latín por Juan Badiano denominada "Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis" integrado con una descripción del uso medicinal de más de 150 plantas originarias de México, que se empleaban en la medicina prehispánica. Esta obra es considerada el primer libro de herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes fuentes bibliográficas históricas de la materia farmacológica en México. El estudio de la herbolaria mexicana a la luz de la investigación clínica se observa, en gran medida, en el siglo XVIII; y en la parte farmacológica desde el siglo XIX a la fecha (Lozoya, 1998.)

Las ideas positivistas llegaron a nuestro país durante la intervención francesa. La nueva forma de abordar el estudio de la naturaleza repercutió directamente en la herbolaria. Se apoyó en la química, es así como surge la industria químico-farmacéutica para producir formas medicamentosas a base de plantas nunca antes conocidas (Lozoya et. al., 1998)

La tradición herbolaria y conocimiento tradicional de los habitantes de México contribuyeron a superar las difíciles condiciones de salud que predominaron durante la larga guerra civil y las intervenciones extranjeras en el siglo XIX. Durante el gobierno del Gral. Porfirio Díaz, se creó en 1888 el Instituto Médico Nacional que contaba con varios miles de plantas curativas colectadas y clasificadas por los botánicos. Este instituto fue el organismo del gobierno porfirista que mayor investigación científica realizó sobre la flora medicinal de México durante el siglo XIX. Durante el decenio de los años sesenta del siglo XX el nombre de México apareció con frecuencia en los reportes científicos y médicos de la investigación de plantas en el mundo (Link, 2009)

En los años setenta del siglo XX la Organización Mundial de la Salud, reconoció que las plantas medicinales usadas por las culturas autóctonas (llamada medicina tradicional) desempeñaban un papel importante en la salud de muchos países. A partir de los años ochenta, el interés por conocer las plantas medicinales y su uso se ha propagado en todo el mundo. El desarrollo tecnológico ha dado paso a nuevas metodologías y procedimientos que han modificado sustancialmente el estudio de la herbolaria y permiten visualizar el papel de los nuevos medicamentos preparados a base de plantas. La herbolaria de México, se involucra a este notable desarrollo científico y técnico. Actualmente diferentes Instituciones como es el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), algunas facultades e institutos de la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Politécnico Nacional y la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, entre otras, llevan a cabo investigaciones sobre la flora medicinal del país en muy variados aspectos (Lozoya y col., 1998).

## **2.1 Plantas Medicinales**

### **2.1.1 Generalidades**

Las plantas medicinales constituyen el principal recurso terapéutico de la medicina tradicional. Su uso ha sido una práctica que no ha caído en desuso. Se estima que 80% de la población mundial depende de remedios herbolarios tradicionales y que al menos 35,000 especies

vegetales presentan potencial para uso medicinal. La gran diversidad botánica y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas. Este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación, y continúa realizándose de manera cotidiana tanto en áreas rurales como urbanas.

En México existe una extensa variedad de plantas medicinales que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana, que comprende aproximadamente 4,500 especies, ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (García de Alba, 2012).

La OMS apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando está demostrado el beneficio y la existencia de un mínimo riesgo para el paciente. Entendiendo como medicina tradicional a la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (OMS, 2013)

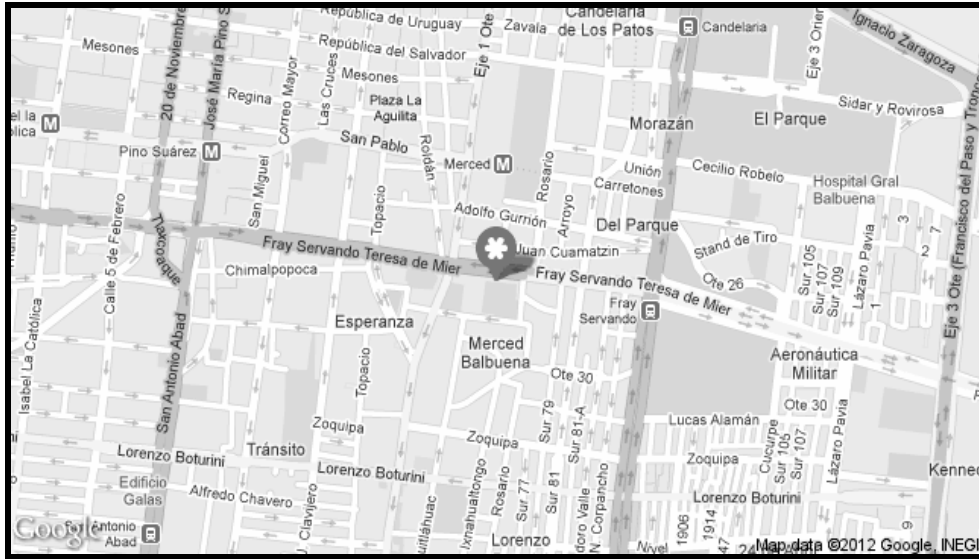
Actualmente el estudio de las plantas medicinales en México realizado en el IMSS, ha permitido tener datos estadísticos sobre la frecuencia y distribución de tales recursos, dependiendo de la enfermedad y/o síntomas para los cuales se emplean. El análisis de los resultados ha permitido establecer “Cuadros Básicos” de plantas medicinales de mayor demanda, según la medicina tradicional y el conocer las enfermedades tratadas más frecuentemente. Desde 1998 es legal el uso de la herbolaria y a partir del 19 de Septiembre del 2007 el uso de la medicina tradicional indígena.

### **2.1.2 Empleo de las plantas medicinales en México**

El uso de la herbolaria en México está tan extendido que cifras oficiales apuntan a que 50% de la población utiliza exclusivamente este tipo de remedios para atender sus problemas de salud.

Por lo general la población considera que los remedios herbolarios son inocuos, es decir, que por provenir de una planta son incapaces de hacer daño, sin embargo, estos remedios solamente se apoyan en el conocimiento popular o tradicional. Los remedios herbolarios pueden o no contener extractos estandarizados. Al emplear material botánico es necesario establecer con seguridad el género y especie de las plantas empleadas, por lo que es indispensable, como parte del control y de acuerdo con las “buenas prácticas” de fabricación de los remedios herbolarios se deben realizar entre otras pruebas, los estudios de autenticación de cada una de las plantas, además de las pruebas taxonómicas, físicas y microbiológicas. Todo ello en su conjunto permitirá que dichos insumos sean seguros, eficaces y de calidad (Martínez y col; 2004). La medicina alternativa ha logrado incrementar considerablemente el uso de remedios herbolarios. Según la Sociedad Latinoamericana de Medicina Natural y Tradicional, la industria herbolaria mexicana comercializa alrededor de 1,200 toneladas mensuales, de las cuales, el Mercado Sonora del D.F., participa con 160 toneladas, ubicando este lugar como uno de los más importantes distribuidores y comercializadores de plantas medicinales.

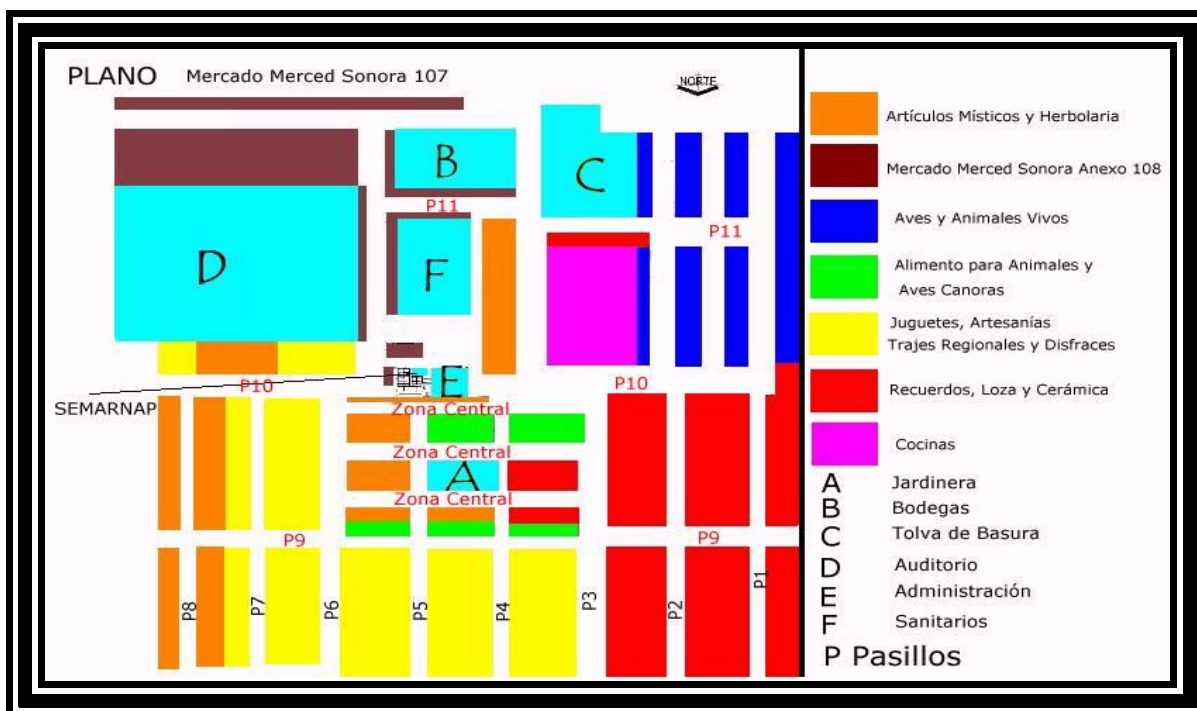
La ubicación del mercado de Sonora se encuentra justo al sureste del Centro Histórico de la Ciudad de México, en Av. Fray Servando Teresa de Mier # 419, entre las calles de San Nicolás y Canal de la Viga, Col. Merced Balbuena, Delegación Venustiano Carranza (Figura 1).



Fuente: <https://www.google.com.mx/search?q=Plano+ubicación+del+mercado+merced++Sonora+del+D:F%3B&biw=102> (24-07-2015)

**Figura 1.** Plano de la ubicación del mercado de Sonora del Distrito Federal. La estructura actual del mercado “Merced Sonora” está conformado sobre 10,262 metros cuadrados que se distribuyen en la nave mayor llamada “Mercado Merced Sonora Anexo 107” y la nave menor llamada “Mercado Merced Sonora Anexo 108” acreditados por la oficina de mercados del Departamento del Distrito Federal con clave 107 y 108 respectivamente.

Como se muestra en la figura 2, las áreas dentro del mercado están especializadas en la comercialización de ciertos productos en cada nave. Los pasillos de artículos místicos y herbolaria, constituyen los pasillos 8, parte del pasillo 10, 11, zona central y el anexo Merced Sonora 108, son las secciones que han hecho famoso al mercado; ambas áreas bien diferenciadas. En la tabla 1 se muestran algunas de las plantas medicinales más vendidas en México y que son comercializadas en el Mercado Sonora.



Fuente: <http://mercadosonora.galeon.com/mapa.htm> (24-05-2015)

**Figura 2.** Plano de distribución de espacios del Mercado de Sonora del D. F., México.

**Tabla 1.** Algunas plantas medicinales altamente empleadas en la herbolaria mexicana.

Nombre común	Nombre científico	Usos
Gordolobo	<i>Gnaphalium conoideum</i> Kunth	En enfermedades respiratorias como gripa, tos o bronquitis.
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i> L. Wild	Principalmente para curar el empacho
Manzanilla	<i>Matricaria recutita</i> L.	Para trastornos de carácter digestivo como vómito, diarrea, empacho, etc.
Prodigiosa	<i>Calea hypoleuca</i> Robins y Geenm	Destaca su utilidad ginecobstétrica: para apresurar el parto, para bañar a las parturientas

Continuación...

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Usos</b>
Tapacola	<i>Waltheria indica L.</i>	En desordenes del aparato digestivo, principalmente la diarrea.
Tila	<i>Ternstroemia pringlei</i> (Rose) Standley	Para tratar los nervios y el insomnio, además para aliviar dolores reumáticos
Yerbabuena	<i>Mentha citrata Ehrb.</i>	Contra diarreas fuertes y cólicos
Zacate de limón	<i>Cimnopogon citratus</i> (DC) Staff	Alivia dolor de estomago y otros desordenes digestivos como vómito, diarrea, mala digestión y desinflamatorio estomacal

Fuente: Juárez-Rosete y col; 2013.

### **2.1.3 Plantas medicinales para la diabetes mellitus tipo 2**

Debido a la necesidad de encontrar nuevos recursos terapéuticos para enfermedades con alta incidencia en la población mexicana, dentro de la medicina tradicional, una de las prácticas más favorecidas por la población se refiere al uso de plantas medicinales. Ante la necesidad de abatir costos, actualmente, el tratamiento para la DM se centra principalmente en el uso de fármacos hipoglucemiantes así como insulina, sin embargo, debido a los efectos adversos en tratamientos prolongados, existe una gran demanda de plantas medicinales eficaces y con baja incidencia de efectos secundarios que tienen potenciales antidiabéticos. A lo largo del siglo XX, el conocimiento médico sobre la diabetes empezó a ser incorporado dentro de la cultura médica popular y, de manera paulatina, en la medicina tradicional indígena. A partir del trabajo etnobotánico, se comenzó a recuperar el saber médico popular sobre la herbolaria, recolectar las especies medicinales y comenzar a sistematizar dicha información con el fin de tener alternativas para resolver problemas de salud como la diabetes mellitus (DM). Existe un acervo en el Herbario Medicinal del

Instituto Mexicano del Seguro Social, que representa la principal colección de flora medicinal del país y de América Latina.

La investigación acerca de los metabolitos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades crónicas como la diabetes y los mecanismos biológicos que dichos productos naturales emplean, así como sus efectos secundarios y sus propiedades tóxicas deben ser una prioridad en la investigación interesada en la medicina tradicional (Shukia y col; 2000).

En la tabla 2, se listan algunas plantas empleadas tradicionalmente en el tratamiento de la diabetes de las cuales se ha aislado un componente químico o una fracción con propiedades hipoglucemiantes demostradas científicamente.

**Tabla 2.** Compuestos hipoglucemiantes de algunas plantas medicinales.

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Parte de la planta utilizada</b>	<b>Efecto</b>
Aloe	<i>Aloe vera</i>	Toda la planta	Reduce los niveles de glucosa
Konjac	<i>Amorphophallus Konjac</i>	Tubérculo	Contiene glucomanano (polisacárido), saciante o inhibidor del apetito, además reduce los niveles de glucosa
Fenogreco	<i>Trigonella foenumgraecum</i>	Semillas	Hipoglucemiante atribuido a un alcaloide denominado trigonina.
Cebolla y ajo	<i>Allium cepa</i> y <i>Allium sativum</i>	Extractos de los bulbos	Hipoglucemiante atribuido a los componentes volátiles sulfuro de alilpropilo y sulfóxido de dialilo
Guarumbo	<i>Cecropia Obtusifolia</i>	Infusiones de las hojas del árbol	Inhibidora de la glucosidasa
Tronadora	<i>Tecoma stans</i>	Hoja y corteza seca	La tecomina y la tecostanina muestran un efecto hipoglucemiante.
Té verde	<i>Camelia sinensis</i>	Hojas	Galato de epigalocatequina presente en el té aumenta la actividad de la insulina

**Fuente:** Información etnobotánica según el herbario del IMSS [<http://myslide.es/documents/revista-conocimiento-89.html>] (24-07-2015)

## 2.1.4. El guarumbo y wereque

### 2.1.4.1 Guarumbo



Fuente: <http://www.ecosdelbosque.com/especie/cecropia-obtusifolia> (29-04-2015)

**Figura 3.** El árbol del guarumbo.

Nombre Común: Guarumbo

Nombre Científico: *Cecropia obtusifolia* Bertol.

Familia: Moraceae

Árbol que alcanza entre los 10 y 20 m de altura, con grandes hojas palmadas, largamente pecioladas, divididas en varios lóbulos, color verde oscuro. Florece, fructifica y madura sus semillas a lo largo de todo el año. Habita en climas cálido, semicálido y templado desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm. Presente en la vegetación perturbada derivada de bosque tropical. Especie originaria de América tropical, se distribuye desde el sur de Tamaulipas y Sinaloa hasta la península de Yucatán y Chiapas” (figura 3).

La población del país utiliza esta planta para varias afecciones como la diabetes, regular la presión arterial, contra picaduras de alacrán, como tratamiento de quemaduras, verrugas, dolor de cuerpo, asma, reumas, obesidad, nervios y calentura.

Diferentes estudios han mostrado que esta planta contiene ramnosa, glucosa y xilosa, así como el 5-(etoxi)-metil furfural en hoja, encontrándose también estigmasterol, 4-etil-5-(n-3-valeroil)-6-hexahidrocumarina, el l-(2-metil-1-nonen-

8-il)-aziridina y beta-sitosterol.

Los estudios farmacológicos de esta planta han demostrado que tiene un efecto hipoglucémico en modelos animales y en estudios clínicos con humanos (Costa et al; 2011; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

#### 2.1.4.2 Wereque



Fuente: <http://herbolaria.altervista.org/plantas/zapote.html> (29-04-2015)

**Figura 4.** La planta de wereque.

Nombre común: Wereque

Nombre Científico: *Ibervillea sonorae* Greene

Familia: Cucurbitácea

Es una planta de origen mexicano, perenne, dioica, que se encuentra distribuida en zonas semiáridas en los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California, crece como una enredadera de pequeñas flores amarillas y frutos rojos cuando estos maduran. Esta enredadera trepa alrededor de los árboles llegando a crecer alrededor de tres metros, la parte utilizada como medicinal es la raíz o tubérculo, la cual tiene las medidas de una jícama o betabel, es caracterizada por su fuerte sabor amargo, su tamaño puede ser de regular a grande y su color grisáceo (figura 4) (López, 1988).

La población utiliza esta planta para tratar cáncer, reumatismo, inflamaciones, dolores, padecimientos cardiacos, afecciones de la piel y diabetes.

Distintos estudios fitoquímicos de esta planta han demostrado la presencia de alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, cumarinas, quinonas, saponinas y la ausencia de taninos y sequiterpelactonas (Hernández, 2011).

En investigaciones más detalladas se ha encontrado compuestos como (8-propil-6H-[1,3];-dioxolo[4,5-g]); (cromen-6-ona;-7,8-dimetoxi-4-metil-2H-cromen-2-ona); (3-metil-7H-furo[3,2-g]); (cromen-7-ona; furanoflavona); (tacrolimus; hemantamina o fedramamina); (Karajin-[3-methoxy-furano-2,3,7,8-flavona]); (3,3-bis[1-(ciclopropilmetil)-3,6-dihidro-2H-piridin-4-yl-metil-1-fenilindol-2-ona]); (4-[1-(4-hidroxifenil)-ciclohexil]fenol); (amentoflavona;-2'-Amino-5'-clorobenzoil-2-clorobenzeno); (Dihidromanzamina A;-6-Hidroxiluteolin-7-glucosido; Malvidina-3-rutinósido); (Manzamina f-31-hidrazona); (Spicatasido ó Volkensiflavona-7"-O-glucósido); (Madrunoudeasido ó 7"-O-(6"-acetil) glucósido de morelloflavona); (Fukugisido ó 7"-O-glucósil-morelloflavona), entre otros (Nevárez, 2014).

Los estudios farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo* en animales han demostrado que esta planta presenta principalmente actividad hipoglucemiante, en menor medida anti-inflamatoria, citotóxica, antimicrobiana y reductora de la concentración de lípidos (Alarcón et al; 2002; Jardón et al; 2014; Robles et al; 2010; Rivera et al; 2011; Vega et al; 2009).

## **2.2 La diabetes mellitus tipo 2**

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónica degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria, ya que en su desarrollo participan diferentes combinaciones de genes junto con factores ambientales. Se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Los principales síntomas de la hiperglicemia son emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia) y pérdida de peso sin razón aparente (Harrison, 2006).

Esta afección tiene gran repercusión social y económica en nuestro país, ya que se encuentra entre las cinco enfermedades más frecuentes y su presencia puede derivar hacia numerosas complicaciones clínicas.

En 1997 expertos de la OMS y de la American Diabetes Association (ADA), dieron a conocer los nuevos criterios de la diabetes quedando 4 grupos: I) DM tipo1, II) DM tipo2, III) Otros tipos específicos y IV) Diabetes gestacional:

I.-La diabetes tipo1 (DM tipo1), en la cual existe destrucción de células beta del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina.

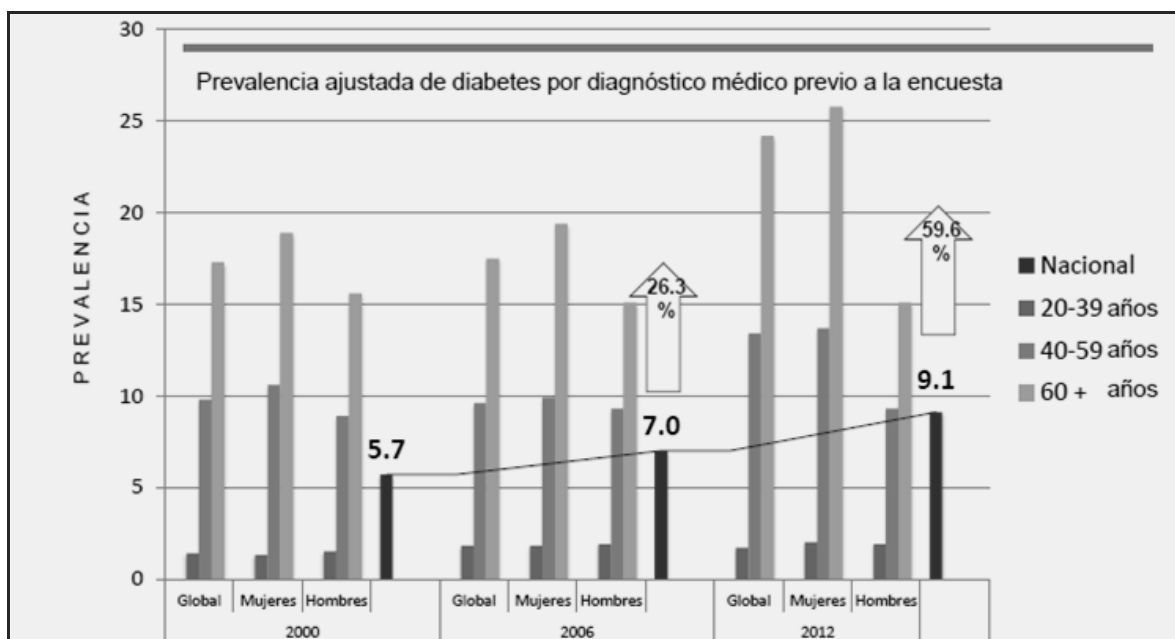
II.-El grupo II (DM tipo2), incluye a la diabetes tipo 2, en la que predomina la incapacidad para incorporar glucosa a las células musculares y al tejido adiposo (resistencia a la insulina), aunado a una relativa deficiencia de la secreción o acción de la insulina. Es importante enfatizar que el evento crítico en el desarrollo de la diabetes tipo 2 es la incapacidad de las células  $\beta$  de los Islotes de Langerhans del páncreas para secretar insulina, la deficiencia de receptores de insulina y alteraciones en la estructura de la insulina.

III.- Varios tipos específicos de la diabetes entre los que se encuentran los defectos genéticos de las células  $\beta$  del páncreas.

IV.-La diabetes gestacional, que se presenta por intolerancia a la glucosa debido a cambios metabólicos de origen hormonal (Guzman, 2003).

Hacemos énfasis en la DM tipo 2, porque además de tener una prevalencia elevada es una de las primeras causas de morbimortalidad por sus complicaciones a mediano y largo plazo y afecta a un porcentaje elevado de la población. Uno de los principales factores de riesgo para que se desarrolle es el sobrepeso y la obesidad, tendencias que van en aumento no solo en México sino en todo el mundo. En 2005 se registraron 1.1 millones de muertes debido a la Diabetes, de las cuales alrededor del 80% ocurrieron en países de ingresos bajos o medios, que en su mayoría se encuentran menos preparados para enfrentar esta epidemia. Es considerada la

principal causa de muerte en el mundo ya que afecta a más de 285 millones de personas y se espera que alcance los 438 millones para el 2030 (IDF, 2012). El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), informa que la incidencia de diabetes se incrementa con la edad, la población de 60 a 64 años, en el año 2011 era de 1,788 enfermos por cada 100,000 habitantes del mismo grupo de edad. Como se muestra en la figura 5.



Fuente: ENSANUT, 2012.

**Figura 5.** Incidencia de diabetes mellitus tipo 2 en México. Tendencias en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 por grupo de edad y sexo, 2000-2012.

Las defunciones por diabetes se concentran en la tipo 2, ya que en el 2011 representaron 62% en mujeres y 61% en varones.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año fallecen al menos 2.8 millones de personas adultas por el sobrepeso y la obesidad, lo que representa un 44% de la carga de diabetes (OMS, 2012).

### **2.3 Normatividad y control de calidad en plantas medicinales**

La demanda de plantas medicinales ha impulsado el cultivo de especies con importancia terapéutica en diversas zonas geográficas, lo que ha propiciado una variabilidad en la concentración de los principios activos favorecida por un medio ambiente diferente. Además la explotación comercial y la necesidad económica por parte de los consumidores, ha favorecido la confusión, sustitución y adulteración con otras especies similares a la planta de interés. Debido a ello, los países y sus instancias gubernamentales han desarrollado documentos oficiales, farmacopeas herbolarias en donde se recopila la información reglamentaria, los métodos de control de calidad de las plantas con uso medicinal y sus monografías (Feria, 2007).

Grupos de trabajo como la Secretaría de Salud fomentaron la regulación sanitaria y la investigación de la medicina herbolaria en México. En este sentido, surgió en 2001 la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), que tiene como objetivo “establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas; que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de la calidad de este tipo de productos y su uso adecuado”. Fue en el 2002 cuando se publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, en ella se describen las sustancias químicas vegetales, variando su contenido de acuerdo al conocimiento que se tiene de cada vegetal (Becerril, 2001).

La monografía de una planta es aquel documento en el que se especifican de manera detallada las características del material vegetal y los límites de aceptación para asegurar la calidad de cada una de las pruebas. Cada planta medicinal y específicamente la parte utilizada contienen principios activos o principales constituyentes con un perfil característico que puede ser usado para el control de calidad (Mora et al; 2012).

Actualmente el interés por las propiedades terapéuticas de los fármacos de origen vegetal ha tenido un gran incremento, incluso legislaciones en el ámbito internacional la han reconocido e incluido en sus leyes de medicamentos, destaca

el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que en 1977, reconoce la “medicina tradicional” y valida el conocimiento que sobre ella se tenía con el debido rigor científico (Ochoa, 2006).

Es en 1997 cuando en México se reconoce oficialmente el empleo de las plantas con fines terapéuticos establecidos en La Ley General de Salud que reconoce a los medicamentos herbolarios y los define como los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta, extractos y tinturas, así como jugos, resinas, ácidos grasos esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional. En la Ley General de Salud capítulo IV: Medicamentos, los Artículos 223, 224, 310 establecen el proceso de los productos que contengan plantas medicinales, queda sujeto al control sanitario y a las normas oficiales mexicanas que al efecto emita la Secretaría de Salud. Existen una serie de normas establecidas para realizar actividades de farmacovigilancia; que es la “ciencia que trata de recoger, vigilar, investigar y evaluar la información sobre los efectos de los medicamentos, productos biológicos, plantas medicinales y medicinas tradicionales, con el objetivo de identificar información, nuevas reacciones adversas y prevenir los daños en los pacientes” :

La norma oficial mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013, autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones.

Esta norma establece los requisitos mínimos necesarios para la autorización de medicamentos para uso humano, que se importen, distribuyan y/o comercialicen en el territorio nacional. Para la correcta aplicación de esta norma, es necesario consultar las siguientes Normas Oficiales Mexicanas: la norma oficial mexicana NOM-220-SSA1-2012, instalación y operación de la farmacovigilancia (15 de noviembre de 2004) y la norma oficial mexicana NOM-072-SSA1-2012, etiquetado de medicamentos y remedios herbolarios.

La autoridad sanitaria mexicana a la que le corresponde la evaluación de conformidad de las presentes normas es la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) que regula la herbolaria, a través del

departamento de evaluación de herbolarios, homeopáticos y medicamentos herbolarios, y al área de dispositivos médicos.

## **2.4 Técnicas de Identificación o autenticación de plantas medicinales**

### **2.4.1 Marcadores morfológicos**

La variabilidad biológica genética en plantas normalmente se estudia a través de descriptores o marcadores. Para poder describir las diferencias o similitudes de una planta normalmente hacemos en principio uso de marcadores de tipo morfológico, también denominados taxonómicos o tradicionales, que son fáciles de visualizar, pero requieren de un gran conocimiento botánico. Cuando hablamos de marcadores morfológicos nos referimos al color, tamaño y forma de la flor, semilla, tallo, hoja y raíz. Se debe entender que estos marcadores pueden conllevar a errores a la hora de su evaluación, ya que normalmente están influenciados por factores ambientales.

Los marcadores morfológicos son distinguibles de forma directa y nos pueden proporcionar información sobre la diversidad, el genoma y su regulación medio ambiental. Para poder registrar estos marcadores no se requiere de equipo especial, nos proporcionan una cantidad importante de datos y se pueden registrar en campo (Ligarreto, 2003; Domínguez, 2012).

### **2.4.2 Marcadores químicos**

Las plantas presentan la capacidad de producir una amplia variedad de moléculas químicas, las cuales en algunos casos son específicas de ciertas especies vegetales. Por lo que para algunos investigadores esta característica puede ser empleada para la identificación o autenticación de plantas medicinales, hay quien ha nombrado a esta práctica como la quimiotaxonomía de las plantas. Ante el desarrollo acelerado de la química analítica esta forma de identificación de las

plantas medicinales se emplea para el control de calidad de productos herbolarios.

En el análisis químico de las plantas medicinales se pueden emplear varias técnicas (tabla 3), sin embargo existen algunas que proporcionan datos más contundentes sobre la presencia de ciertos metabolitos, lo que permite mejores autentificaciones. Entre las técnicas más empleadas para la identificación o autentificación de plantas medicinales tenemos a la cromatografía de capa fina (TLC) por sus siglas en inglés, cromatografía de gases (GC), cromatografía de alta resolución (HPLC), la electroforesis capilar (CE), espectroscopia infrarrojo (IR), espectroscopia de masas (MS) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) (tabla 3). A continuación se describen algunas de ellas:

**Tabla 3.** Tipos de técnicas analíticas para la caracterización de metabolitos de plantas medicinales:

Cromatografía	Cromatografía en capa fina (TLC)
	Cromatografía gaseosa (GC)
	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
	Cromatografía líquida capilar ( $\mu$ -LC)
Electroforesis	Electroforesis en capa fina (TLE)
	Isotacoforesis (ITP) (electroforesis a velocidad uniforme)
	Electroforesis capilar (CE)
Técnicas espectroscópicas	Espectroscopía UV
	Espectroscopía infrarrojo (IR)
	Espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR)
	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)
	Espectroscopía de masas (MS)

Fuente: Ringuelet y Viña. 2013.

#### 2.4.2.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica analítica ampliamente utilizada para la separación de metabolitos o analitos. El sistema de cromatografía requiere de dos componentes, un componente

fijo o estacionario, normalmente una matriz de distintos materiales sólidos o líquidos y un componente líquido o gaseoso de naturaleza fisicoquímica diversa, dependiendo de la técnica cromatográfica en cuestión. Se fundamenta en el reparto entre dos fases. La fase estacionaria normalmente es un adsorbente el cual es colocado en un soporte de vidrio, plástico o aluminio. Los analitos<sup>1</sup> serán arrastrados por la fase móvil la cual asciende por la fase estacionaria, los analitos con mayor solubilidad en la fase móvil se desplazan una mayor distancia, mientras los que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria recorren una menor distancia. La fase estacionaria se caracteriza por tener un carácter de tipo polar, mientras que la fase móvil es poco polar, por lo que los analitos que recorren mayor distancia son aquellos compuestos químicos menos polares (Bauer y Werner, 1991).

Los compuestos que son empleados como fase estacionaria son: sílica gel, alúmina, celulosa y poliamidas. En el caso de la fase móvil son comúnmente empleados el acetato de etilo, metanol, diclorometano, isopropanol, acetona, hexano, etanol, etc.

#### **2.4.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

En la cromatografía líquida, el sistema emplea un solvente o mezcla de varios solventes como fase móvil y una fase sólida estacionaria donde se lleva a cabo la separación de los analitos. De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de la fase sólida y al tipo de detector que se utilice existen muchas aplicaciones de esta técnica. De acuerdo al material presente en la fase sólida, podemos encontrar cromatografía de

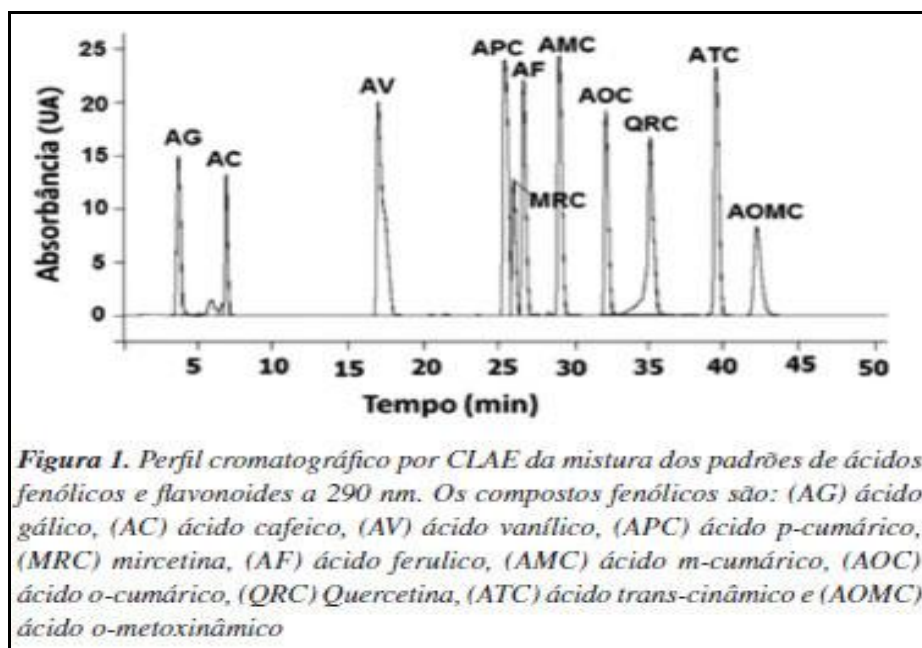
---

<sup>1</sup> hace referencia a una sustancia, la cual puede ser un ion, un elemento, o incluso un compuesto determinado, que posee un interés en nuestra muestra, pues es la parte que deseamos analizar (<http://quimica.laguia2000.com/general/analito>)

fase normal, fase reversa, intercambio iónico o filtración en gel (Rubinson y Rubinson, 2000).

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en el análisis de extractos de plantas medicinales. Es una técnica con amplio uso debido a su automatización, ya que el sistema trabaja a altas presiones con cantidades pequeñas del extracto y de los solventes, con un análisis rápido de los analitos, con determinaciones exactas de la concentración de los distintos analitos. Permite el análisis de cualquier tipo de compuestos químicos, a un bajo costo (Koh et al; 2006).

Como en cualquier técnica analítica entre más datos fisicoquímicos se conozca sobre la muestra, se analizará más rápida y de forma más exacta. La identificación de compuestos por esta técnica requiere el empleo de estándares con una alta pureza, los cuales servirán de referencia para ver cuáles son los compuestos presentes en la muestra, como se muestra en la figura 6. (Marín y Ordoñez et al, 2008).



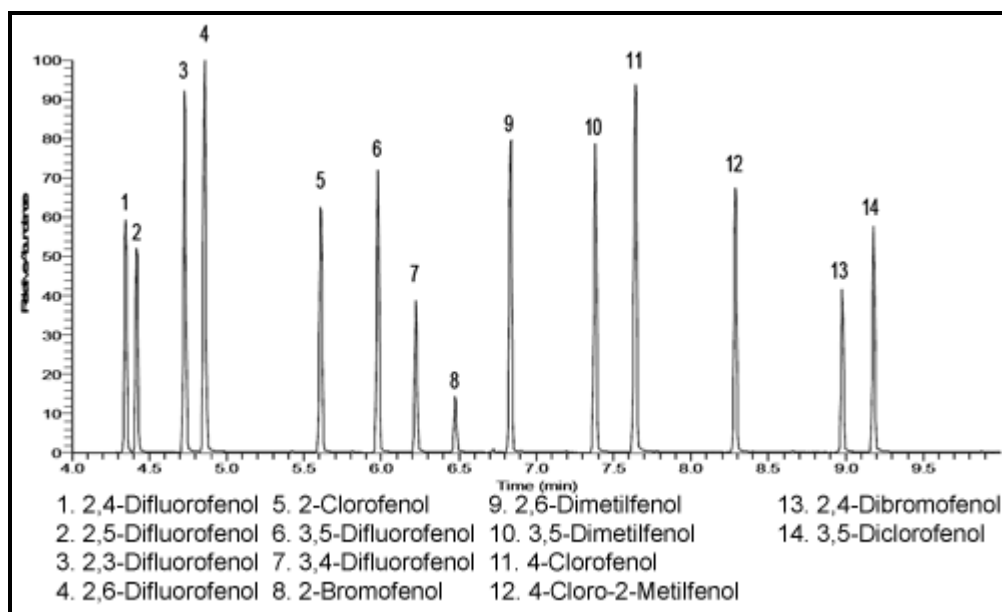
Fuente: Oliveira et al; 2012.

**Figura 6.** Cromatograma de HPLC. Análisis de compuestos fenólicos y flavonoides de una muestra por HPLC.

### 2.4.2.3 Cromatografía de gases (GC)

Es una técnica ampliamente utilizada para la separación e identificación de compuestos químicos en plantas medicinales. A diferencia de la HPLC, la cromatografía de gases utiliza como fase móvil un gas inerte, en el cual eluyen los analitos de la muestra. Es una de las técnicas empleadas para el análisis de compuestos volátiles principalmente. Requiere de flujos pequeños de la fase móvil y de poca cantidad de muestra. Actualmente es una técnica automatizada, lo que permite obtener datos de forma rápida y sencilla (Marín y Ordóñez, 2008).

En esta técnica también requerimos comparar los compuestos que van siendo detectados con compuestos que funcionan como estándares, además que se requiere conocer algunos aspectos de la muestra, para elaborar el análisis más exactos sobre los compuestos presentes en la muestra (Figura 5) (Rubinson y Rubinson, 2000).



Fuente: [http://www.cromlab.es/COL\\_GC\\_ThermoFisher\\_GOLD.htm](http://www.cromlab.es/COL_GC_ThermoFisher_GOLD.htm) (20-08-2015)

**Figura 7.** Análisis por cromatografía de gases. Cromatograma que muestra los compuestos detectados en una muestra.

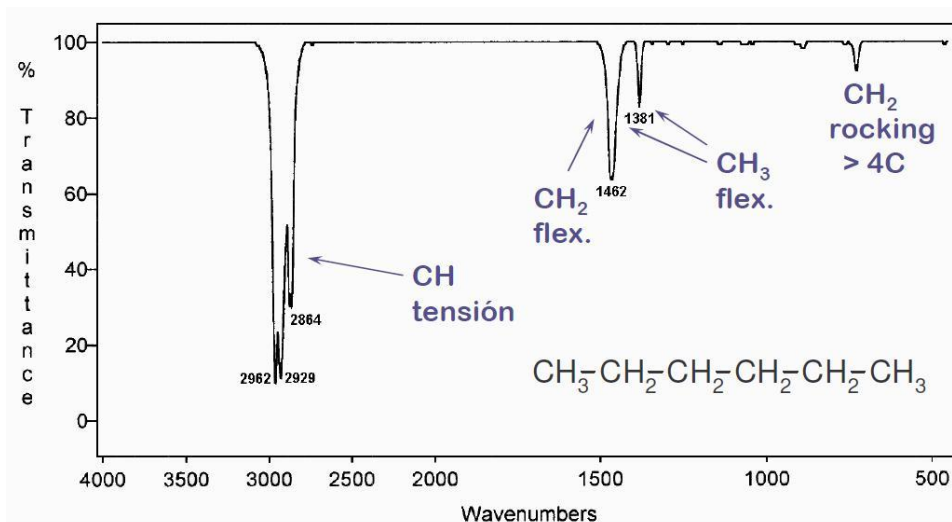
#### **2.4.2.5 Espectrometría de masas (MS)**

Es una técnica que permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos y elucidar la estructura química de las moléculas. Es la técnica más empleada para la identificación de compuestos químicos en muestras de herbolarias o de plantas medicinales, sin embargo no proporciona datos de la concentración de los metabolitos presentes en una muestra, a menos que se realice una separación previa en cromatografía de alta resolución o cromatografía de gases.

Los equipos de masas tienen la capacidad de desintegrar los átomos que conforman los compuestos químicos de las plantas y pasarlos a su forma gaseosa como iones, estos iones vaporizados se separan en base a su masa y carga, para posteriormente ser leídos por un detector. La relación masa/carga permite la identificación de los compuestos que forman parte de la muestra analizada (Hernández, 2007; Pomilio y Bernatené, 2011).

#### **2.4.2.6 Espectroscopia de infrarrojo (IR)**

El infrarrojo se encuentra exactamente por arriba del espectro visible, es un tipo de energía capaz de provocar la vibración de las moléculas, por lo cual es factible para saber los componentes presentes en una muestra. Es una técnica no destructiva, que no requiere de un gasto importante en reactivos, lo que la hace una técnica versátil, automatizada y económica. De acuerdo a la energía que se absorbe en ciertas longitudes de onda se puede interpretar los componentes químicos que se están estudiando, de alguna manera es una técnica que proporciona información sobre las estructuras químicas contenidas en una muestra (figura 8) (McMurry, 2012).

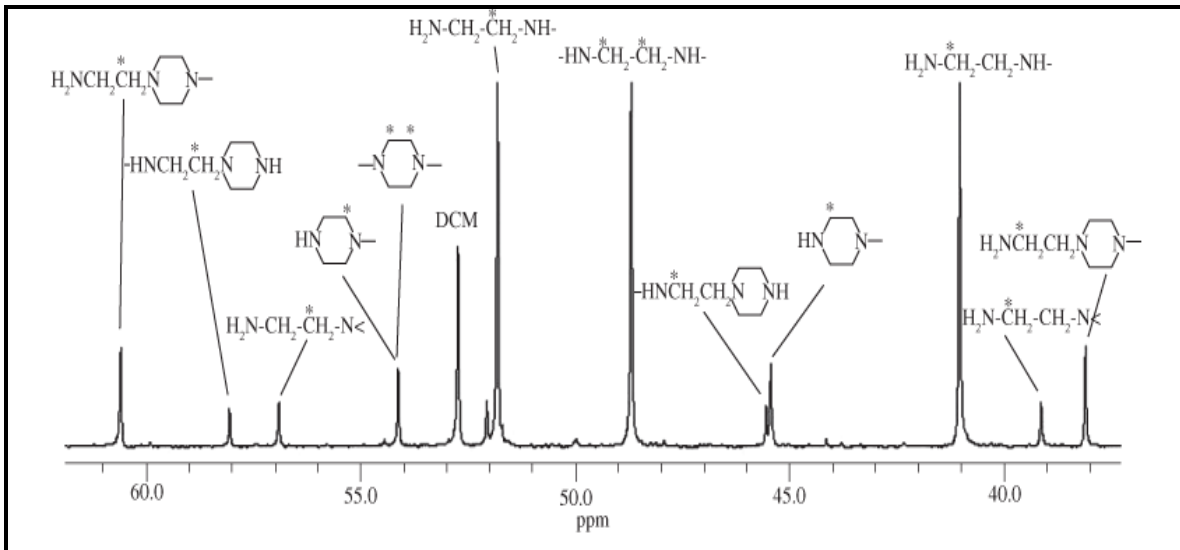


Fuente: [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe-2%20de%20agosto/leccin\\_10\\_analisis\\_de\\_espectros\\_de\\_la\\_regin\\_del\\_ir.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe-2%20de%20agosto/leccin_10_analisis_de_espectros_de_la_regin_del_ir.html) (20-08-2015)

**Figura 8.** Muestra analizada por espectroscopia de infrarrojo. Espectro de IR obtenido en el análisis de un compuesto orgánico.

#### 2.4.2.7 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica instrumental no destructiva que permite el análisis de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Por medio de ella se puede deducir la identidad de la gran mayoría de compuestos orgánicos conocidos y desconocidos. Sólo se necesitan unos cuantos miligramos de sustancia para realizar un análisis. Por su versatilidad y la riqueza de la información que produce, es la técnica más usada en la identificación de nuevos compuestos orgánicos. Esta técnica está basada en la absorción de energía de ondas de radio por parte del núcleo de algunas moléculas sometidas a un campo magnético intenso. No todos los núcleos pueden estudiarse por RMN, sin embargo la técnica se ha centrado en dos átomos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , por lo cual el estudio de cualquier extracto se puede realizar con uno de los dos átomos o con los núcleos de los dos átomos. La RMN nos permite conocer o elucidar la estructura química de los compuestos presentes en una muestra. Actualmente el adelanto en la parte analítica de estos equipos permite poder identificar compuestos en muestras relativamente pequeñas (figura 9) (Millet, 2011).



Fuente: <http://www.scielo.br/img/revistas/po/v18n1/10f1.gif> (14- Agosto-2015)

**Figura 9.-** Espectro de RMN. Análisis de un de un producto comercial con RMN.

### 2.4.3 Proteínas

Las proteínas fueron los primeros marcadores moleculares empleados para estudiar la diversidad genética en plantas. Inicialmente se estudiaron proteínas de reserva, esto debido a que no presentan una actividad enzimática, lo que las hace menos dependientes de factores ambientales. El fundamento de las técnicas que emplean proteínas para ver las diferencias en plantas es que dichas proteínas están presentes en todos los organismos vegetales y que tienen un origen evolutivo similar o igual, por lo que existen diferencias de una misma proteína entre un organismo y otro, lo cual se puede detectar por métodos de cromatografía, electroforesis, espectrometría, entre otros.

En varios estudios se ha comprobado que los patrones proteicos pueden ser heredados, además que el número de genes que codifica para estas proteínas es reducido y poco influenciado por factores ambientales (Becerra y Paredes, 2000).

#### 2.4.3.1 Isoenzimas

Las isoenzimas son proteínas con una misma actividad catalítica pero con diferencias en la secuencia de aminoácidos, expresión y regulación génica,

cinética enzimática y en los cofactores a los cuales se unen. Las isoenzimas fueron descubiertas en el año de 1957 por Hunter y Market, fueron los primeros marcadores moleculares empleados en el estudio de la diversidad vegetal (Solís y Andrade, 2005). Inicialmente se utilizó la electroforesis como el método para poder visualizar la diferencias de las isoenzimas y así poder generar patrones electroforéticos de cada organismo.

Originalmente se empleaban principalmente isoenzimas de reserva, posteriormente muchos estudios comenzaron a utilizar otras enzimas, hoy día se utilizan alrededor de 40 enzimas en este tipo de estudios, entre las más empleadas están la fosfatasa ácida y alcalina, malato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa, alcohol deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato, glutamato oxaloacetato transaminasa, leucina amino peptidasa, peroxidasa, estearasa, catalasa, etc. Sin embargo, la limitación que presentan estos marcadores es la de el número limitado de colorantes para la tinción de las distintas isoenzimas y el número de marcadores, que no son suficientes para la caracterización de todo el genoma (Asofeifa, 2006). Son múltiples los estudios donde las isoenzimas se han empleado para realizar investigaciones de poblaciones vegetales, diversidad génica e identificación, aunque esta última aplicación no es su principal objetivo de uso (Forrest, 1994).

Para realizar estudios con isoenzimas se debe elegir o seleccionar las isoenzimas a estudiar y el tejido del cual se van a extraer, posteriormente las isoenzimas son corridas en geles de almidón o PAGE, para finalmente teñirlas con un colorante específico, de esa forma se obtienen los patrones de isoenzimas que caracterizan a un organismo (Othaix, 2012).

#### **2.4.4 Marcadores de ADN**

Los marcadores de ADN son regiones o secuencias de nucleótidos bien caracterizadas dentro del genoma que presentan cierta variabilidad nucleotídica, lo que permite poder diferenciar a un organismo de otro dentro de una población. Existen varias regiones de ADN que se utilizan como marcadores moleculares, como es el caso del genoma nuclear, mitocondrial o cloroplasto (tabla 4).

Se han convertido en una herramienta útil en la identificación o autenticación de plantas medicinales, ya que no están influenciados por el medio ambiente, ni por las etapas fenológicas de las plantas. Además no se requieren grandes cantidades o partes específicas de material vegetal.

**Tabla 4.** Localización de algunos marcadores moleculares de ADN para plantas medicinales.

Cloroplasto
1. Acetil-CoA carboxilasa [ <b>gen <i>accD</i></b> ]
2. NADH-plastoquinona oxidoreductasa subunidad J [ <b>gen <i>ndhJ</i></b> ]
3. RNA polimerasa subunidad $\beta$ [ <b>gen <i>rpoB</i></b> ]
4. Maturasa K [ <b>gen <i>matK</i></b> ]
5. Ribulosa-1-5-bifosfato carboxilasa/oxiginasa [ <b>gen <i>rbcL</i></b> ]
6. RNA polimerasa subunidad $\beta'$ [ <b>gen <i>rpoC1</i></b> ]
7. Espaciador intergénico [ <b><i>psbA-trnH</i></b> ]
8. Proteína de biogénesis del citocromo C [ <b>gen <i>ycf5</i></b> ]
Núcleo
1. Espaciador transcrito interno 1 [ <b>ITS1</b> ]
2. Espaciador transcrito interno 2 [ <b>ITS 2</b> ]
3. ARN ribosomal 5.8S [ <b>gen 5.8S DNAr</b> ]
4. ARN ribosomal 18S [ <b>gen 18S DNAr</b> ]
5. ARN ribosomal 26S [ <b>gen 26S DNAr</b> ]
Mitocondria
1. Citocromo c oxidasa [ <b>gen COI</b> ]

Fuente: Marcial-Quino et al; 2015.

Las técnicas más utilizadas para el estudio de los marcadores de ADN en la identificación de plantas medicinales son:

#### **2.4.4.1 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) son un tipo de marcador de ADN que se obtiene por el corte del ADN genómico con varias enzimas de restricción, el cambio en el patrón de los fragmentos de restricción corridos en un gel de acrilamida, indica una diferencia en la secuencia nucleotídica entre un individuo y otro. Las diferencias a nivel de secuencia del ADN se pueden deber a mutaciones puntuales o alteraciones de mayor envergadura como traslocaciones, duplicaciones, inversiones, inserciones, etc. (Domínguez, 2012).

#### **2.4.4.2 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Los polimorfismos de productos amplificados al azar (RAPDs) son marcadores que se obtienen por la amplificación por PCR de secuencias cortas del genoma, para ello se utilizan oligonucleótidos de secuencia pequeña de 8-10 pares de bases (pb), por lo que no se requiere conocer la secuencia del genoma que se quiere analizar. Debido al pequeño tamaño de los oligonucleótidos, estos se pegan de forma aleatoria en el genoma, produciendo un patrón de bandas característico para cada individuo (Phillips et al; 1995).

#### **2.4.4.3 AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente (AFLPs), se obtienen con una técnica que combina el corte del ADN genómico con 2 enzimas de restricción, posteriormente se adicionan adaptadores para los extremos de los fragmentos generados tras la digestión enzimática. Para hacer selectivo la amplificación de los fragmentos de restricción, los oligonucleótidos para la amplificación por PCR son modificados con la adición de 2 ó 3 pb en el extremo 3' de la secuencia complementaria a los adaptadores pegados. Por lo que solo algunos fragmentos de los generados por la restricción enzimática serán amplificados por PCR (Karp et al; 1997).

#### **2.4.4.4 Microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats)**

Las secuencias simples repetidas son secuencias pequeñas de 2-10 pb que se repiten en serie de forma al azar en los genomas de plantas, hongos y animales; presentan una alta variabilidad pudiendo formar o no parte de secuencias codificadoras. Al presentar una alta variabilidad permiten distinguir de una forma precisa a individuos altamente relacionados, por la diferencia en tamaño de los fragmentos amplificados por PCR debido al cambio del número de repeticiones. La técnica requiere conocer las secuencias que flanquean al microsatélite, para poder realizar el diseño de los oligonucleótidos que serán empleados en la amplificación del microsatélite. El tamaño de los oligonucleótidos es relativamente grande alrededor de 20 pb. Los productos de PCR pueden visualizarse en geles de agarosa, acrilamida o en electroforesis capilar (Phillips et al; 1995; Valadez y Kahl, 2000).

#### **2.4.4.5 SCARs (Sequence Characterized Amplified Region)**

Las regiones amplificadas caracterizadas por una secuencia son marcadores que inicialmente son obtenidos por RAPDs o AFLPs, de las cuales se conoce su secuencia nucleotídica. Por lo que posteriormente se diseñan oligonucleótidos específicos de alrededor de 20 pb para amplificar estas regiones por PCR (Yadav et al; 2012).

#### **2.4.4.6 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)**

Los polimorfismos de un solo nucleótido son marcadores ampliamente utilizados para poder caracterizar a organismos específicos. Estos polimorfismos deben estar presentes; mínimo en el 1% de la población para considerarlos como SNP. Para poder aplicar esta técnica se requiere del conocimiento de la secuencia del genoma del organismo en cuestión, lo que limita la aplicación de la técnica a cualquier organismo. Aunque su aplicación en la identificación de plantas medicinales es baja, se considera que en el futuro serán marcadores de uso cotidiano (Pourmohammad, 2013).

#### **2.4.4.7 Microarreglos y secuenciación masiva de nueva generación (NGS)**

Los microarreglos fueron las primeras tecnologías de análisis masivo de ADN.

Para poder realizar identificaciones con esta técnica se requiere saber la secuencia de los marcadores que se quieren estudiar en las distintas muestras o especímenes, lo que puede considerarse de alguna manera una desventaja. Sin embargo, es una técnica que permite estudiar miles de plantas en una sola corrida. El fundamento de esta prueba es colocar sondas o marcadores de ADN de hebra sencilla específicas para cada una de las plantas que se quiere identificar, dichas sondas van fijadas a un soporte de vidrio, esto es lo que comprende la matriz de análisis, posteriormente el ADN de cada planta es puesto en contacto con el dispositivo que contiene las sondas, aquellos ADN que hibriden con las sondas serán detectados en una unidad de lectura de microarreglos. Las sondas hibridadas con ADN provenientes de las plantas emiten una fluorescencia verde, lo que indica la presencia de una planta específica entre el total de plantas analizadas. Su principal desventaja es el alto costo por cada uno de los análisis, ya que para estar seguro de los resultados se tienen que realizar varias réplicas.

La secuenciación masiva de nueva generación (NGS) es una herramienta analítica que permite realizar estudios de identificación de plantas sin conocer previamente la secuencia de los marcadores específicos de cada una de las plantas. Su objetivo es conocer la secuencia de ADN o ARN de muestras que pueden estar en una gran mezcla. Además, la capacidad de procesamiento de muestras puede ajustarse a un presupuesto determinado, característica que hace sumamente atractiva a esta técnica (Edeki, 2012; Sarwat y Yamdagni, 2014).

#### **2.5 Código de barras de ADN (DNA Barcoding)**

La iniciativa de DNA barcoding fue propuesta por el profesor Paul Hebert de la Universidad de Guelph, Canadá en el año 2003. La iniciativa está basada en utilizar una región del genoma que sirva como marcador universal. El objetivo de dicha iniciativa es conocer y de alguna manera ordenar los datos sobre diversidad biológica. Primeramente la técnica fue empleada en animales y posteriormente se comenzó a utilizar en otros organismos (Hebert et al., 2003).

Las regiones empleadas para esta técnica, requieren cumplir con algunos parámetros como: tener secuencias conservadas que flanqueen al marcador, diferencia en la longitud de pares de bases del marcador y diferencia nucleotídica. La técnica propuso inicialmente el marcador de la citocromo oxidasa c subunidad 1, que funciona bien para animales, pero pronto se observó que no era un buen marcador para otros organismos, por la presencia de intrones.

En el año 2004 la Fundación Sloan reunió los recursos para poner en práctica el Consorcio de Código de Barras de ADN para la vida (Consortium for the Barcode of Life) denominado CBOL por sus siglas en inglés.

EL CBOL comenzó con la experimentación para buscar el marcador universal que permitiera la identificación de cualquier organismo, sin embargo los resultados mostraron que era complicado obtener una sola región genómica para ser usada como marcador universal. Por lo que ahora se tienen distintos marcadores moleculares dependiendo del tipo de organismo que se quiera identificar. En el caso de las plantas el CBOL propuso los marcadores *rbcL* (enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) y *matK* (Maturasa K del RNAt de histidina), sin embargo en algunas ocasiones dichos marcadores no permiten el descarte entre organismos altamente emparentados, por lo que se han propuesto otras regiones genómicas como marcadores para ADN barcoding, como es el caso del espaciador intergénico *psbA-trnH*; *accD*; *ndhJ*; *rpoB*; *rpoC1*; *ycf5* e ITS.

### **2.5.1 El marcador ITS**

Los genes que codifican para los RNA ribosomales se encuentran principalmente en el núcleo de la célula, estos genes son el RNAr 5S; 5.8S; 18S y 28S. Algunos de estos genes tienen un arreglo en repeticiones en serie, como es el caso del gen RNAr 5.8S; 18S y 28S. Entre el gen RNAr 18S y 5.8S existe un fragmento de ADN pequeño llamado espaciador transcrito interno número 1 (ITS1) y entre el gen RNAr 5.8S y 28S está presente un segundo fragmento de ADN denominado espaciador transcrito número 2 (ITS2). Los genes ribosomales normalmente presentan secuencias altamente conservadas, a diferencia de estas, los espaciadores transcritos presentan una mayor variabilidad en plantas. Por lo que

para algunos autores las regiones ITS son buenos marcadores moleculares de ADN barcode para la discriminación entre individuos.

Ante los problemas que se han presentado con los marcadores moleculares *rbcl* y *matK* propuestos por el Consorcio de Código de Barras de ADN para la Vida (CBOL), algunos autores comenzaron a proponer nuevas regiones genómicas como posibles marcadores moleculares de apoyo en la identificación de plantas, como en este caso de la región ITS (Yao et al., 2010).

Este marcador ha sido empleado en varios análisis en plantas medicinales y ha mostrado un potencial importante para ser usado como una región barcode. Su poder de discriminación aumenta cuando se combina con marcadores del cloroplasto (Kress et al., 2005; Hollingsworth et al., 2011). Por lo que ha sido empleado para realizar identificaciones de plantas medicinales de los géneros: *Asarum*; *Astragalus*; *Atractylodes*; *Bupleurum*; *Dendrobium*; *Ephedra*; *Euphorbia*; *Fritillaria*; *Gnetum*; *Halenia*; *Lamium*; *Pseudomacranthus*; *Panax*; *Phyllanthus*; *Rehmannia*; *Salvia*; *Swertia*, entre otros (Sucher y Carles, 2008).

### **2.5.2 El marcador *psbA-trnH***

En las plantas existen tres organelos que tienen su propio genoma, el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto. De acuerdo al tamaño del genoma el nuclear (120-23,000 Mb) tiene el mayor tamaño, seguido del mitocondrial (100-600 kb) y por último, el cloroplástico (120-160 kb)<sup>2</sup>. Los genes que conforman al genoma del cloroplasto son alrededor de 90, no se encuentran de forma continua, sino que existen fragmentos que separan algunos genes de otros. La distribución o localización de los genes no se ha mantenido intacta en el cloroplasto, por lo que se presentan diferencias entre una planta y otra (Jouve, 2008). La región intergénica *psbA-trnH* es una región no codificante del genoma del cloroplasto, la cual está localizada entre el gen *psbA* (proteína D1 del fotosistema II) y el gen del RNA<sup>t</sup> de histidina (Shaw et al., 2007; Sugiura, 1992). Este marcador se ha utilizado como una región ADN barcode de apoyo a otros marcadores de ADN

---

<sup>2</sup> pb = pares de bases de ADN; Kb= kilopares de bases de ADN y Mb= megapares de bases de ADN

barcoding, existen reportes de su uso en varios estudios con plantas. Proporciona algunas veces secuencias de baja calidad, pero tiene un alto potencial para discriminar entre un organismo y otro. Dentro de las plantas medicinales donde se ha hecho uso de este marcador están los géneros: *Ephedra*; *Gnetum*; *Welwitschia*; *Vitis* y *Solanum* (Ji, 2008; Beridze et al., 2011; Spooner, 2009; Sucher y Carles, 2008).

## **2.6 PROMOCIÓN DE LA SALUD**

Durante la conferencia de Alma-Ata, celebrada en 1978, se acordó impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, abriendo las puertas al diálogo entre la medicina tradicional y la moderna.

En 1986, a raíz del pronunciamiento realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Ottawa, Canadá, se adoptó como principal estrategia de acción la Promoción de la Salud, la cual tiene como objetivo “proporcionar los medios para que la población tenga el control de su vida y su salud” (OMS, 1986). Dentro del marco de la promoción de la salud, la educación para la salud constituye una herramienta metodológica, que más allá de la modificación de conductas en los individuos, tiene como objetivo potenciar los conocimientos y habilidades que permitan a la población descubrir por sí mismos la causalidad del proceso salud-enfermedad-atención. En este sentido, la influencia que la cultura ejerce en la vida de las personas y la población en su conjunto es fundamental, entendiendo a la cultura como el conjunto de elementos de la vida cotidiana de la gente que está constituido por pautas, creencias, códigos, prácticas y conocimientos que se aprenden y se comparten, son elementos medulares en el trabajo de promoción de la salud. De manera que el proceso educativo debe propiciar la organización de la población para que ellos mismos busquen y construyan formas que transformen las condiciones adversas que afectan la salud y su vida en conjunto. (Arenas, 2001). Además, el acceso a la información y adquisición de aptitudes que le brinden al individuo la posibilidad de elegir las opciones más saludables, fomentando así el empoderamiento de la población; lo que lleva a una mayor

participación en la toma de decisiones sobre todo en aquellos aspectos que determinan su salud. Los planteamientos actuales de promoción de la salud hacen necesario desarrollar e impulsar formas que involucren a la población la búsqueda y solución a sus diversos problemas.

### **2.6.1 Promoción de la Salud y plantas medicinales.**

La dimensión cultural da cuenta de las concepciones, representaciones y prácticas relacionadas con la vida humana y su cuidado en las distintas épocas y espacios sociales. Es importante mencionar que el consumo de plantas medicinales con una adecuada responsabilidad, medidas dietéticas, actividad física, además de un buen control médico, tendrá mayores beneficios en las personas que las utilizan. La promoción de la salud, requiere de intervenciones ajustadas y concebidas desde la idiosincrasia particular de cada colectivo social, especialmente en lo que respecta a la seguridad y conocimiento de que lo que se consume sea auténticamente la planta medicinal benéfica para su salud.

Las plantas medicinales contienen principios activos que, si bien son los responsables de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen, también pueden provocar reacciones adversas que pueden aparecer si se emplean en dosis inadecuadas o por períodos prolongados. Cabe hacer notar la importancia de tener información objetiva y actualizada sobre los posibles riesgos y beneficios que tiene la automedicación. Una idea generalizada es que por el hecho de ser naturales son inocuas y seguras. Está en manos de profesionales de la salud contribuir con la educación hacia la comunidad en este tema y de esta forma garantizar el bienestar del paciente, para elevar su calidad de vida, así como el uso eficaz, seguro y racional de las plantas medicinales (Ochoa y González, 2006).

Además, los esfuerzos para conseguir cambios de comportamiento son más efectivos cuando se realizan a diferentes niveles: sociedad, instituciones, organizaciones, grupos de interés. Para ello, la promoción de la salud, permite a las personas incrementar el control sobre los determinantes de salud. Por tanto, constituye un proceso político y social global que abarca no solamente las

acciones dirigidas directamente a fortalecer las habilidades y capacidades de los individuos, sino también las dirigidas a modificar las condiciones sociales, ambientales y económicas, con la finalidad de mitigar su impacto en la salud pública y en la individual (Bennassar, 2011).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las plantas medicinales presentan un importante interés para la industria farmacéutica, están consideradas como una fuente natural de compuestos terapéuticos, por lo que han sido objeto de numerosos estudios e investigaciones que han permitido desarrollar el conocimiento en beneficio de los consumidores de éstas.

La diabetes mellitus tipo 2 es un problema de salud mundial. México se encuentra entre los países con alta prevalencia. Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente es la segunda causa de muerte en el país. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos con diagnóstico de diabetes, es decir, 9.17% de los adultos en México (Hernández et al., 2013). Ante el aumento del número de personas que presentan esta enfermedad, la incapacidad de los sistemas de salud para atender a todos los pacientes y los elevados costos de los medicamentos alopáticos, una gran parte de la población hace uso de las plantas medicinales para tratar este padecimiento, situación que normalmente exige una mayor cantidad de plantas medicinales en el mercado. Sin embargo, esta situación ha llevado a un incremento en la adulteración y sustitución de plantas medicinales. Estudios recientes elaborados en países como E.U.A., Canadá, China e India han demostrado que alrededor de un 60% de los productos herbolarios comercializados están adulterados. Esta situación es muy delicada ya que el consumidor puede sufrir los efectos secundarios de las plantas utilizadas como adulterantes, que puede incluso llevar al fallecimiento del paciente (Newmaster et al., 2014; Feria et al., 2007; Ernst, 2002).

Ante el panorama antes mencionado, cada día se está tratando de encontrar formas eficientes y eficaces para tener un control de calidad estricto en la comercialización de plantas medicinales. Durante décadas se ha utilizado la huella química como un método de autenticación de plantas medicinales, sin embargo, los métodos químicos no han funcionado totalmente, ya que el perfil químico de una planta puede cambiar debido a las condiciones fisicoquímicas del suelo y por las condiciones atmosféricas.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Una de las problemáticas en el uso de las plantas medicinales es la falta de normas o controles que garanticen o certifiquen la autenticidad de las especies comercializadas. Sucede que ante el aumento de la demanda de ciertas especies, éstas pueden ser adulteradas y poner en riesgo la salud de las personas que las consumen. Actualmente, el control de calidad se puede realizar mediante la combinación de diferentes técnicas. Las observaciones macroscópicas y microscópicas permiten identificar las plantas medicinales a nivel de especie. Sin embargo se requiere de personal calificado para llevar a cabo esta tarea. Otra forma es por medio de métodos espectroscópicos y espectrométricos de química analítica como son: IR, RMN y MS, no obstante es difícil la identificación exacta de contaminantes o adulterantes, debido a la influencia de los factores genéticos y ambientales sobre la síntesis de metabolitos secundarios.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular y la estandarización para su aplicación práctica, se han convertido en una herramienta que permite desarrollar “huellas” de ADN o código de barras de ADN (barcode) para la identificación de plantas medicinales. Estos métodos moleculares son una de las formas viables para la certificación y control de calidad de plantas medicinales. En la actualidad el empleo del ADN barcoding es un método que utiliza un marcador genético corto de ADN, cuya secuencia lo identifica como perteneciente a una especie en particular. La técnica permite identificar una muestra desconocida en referencia a una conocida. Teniendo en cuenta que la medicina tradicional mexicana cuenta con una gran cantidad de especies para el control de la diabetes mellitus tipo 2,

entre las que se encuentran el Guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y Wereque (*Ibervillea sonora* Greene), plantas ampliamente comercializadas y estudiadas farmacológicamente, creemos que es factible aplicar métodos moleculares de ADN para su autenticación.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

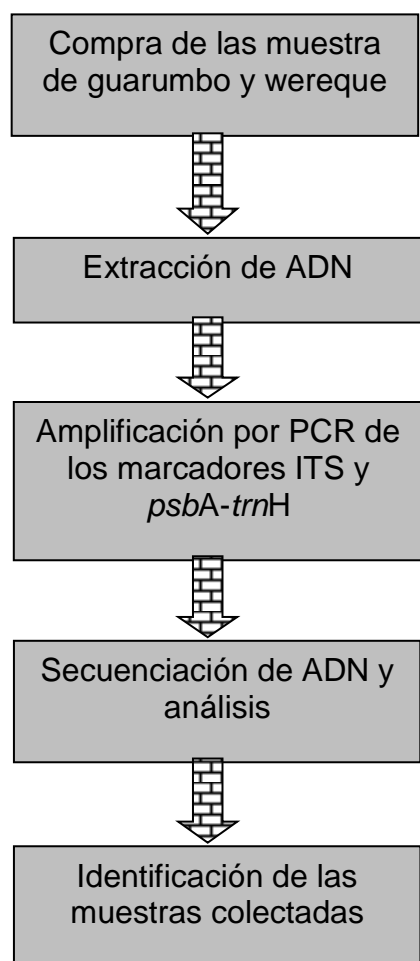
Autenticar por medio de código de barras de ADN las plantas medicinales guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonora* Greene), empleadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

### **5.2 Objetivos Particulares**

1. Realizar una colecta de muestras en el mercado de Sonora del D.F. de las plantas medicinales guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonora* Greene) empleadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.
2. Estandarizar el método de extracción de ADN para las plantas guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonora* Greene).
3. Optimizar las condiciones para la amplificación por PCR de los marcadores de ADN barcoding ITS2 y *psbA-trnH* a partir del ADN de las plantas de guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonora* Greene).
4. Efectuar la identificación molecular de las plantas colectadas por medio del análisis de las secuencias nucleotídicas de los marcadores amplificados.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Diseño experimental



**Figura 10.** Propuesta experimental para la autenticación molecular del guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonorae* Greene).

### 6.2 Compra de las plantas medicinales guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonorae* Greene)

A cada uno de los locatarios del mercado de Sonora del D. F., del área de herbolaria, se preguntó, cuáles eran las plantas más comercializadas para la diabetes mellitus tipo 2. El 100 % de los encuestados mencionaron que el guarumbo y el wereque son las plantas que más utiliza la gente para el tratamiento de la diabetes, por lo que los

materiales para el presente estudio fueron adquiridos en el mismo mercado, cada una de las muestras fue obtenida en puestos o locales diferentes.

### **6.3 Extracción de ADN**

Todos los seres vivos a nivel celular cuentan con una molécula presente en el núcleo que les permite realizar todas las operaciones celulares, dicha molécula es conocida como ADN. La información almacenada en el ADN es vital para poder hacer identificaciones de individuos o cualquier organismo. Esta información almacenada en el ADN automáticamente nos puede proporcionar toda la historia biológica de un organismo (Dorado, 2005).

#### **Materiales y equipo**

- Tubos estériles de 1.5 ó 2 ml.
- Guantes de látex
- Micropipetas P2, P20, P200 y P1000
- Gradilla para tubos de microcentrífuga 1.5 y 2 ml.
- Morteros con pistilo
- Termoblock
- Incubadora
- Etanol absoluto frío ( -20°C )
- Etanol al 70% a temperatura ambiente
- Acetato de sodio 3.5 M pH 5.2
- kit comercial “Wizard® Genomic DNA Purification”

#### **Protocolo:**

1. Se molió una fracción de hoja congelada o fresca en el mortero (15-40 mg), agregando 1-3 ml de agua destilada estéril. Con la micropipeta se tomaron 300-500 µl de la suspensión celular y se pasaron a un tubo estéril de micro centrifuga de 1.5 o 2 ml.
2. Posteriormente se adicionó 600 µl de la solución de lisis de núcleo, mezclando con el “vortex” durante 1-3 segundos. Enseguida se Incubó a 65°C durante 15 minutos.

3. A continuación se añadió 3 µl de la solución de RNAsa al tubo, mezclando por inversión de 2 a 5 veces. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Después se pusieron 200 µl de la solución de precipitación de proteínas y se mezcló fuertemente durante 20 segundos en el vortex a la máxima velocidad.
5. Luego se centrifugó a 16,000 x g durante 5 minutos. Las proteínas precipitadas formaron un pellet en el fondo del tubo.
6. Siguiendo, se tomó el sobrenadante (evitando llevarse parte del pellet) con una micropipeta y se pasó a un tubo estéril de microcentrífuga. A continuación, se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3.5 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Por último se mezcló varias veces por inversión.
7. Enseguida el tubo se incubó toda la noche a – 20 °C.
8. El ADN se recuperó centrifugando a 16,000 X g durante 5 minutos. Para más tarde eliminar el sobrenadante.
9. EL ADN fue lavado con 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezclando varias veces por inversión.
10. Se volvió a centrifugar a 16,000 X g durante 1 minuto, desechando el sobrenadante.
11. A continuación el tubo fue colocado en forma invertida sobre un papel absorbente dejando reposar durante 15 minutos para eliminar los residuos de etanol.
12. El ADN fue resuspendido en 100 µl de solución de rehidratación de DNA y se incubó a 65°C durante 10 minutos.
13. El ADN extraído fue almacenado a -20°C, una parte del ADN fue empleada para su visualización en un gel de agarosa al 0.8% (p/v).

#### **6.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La electroforesis es una técnica analítica que permite poder separar moléculas de distinto tamaño con carga eléctrica, el primero en utilizar dicho método fue Tiselius en el año 1937. La aplicación de la electroforesis en agarosa fue desarrollada por Hjertén en el año de 1961 (Hjertén, 1961). El empleo de la electroforesis de agarosa para la separación de los fragmentos de ADN se desarrolló a partir de los años 70s.

El empleo de la electroforesis en gel de agarosa es rutinario en la biología molecular. El gel se comporta como matriz monocular y permite separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en la electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de ADN de tamaño conocidos) se puede calcular el tamaño aproximado del ADN en estudio (Padilla et al; 2005).

La técnica fue empleada para el análisis y visualización del ADN proveniente de extracciones y productos de PCR.

### **Materiales y equipo**

- Agarosa
- Balanza analítica
- Báscula electrónica
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Buffer TAE 0.5X (20 mM de Tris pH 8; 10 mM ácido acético y 0.5 mM EDTA)
- Horno de microondas
- Maskintape
- Micropipetas P2 y P20
- Solución GelRed<sup>MR</sup>
- Tubos de microcentrífuga 0.5 y 1.5 ml
- Buffer de carga 6X (2 mg de orange G, 4 ml de glicerol y agua destilada hasta aforar a 10 ml)
- Marcador de selección (estándar de ADN)
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis

### **Protocolo:**

1. La concentración del gel de agarosa depende del tamaño del fragmento de ADN que se requiere separar, como se observa en la siguiente tabla:

**Tabla 5.-** Concentraciones de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN a separar.

<b>Concentración de Agarosa (%p/v)</b>	<b>Tamaño de los fragmentos de ADN</b>
0.3	5-60 kb
0.5	1-30 kb
0.7	0.8-12 kb
1.0	0.5-10 kb
1.2	0.4-7 kb
1.5	0.2-3 kb
2.0	0.05-2 kb

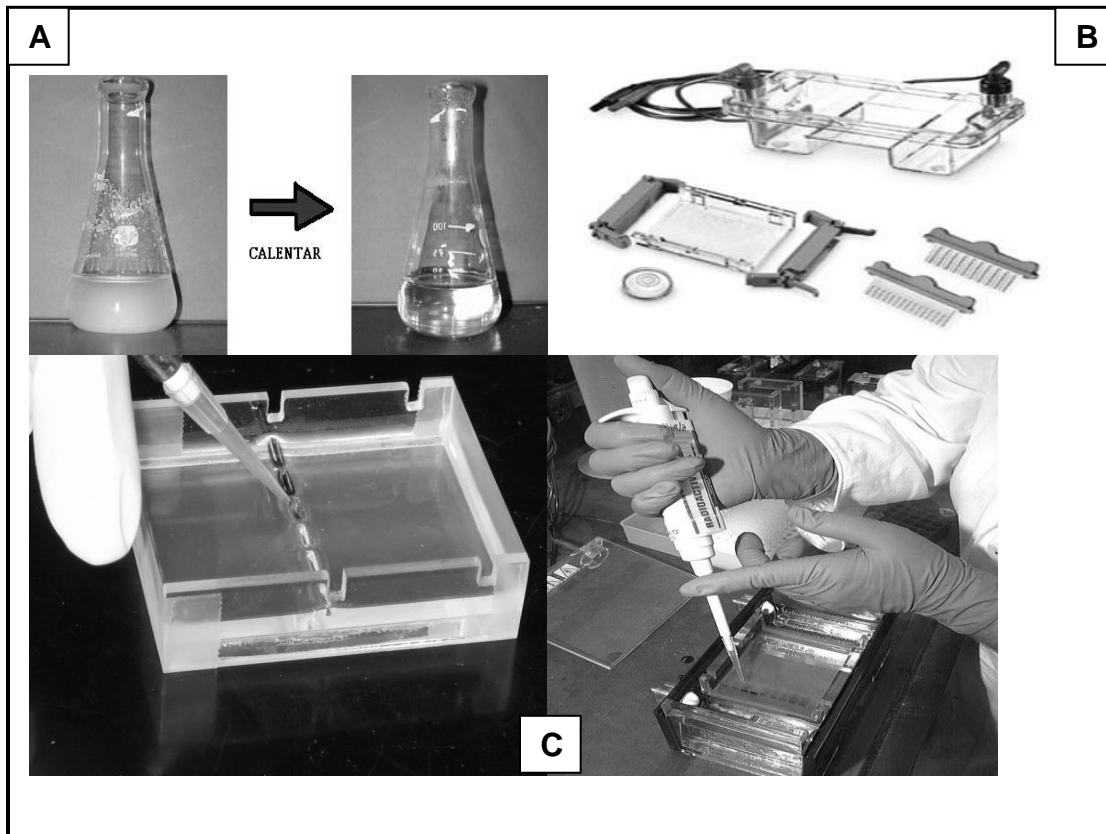
Fuente: Sierra-Palacios, 2005.

Los geles elaborados fueron de 0.8% (p/v) para el análisis de ADN proveniente de las extracciones de las plantas de guarumbo y wereque, y 2.0 % (p/v) para los productos de PCR de los marcadores ITS y *psbA-trnH* amplificados.

2. De acuerdo a la concentración requerida del gel, se pesó la cantidad adecuada de agarosa y se colocó el volumen exacto de buffer TAE 0.5X en un matraz Erlenmeyer. Los componentes colocados en el matraz fueron calentados hasta punto de ebullición en un horno de microondas durante 1 minuto, se agregó 0.3  $\mu$ L de Gelred (solución de 1 $\mu$ L en 6  $\mu$ L de agua) para la visualización del ADN.

3. Una vez que la solución de agarosa alcanzó los 45°C, esta fue vaciada en la cubeta de electroforesis. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente hasta que la agarosa se solidificó.

4. Posteriormente las muestras de ADN fueron preparadas con la adición de 5-10  $\mu$ l de ADN y 3  $\mu$ l de buffer de carga 6X. Cada muestra fue colocada en un pocillo del gel de agarosa como se muestra en la figura 11.



Fuente: <http://lifetech.wiki.hci.edu.sg/DNA+Electrophoresis>

**Figura 11.-** Preparación de un gel de agarosa. A) Disolución de la agarosa por calentamiento hasta ebullición. B) Cámara de electroforesis. C) Cargado de las muestras de ADN en el gel de agarosa.

5. En todos los geles, la primera muestra cargada fue un marcador de ADN con tamaño de fragmentos conocido (marcador de tamaño), la electroforesis se corrió con buffer TAE 0.5X a 120 volts, durante 1 hora y 10 minutos. Terminada la corrida electroforética el gel fue colocado en un fotodocumentador "Multi Doc" de la marca UVP para la visualización del ADN.

### 6.5 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

El PCR es una de las técnicas que revolucionó de gran forma a la biología molecular, dicho procedimiento fue probado por primera vez al inicio de los años 70s por Khorana (Kleppe et al., 1971). Fue en el año de 1985 cuando Kary

Mullis logró amplificar un fragmento de ADN de forma artificial y lo que dio origen a la metodología que hoy se emplea para la amplificación de cualquier ADN (Mullis, 1990).

Esta técnica es conceptualmente, un método sencillo para la amplificación de ácidos nucleicos (Saiki et al., 1985; Mullis y Faloona, 1987; Mullis, 1990). Su fundamento es el proceso natural de la replicación del ADN y, como en él, tras cada paso el número de moléculas de ADN formadas es el doble que las presentes en el paso anterior. Partiendo de una molécula de “ADN molde” podremos amplificar un millón de copias.

La técnica se basa en tres etapas:

**Desnaturalización:** Las hebras de ADN son separadas por un incremento de la temperatura alrededor de 94°C, dicha temperatura permite la pérdida de los puentes de hidrógeno que normalmente mantienen unidas las cadenas de ADN.

**Hibridación:** El fragmento que se quiere amplificar está delimitado en los extremos por 2 secuencias cortas de ADN llamadas cebadores o primer. Tienen una secuencia complementaria al ADN molde, dichos primers tienen un tamaño de 15-30 pb. Para que los primers se unan a su secuencia complementaria requieren que la temperatura de la reacción disminuya alrededor de los 50°C, esto dependiendo de la secuencia nucleotídica de los primers.

**Polimerización:** Una vez que los primers están unidos al ADN molde, la presencia de extremos 3´libres permite que la ADN polimerasa adicione nuevos nucleótidos a dicho extremo, para ello la temperatura de la reacción debe ser de 68-72°C dependiendo de la temperatura óptima de la ADN polimerasa que se esté empleando.

### **Materiales y equipos**

- Tubos de microcentrífuga de 0.2 y 0.5 ml
- Puntas para micropipeta de 2; 20; 200 y 1000 µl
- Micropipetas P2; P20; P200 y P1000
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Agua destilada estéril
- MgSO<sub>4</sub> 50 mM

- Nucleótidos 10 mM
- Primer Forward 10  $\mu$ M
- Primer reverse 10  $\mu$ M
- Enzima Taq polimerasa
- Vórtex
- Mini centrífuga
- Termociclador

### 6.5.1 Protocolo para la amplificación del marcador molecular ITS

1. La amplificación del marcador ITS se realizó de acuerdo a lo mostrado en la tabla 6, empleando el primer forward 5'-atg CGA tac ttg gtg tga at-3' y reverse 5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3' ( White et al., 1990; Chen, 2010).

**Tabla 6.** Reacción de PCR en 50  $\mu$ L para la amplificación de ITS

	Muestra								
Reactivos	G 1	G2	G3	G4	W1	W2	W3	W4	Control
									-
H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	40.2
Buffer de enzima 10X	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
ADN (25 ng)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	-----
Taq pol. (5 U/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l

2. Una vez elaboradas las reacciones de PCR estas fueron colocadas en un termociclador Maxygen, el cual se programó de la siguiente manera (tabla7).

**Tabla 7.** Programa del termociclador para la amplificación de ITS.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo.
Desnaturalización inicial	94°C	5 min.
Desnaturalización	94°C	30 seg.
Hibridación	53°C	30 seg.
Polimerización	68°C	45 min
Polimerización final	68°C	5 min.
Almacenamiento	20°C	Indeterminado

} 30 ciclos

3. Terminada la reacción de PCR, los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% (p/v) para su visualización, empleando un fotodocumentador Multi Doc de la marca UVP.

4. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Quiaex II de la marca Qiagen y enviados al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias de la Salud, unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana para su secuenciación.

### 6.5.2 Protocolo para la amplificación del marcador molecular *psbA-trnH*

1. Para el caso del marcador *psbA-trnH*, la reacción de PCR se diseñó de acuerdo a lo reportado en la tabla 8, empleando el primer forward 5'- gtt atg cat gaa cgt aat gct c-3' y reverse 5'- cgc gca tgg tgg att cac aat cc-3' (Sang et al. 1997; Tate y Simpson, 2003).

2. Las reacciones de PCR fueron colocadas en un termociclador Maxygen, el cual se programo de la siguiente manera (tabla 9).

3. Terminada la reacción de PCR, los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% (p/v) para su visualización, empleando un fotodocumentador Multi Doc de la marca UVP.

**Tabla 8.-** Reacción de PCR en 50  $\mu$ L para la amplificación de *psbA-trnH*

Reactivos	Muestras								
	G 1	G2	G3	G4	W1	W2	W3	W4	Control
H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2	40.2
Buffer de la enzima con 1.5m Cl Mg	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
ADN (30 ng)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	---
Taq pol. (5 U/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l

**Tabla 9.** Programa del termociclador para la amplificación de *psbA-trnH*

Etapa	Temperatura °C	Tiempo.
Desnaturalización inicial	94°C	5 min.
Desnaturalización	94°C	30 seg.
Hibridación	58°C	30 seg.
Polimerización	68°C	45 min
Polimerización final	68°C	5 min.
Almacenamiento	20°C	Indeterminado

} 30 ciclos

## 6.6 Análisis de secuencias de ADN e identificación de las plantas medicinales.

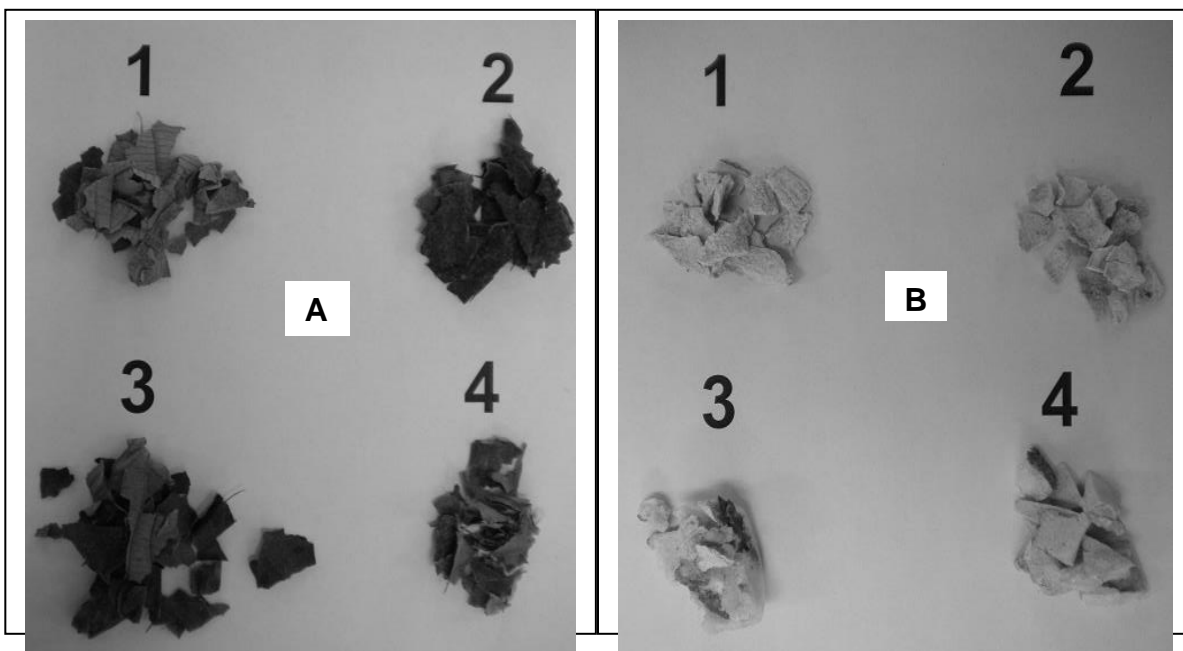
Una vez obtenidas las secuencias de ADN de los productos de PCR de cada una de las plantas empleadas; las secuencias fueron metidas a tres distintas bases de datos de ADN: Genbank (NCBI), ENA-EMBL y DDJB. Las secuencias fueron ingresadas a un algoritmo en cada una de las bases de datos, el cual lo que realiza es la comparación de la secuencia problema con las secuencias

almacenadas en estas bases de datos. El algoritmo que más se emplea para la comparación de secuencias nucleotídicas es el Blast (Johnson *et al.*, 2008). Una vez que se obtuvo el resultado de la búsqueda de secuencias almacenadas similares a la secuencia problema, se realizó el análisis del valor E, el cual nos indicó la mayor similitud entre la secuencia problema y la secuencia encontrada.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Adquisición de muestras

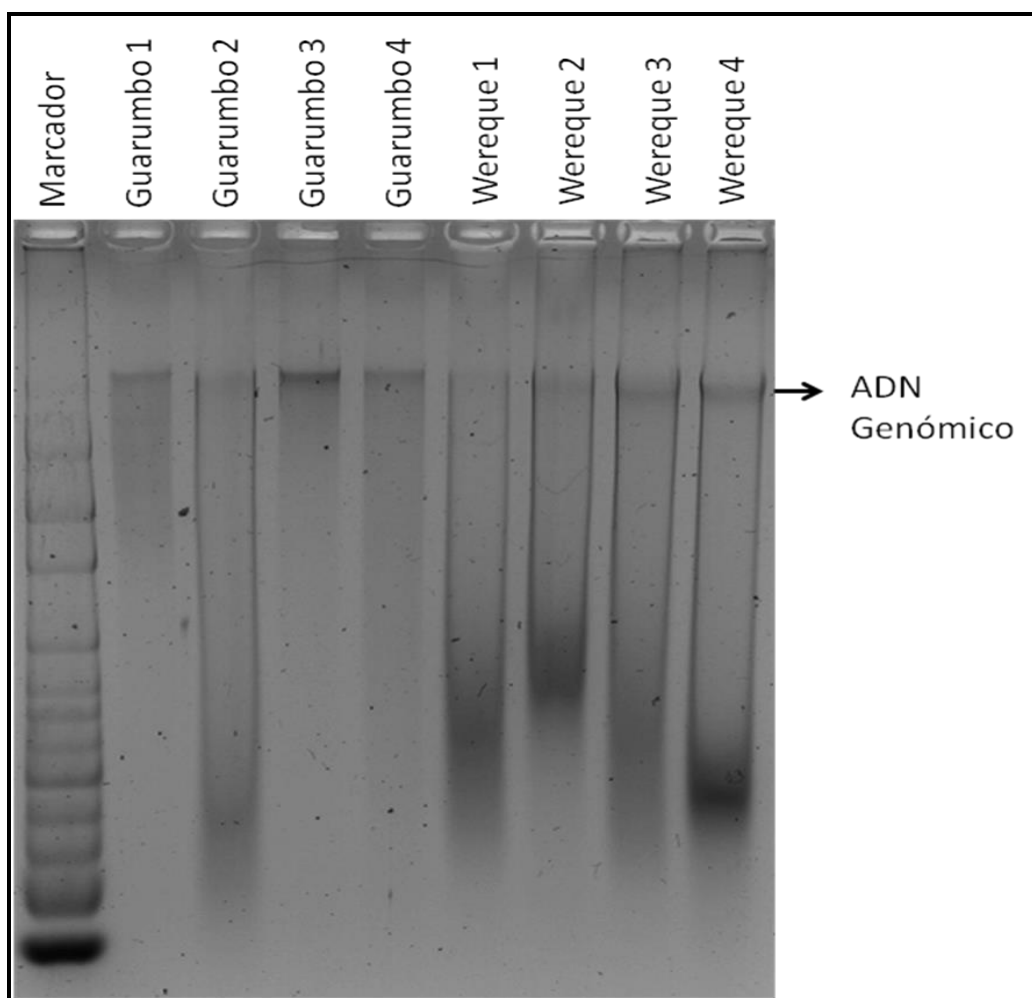
Para realizar el presente estudio se acudió a las instalaciones del mercado de Sonora del D.F. para conseguir información sobre las plantas más comercializadas para la diabetes, utilizando una encuesta estructurada, a través de información directa de los comerciantes. De acuerdo a su respuesta, las plantas más comercializadas para dicho tratamiento son el guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea Sonorae* Greene). Obteniendo así las muestras de interés en diferentes sitios de venta (figura 12).



**Figura 12.-** Muestras de plantas medicinales adquiridas en el mercado de Sonora. A) Muestras de guarumbo [*Cecropia obtusifolia* Bertol]. B) Muestras de wereque [*Ibervillea sonorae* Greene].

## 7.2 Extracción de ADN

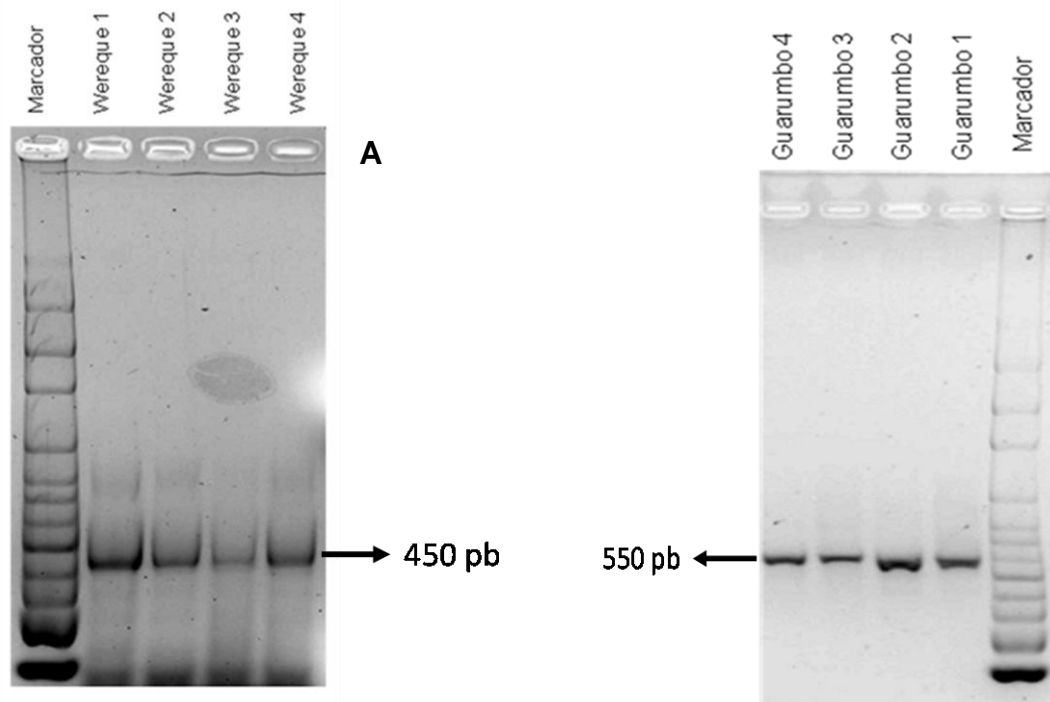
El kit “Wizard® Genomic DNA Purification” proporcionó buenos resultados en la extracción de ADN de plantas deshidratadas y pulverizadas, fue suficiente con 40 mg de material biológico para obtener una cantidad adecuada y con alta calidad de ADN. De todas las muestras de guarumbo y wereque fue posible extraer ADN, una parte del ADN está fragmentada, sin embargo podemos observar que existe una cantidad importante de ADN de alto peso molecular, por lo que es factible la amplificación de cualquier marcador molecular de tamaño grande (figura 13).



**Figura 13.-** ADN genómico en electroforesis de agarosa. Se muestra la extracción de ADN con el kit Wizar Genomic DNA de las muestras de guarumbo y wereque.

### 7.3 Amplificación por PCR del marcador molecular ITS2 de guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonora* Greene)

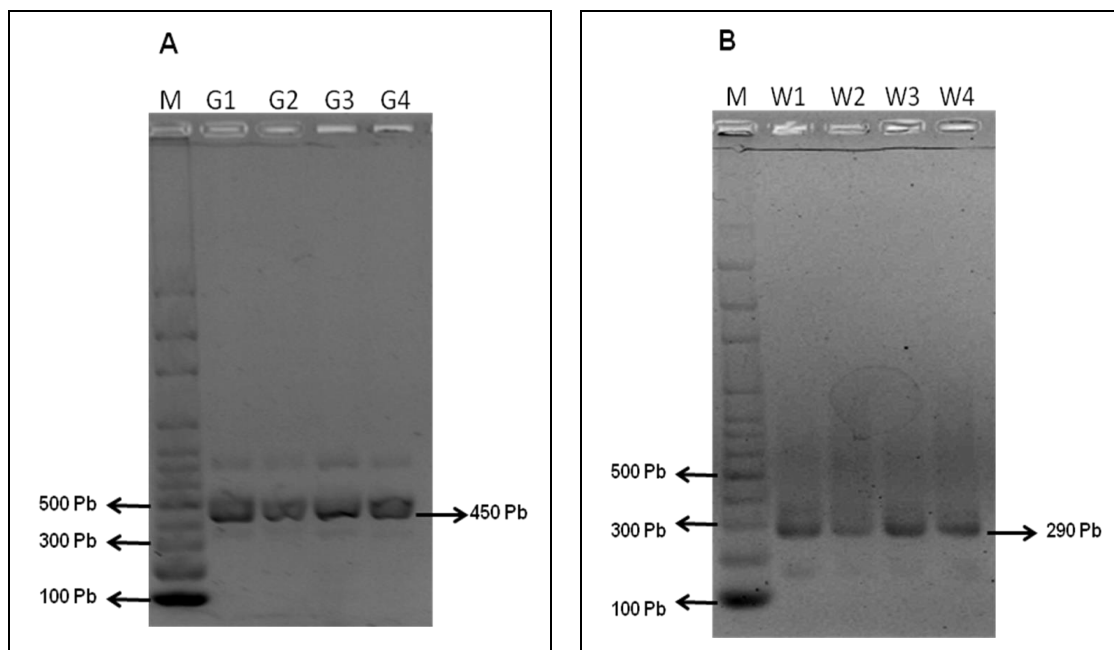
Para poder llevar a cabo el análisis sobre la autenticación de las muestras, primeramente se realizó el PCR con el marcador ITS2 de barcoding, bajo las condiciones mencionadas en la metodología. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 0.5X a un voltaje de 80 volts durante 2.5 h. Como se puede ver en la figura 14, todas las muestras de guarumbo tienen el mismo tamaño de fragmento ITS2, alrededor de 550 pb, en un primer análisis podemos mencionar que las cuatro muestras corresponden a una misma planta, ya que las bandas de PCR se encuentran a la misma altura en el gel. En el caso de las muestra de wereque, el fragmento de ITS2 amplificado presentó un tamaño de 450 pb, las cuatro muestras analizadas presentaron el mismo tamaño de fragmento de ADN y el mismo patrón electroforético, situación que confirma en un primer análisis que todas las muestras corresponden a una misma especie



**Figura 14.** Corrimiento electroforéticos del marcador molecular ITS2. A) Muestras de wereque (*Ibervillea sonora* Greene). B) Muestras de guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol).

#### 7.4 Amplificación por PCR del marcador molecular *psbA-trnH* de guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y wereque (*Ibervillea sonora* Greene)

Para poder realizar una mejor autenticación de las muestras, se realizó un segundo PCR con el marcador *psbA-trnH* de barcoding, bajo las condiciones mencionadas en la metodología. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 0.5X a un voltaje de 80 volts durante 2.5 h. Como se puede ver en la figura 15, todas las muestras de guarumbo tienen un tamaño igual de fragmento de ADN del espaciador intergénico *psbA-trnH*, alrededor de 450 pb. Para el caso de las muestras de wereque, estas tienen un fragmento más pequeño del espaciador *psbA-trnH*, ya que los productos de PCR analizados en el gel, tienen un tamaño de 290 pb, las 4 muestras presentaron el mismo tamaño y el mismo patrón electroforético. En un primer análisis podemos mencionar que las cuatro muestras de guarumbo son iguales y las 4 muestras de wereque corresponden a una misma planta, ya que las bandas de PCR se encuentran a la misma altura en el gel, para cada uno de los casos.



**Figura 15.-** Electroforesis del marcador *psbA-trnH*. A. La G1, G2, G3 y G4 corresponden a las muestras de guarumbo con un tamaño de fragmento de 450 pb. B. W1, W2, W3 y W4 corresponden a las muestras de wereque donde el marcador molecular tienen una longitud aproximada de 290 pb.

## 7.5 Obtención de las secuencias nucleotídicas del ADN

Los productos de PCR de la región ITS fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de La Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Las reacciones se analizaron en un secuenciador ABI 3100 y los resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados de la secuenciación del marcador ITS de las muestras de guarumbo (G) y wereque (W).

Muestra	Secuencia 5´-3´
<b>G1</b>	CGTCAAATTGAAACTTTGACGCAAGTTGCGTCGGAAGCCATCTGGCGAAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAC GCACGACGAAACCCCAGTCTCCACCCCGTGATTCGACGGGGCGGGCGGGCTAGAGGGGCGGACAAT GGCTTCCCGTGCGCTCGGCGCGCGGTTGGCCGAAATATCGAGTCTCGGCTGAGGCAGCCGCGACGTTCCG TGTTGTTAGAATAACTCCGTCGCCCGTCGCGCGGTTCCCTCCAGCACAGACGGACCGTCCGCGAGACCCTAA AAGCCCTTCGAGGGCCCCTCGACGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA AGCGGAGGAA
<b>G2</b>	AGAACTCTTACCTGAAATGGGGTCGCGTCGAGGGGGCCTCGAAGGGCTTTTAGGGTCTGGGGACGGTCCG TCTGTGATGGAGGACGCGACGCGACGGGGCGACGGAGTTATTCTAAAACCACCGAACGTCGCGGCTGCCTC AGCCGAGGACTCGATATTCGGCCAACCGCGCGCCGAGCGCACGGGAAGCCATTGTCCGCCCTCTAGCCC GCCCGCCCCCGTCGAATCACGGGGTGGGAGGAGCTGGGGGGCGACGGTGCCTGACGCCAGGCAGACGT GCCCTCGCCAGATGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCAC ACCAAGTATCGCAT
<b>G3</b>	CAGTTATCCCTACCTGGGGAGCAGTTGCGCCCGGTGCCGTCTGGCGAGGGCACGTCTGGCTGGGCGTCACG CACGAGGACCCGCTCCTCCACCCCGTGATTCGACGGGGCGGGCGGGCTAGAGGGGCGGACAATGGCTT CCCGTGCCTCGGCGCGCGGTTGGCCGAAATATCGAGTCTCGGCTGAGGCAGCCGCGACGTTCCGGTGGTT TTAGAATAACTCCGTCGCCCGTCGCGCGGTTCCCTCCAGCACAGACGGACCGTCCGCGAGACCCTAAAAGCC CTTCGAGGGCCCCCTCGACGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG GAGGAATTTTATTCAAACAACTAAATAAAGATTTCTTTTATTCCCTGTGTCCGTGAGCCGGGGGGTTA TTTGAAGGGAA
<b>G4</b>	TGCCTCGAAAGGCTTTTAGGGTCTGCGGACGGTCCGTCTGTGAAGGAGGACGCGGGCGACGGGGCGACGGA GTTATTCTAAAACCACCGAACGTCGCGGCTGCCTCAGCCGAGGACTCGATATTCGGCCAACCGCGCGCCG AGCGCACGGGAAGCCATTGTCCGCCCTCTAGCCCGCCCGCCCCGTCGAATGACGGGGTGGGAGGAGCT GGGGGGCGACGGTGCCTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGCCAGATGGCTTCGGGCGCAACT
<b>W1</b>	GGCGAAAATCGAAAATTTTGGACGCAAGTTGCGTTCGTGAGCCTTCTGGCCGAGGAAAAAATAGCCTGGGC GTCACGCATGAGAAAACAAGTGAACCCCTTCGAACGGGTTGTTGTGCATGAAGAGCAACGCTGGCCTCAC GTGTGCACTGAGCGTGCAGATGGCTTAAATTTGAGTCTCGGCGCCTGTCGTCTGACACTACGGTGGTTGA TCCAACTCATTACCGTGTGCGACCTCAGCCAGCGCACCTTGCCCTCCCTCCAAGTGAAGCGAGCGAGCAA GCGATCCAACACTCCCCCTTGAACGTTGAAGCGTAAGGCCACAGTCTCACCTCTCCCCGCGACCCAG GTATTACCGGACTACTTTATGAATGGTAGGGAAGAAGAAGGAAATGAGGAA

Continuación....

<b>W2</b>	AACCAAAACCGCCTACCTGGGGTCGCGTCGTGAGCGTGGCCCCTTTGCGGGACGAACGCTTTCAAAGGGTTC AGTGTGGGAGGAGCTCGCTCGCTCACTCACTTGGAGGGAGGGGCAAGGCGTGCTGGCTGAGGTCGCGACG CGGTACTGAGGTTGGATCAACCACCGTAGTGTCACGACGACAGGCGCCGAGGACTCAAATTTAAGCCATCCG CGCGACGGTGCACGCGGAGGCCAGCGTGTGCCCTCCTGCACAACGAACCCGTTTGAAGGGGGTTGAGCG GGGGGGCAGCGATGCGTGACGCCAGGCAGGCGTGCCCTCGGCCAGAAGGCTCCGGGGGGGGTTCTCGG GATCCTGCAAGTGATCCAATAATCGCTTA
<b>W3</b>	CTTCATGCAAATTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAGCCTTCTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACG CATCGCTGACCCCCCGCTCAACCCCTTCAAACGGGTTCTGTTGTGCAGGAGGGGCACACGCTGGCCCTCCCGT GCGCACCGTCGCGCGGATGGCTTAAATTTGAGTCCTCGGCGCCTGTGCTGCTGACACTACGGTGGTTGATCC AACCTCAGTACCGCGTCGCGACCTCAGCCAGCACGCCTTGCCCTCCCTCCAAGTGAGTGAGCGAGCGAGC GAGCGAGCACTCCACACCGACCCCTCGAACGTGTCGCCGCAAGGGCCACGCTCTCGACGCGACCCAGGT CAGGCGGGACTACCCGCTGAATTTAGGCATATCAATAAGCGGAGGAA
<b>W4</b>	CCAACTGCCTGACTGGGGTCGCGTCGAGAGCGTGGCCCTTGCGGGACGACGTTTGAAGGGTCGGTGTGGGA GTGTCGCTCGCTCGCTCGCTCACTCACTTGGAGGGAGGGGCAAGGCGTGCTGGCTGAGGTGCGGACGCGGT ACTGAGGTTGGATCAACCACCGTAGTGTCACGACGACAGGCGCCGAGGACTCAAATTTAAGCCATCCGCGCG ACGGTGCACGCGGAGGCCAGCGTGTGCCCTCCTGCACAACGAACCCGTTTGAAGGGGGTTGAGCGGGG GGGCAGCGATGCGTGACGCCAGGCAGGCGTGCCCTCGGCCAGAAGGCTCCGGGGCGCAACTTGCCTTCAA GACTCGGTGGTTGCGGGATCCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATA

## 7.6 Identificación molecular

En el caso de las muestras de guarumbo las 4 coincidieron con la planta *Cecropia ficifolia* con porcentaje de identidad del 94 al 98% y con valores de E<sup>3</sup> de 1e-122 a 4e-172. La búsqueda de secuencias se realizó en tres bases de datos de ADN: Genbank; ENA-EMBL y DDBJ, en las tres bases de datos se obtuvo el mismo resultado (tabla 11).

Para el caso del wereque las secuencias del ITS2, la muestra W1 coincidió con la planta *Ibervillea sonora* con una identidad de 82.9-92% con valores de E de 1e-65 a 5.8e-86, el resto de las muestras coincidieron con la planta *Ibervillea tenuisecta* con 90.7-100% de identidad y con valores de E 5.9e-109 a 0.0 (tabla 11).

<sup>3</sup> Valor E, es un dato que nos indica que la búsqueda de una secuencia parecida a la obtenida por secuenciación se realizó de forma al azar, lo que le proporciona valor estadístico al resultado. Entre más pequeño es el valor de E mayor similitud de nuestra secuencia con la secuencia encontrada en la base de datos.

**Tabla 11.** Porcentajes de similitud de las secuencias ITS obtenidas de las muestras de guarumbo (G) y wereque (W) y su valor E.

Muestra	Planta	Base de datos NCBI		Base de datos DDBJ		Base de datos ENA-EMBL		Código de la secuencia utilizada para realizar la comparación
		% de similitud*	Valor E <sup>a</sup>	% de similitud*	Valor E	% de similitud*	Valor E	
G1	<i>Cecropia ficifolia</i>	95	8e-154	94	1e-147	NE	NE	NF137825
G2	<i>Cecropia ficifolia</i>	98	4e-172	98	1e-172	NE	NE	NF137825
G3	<i>Cecropia ficifolia</i>	95	2e-146	94	1e-142	94.5	3.5e-146	NF137825
G4	<i>Cecropia ficifolia</i>	97	1e-162	96	1e-125	96.8	1.6e-122	NF137825
W1	<i>Ibervillea sonora</i>	86	1e-82	92	1e-65	82.9	5.8e-86	KJ531873
W2	<i>Ibervillea tenuisecta</i>	95	6e-142	100	1e-141	94.3	8e-141	KJ531875
W3	<i>Ibervillea tenuisecta</i>	99	2e-176	99	0.0	99.4	1.2e-170	KJ531875
W4	<i>Ibervillea tenuisecta</i>	99	0.0	99	1e-174	90.7	5.4e-109	KJ531875

(\*) Con secuencias almacenadas en cada una de la bases de datos empleadas. (a) Es un dato que nos indica que la búsqueda de una secuencia parecida a la obtenida por secuenciación se realizó de forma al azar, lo que le proporciona valor estadístico al resultado. (NE) No se encontró secuencia para su comparación

## 8. DISCUSIÓN

De acuerdo a las secuencias obtenidas del ITS2 de las muestras de guarumbo, todas las muestras corresponden a *Cecropia ficifolia*, sin embargo, se debe tener en cuenta que las secuencias de ITS2 de *Cecropia obtusifolia Bertol* no están reportadas en ninguna de las bases utilizadas para el análisis de identificación, por lo que los resultados nos proporcionan un dato contundente en cuanto al género de las muestras y no es concluyente al 100% en cuanto a la especie, lo cual se debe tomar con reserva. De acuerdo a los reportes, *C. ficifolia* es un especie a la cual no se le han realizado estudios para el control de la hiperglucemia.

En relación a las muestras de wereque, éstas mostraron alta similitud con dos especies del mismo género. Una de las especies corresponde al wereque (*Ibervillea sonora*) la cual tiene estudios farmacológicos que demuestran su actividad hipoglucemiante, mientras que *Ibervillea tenuisecta* no ha sido evaluada farmacológicamente. Los resultados obtenidos indican que estas dos especies tienen un tamaño igual del ITS2 y una secuencia nucleotídica altamente parecida, ya que fue imposible detectar diferencias en el patrón electroforético del gel de agarosa. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las secuencias obtenidas no fueron del todo limpias, esto indica que algunos nucleótidos del ADN fueron detectados de forma errónea por el secuenciador. Dicha situación se presenta cuando el ADN enviado a secuenciar presenta pequeñas impurezas de sales, enzima, nucleótidos libres o primers., condición que pudo llevar a una identificación deficiente.

En el caso del marcador *psbA-trnH* las muestras de guarumbo no presentaron diferencia en cuanto al tamaño del fragmento de ADN amplificado, por lo que de alguna manera nos brinda la certeza de que se trata de la misma especie, confirmando lo obtenido con el marcador ITS2. Las muestras de wereque analizadas con el marcador *psbA-trnH* presentaron un tamaño idéntico del fragmento de ADN, lo que nos estaría indicando que todas las muestras pertenecen a una sola especie. Pero al no secuenciar los fragmentos de *psbA-trnH* provenientes del wereque, no pudimos confirmar el resultado obtenido con el

marcador ITS2, el cual nos indico que había diferencia entre la muestra W1 y el resto de las muestras (W2, W3 y W4).

## 9. CONCLUSIONES

1. El marcador ITS2 de barcoding permitió autenticar plantas de guarumbo a nivel de género y especie, mientras que en el wereque solo a nivel género.

2. Las muestras analizadas de guarumbo presentaron el mismo patrón electroforético con el marcador ITS2, algo similar ocurrió con el marcador *psbA-trnH*, por lo que podemos asegurar que son la misma planta. No obstante, los resultados con el wereque fueron contrastantes, todas las muestras presentaron patrones electroforéticos iguales para cada uno de los marcadores (ITS2 y *psbA-trnH*), sin embargo las secuencias nucleotídicas del marcador ITS2 nos mostraron que existe diferencia entre la muestra W1 y el resto de las muestras (W2, W3 y W4).

3.- No se encontraron secuencias de ITS2 para el guarumbo en las principales bases de datos de ADN y son pocas las secuencias reportadas del mismo marcador para el wereque, esta circunstancia limito de alguna manera la autenticación de las muestras analizadas.

4. El empleo de tres bases de datos de ADN (GenBank, ENA-EMBL y DDBJ) facilitó que la autenticación de las plantas medicinales tuviera una mayor robustez.

## **10. PERSPECTIVAS**

1. Ampliar el estudio de autenticación de wereque y guarumbo por ADN barcode con muestras de varias regiones del país.

2.- Actualmente son pocos los estudios realizados de ADN barcode de plantas medicinales en México. Es necesario continuar con estos, sobre todo en plantas medicinales de alto uso en México, ello permitirá a futuro realizar autenticaciones de forma eficiente y sencilla

3. La investigación relacionada con la autenticación o control de calidad de las plantas medicinales se debe seguir desarrollando, ya que a mayor información sobre las plantas medicinales, la sociedad se verá beneficiada a la hora de consumir algún producto herbolario para cierto padecimiento médico.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**Alarcón, A. F; Campos, S. A; Xolalpa, M. S; Hernández, G. E; Román, R. R.** 2002. Study of the hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonorae* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biology* 40: 570-575.

**Andrade, C; Heinrich, M.** 2005. "Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes". *Journal of Ethnopharmacology* 99(3), 325-348

**Arenas, M. L; Paulo, M. A.** 2001. Apuntes sobre cultura y promoción de la salud. *Boletín Mexicano de Historia y Filosofía de la Medicina*. Vol 4, No.1, 6-9.

**Azofeifa, D.Á.** 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 221-242.

**Bauer, K; Werner, S; Gros. L.** 1991. *Thin Layer Chromatography: An Introduction*. Germany: Hüthig Verlag. 1-66

**Becerra, V. V; Paredes, C. M.** 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, Vol. 60(3) [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttex\(18-03-2015\)](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttex(18-03-2015)) , 270-281

**Becerril, M. C.** 2001. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Puebla: Instituto de Estudios Superiores de Puebla, Homeopatía.1-6.

**Bennassar, V. M.** 2011. Estilos de vida y salud en estudiantes universitarios. La Universidad como entorno promotor de la salud. Instituto Universitario de investigación en ciencias de la salud: <http://www.academia.edu/6223906/> 24-03-2014.

**Beridze, T; Beck, J; Hsu, S. C; Gamkrelidze, M; Gogniashvili, M; Tabidze, V.** 2011. This Plastid DNA Sequence Diversity in a Worldwide set of Grapevine Cultivars (*Vitis vinifera L. subsp. vinifera*). *The georgian national academy of sciences*, vol. 5, no. 1, 98-103.

**Betancourt, Y; Gutierrez, M. Á.** 1999. El mercado de plantas medicinales en México, situación actual y perspectivas de desarrollo. Jardín Botánico Universitario, Secretaría de Investigación Científica, Universidad Autónoma de

Tlaxcala, Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromáticas S.C.L. Tlaxcala, Tlax. México. 2-5.

**Cortez, V.G; Macedo, J.P; Hernández, A. M; Arteaga, A. G; Espinosa, G. D; Rodríguez, L. J. F.** 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Rev. Biomed. 2004; 15 Facultad de Química Farmacéutica Biológica, 127-128.

**Costa, G.M; Schenkel, E.P; Reginatto, F.H.** 2011. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. 6(6):913-20.

**Chen, S; Yao, H; Han, J; Liu, C; Song, J; Shi, L.** 2010. Validation of the *its2* region as a novel dna barcode for identifying medicinal plant species. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613, 1-15.

**Domínguez, G. C.** 2012. Marcadores moleculares de ADN: análisis de la variabilidad, relaciones genéticas y mapeo en olivo (*Olea europaea L.*). Tesis doctorado. . Universidad de Córdoba, España. 10-12.

**Dorado, P. G.** 2005. Aislamiento y visualización de ácidos nucleicos. "Current Protocols in Molecular Biology" Departamento de Bioquímica y Biología Molecular" Córdoba, 1-11.

**Ernst, E.** 2002. Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review. Journal of Internal Medicine. 252, 107-113.

**Feria, R. I; López L. M; Serrano, H; Orozco, S; Lozoya, X.** 2007. Aplicación de la Biología Molecular en el Control de Calidad de los Fitomedicamentos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 38, núm. 1, 49-57.

**Forrest, I; Burg, K; Klumpp, R.** 1994. Biochemical markers in tree improvement programmes. Forestry-Abstracts 55(2) , 123-153.

**García de Alba, G. J. E; Ramírez, H. B. C; Robles, A. G; Zañudo, H.J; Salcedo, R. A. L; García de Alba, V. J. E.** 2012. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 29-30.

**Gernandt, D. S.** 2011-2012. Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Herbario Nacional de México. Colección etnobotánica. <http://www.ib.unam.mx/botanica/herbario/>

- Gutiérrez, J.P; Rivera, D. J; Shamah, L. T; Villalpando, H. S; Franco, A; Cuevas, N. L; Romero, M. M; Hernández, Á. M.** 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).
- Han, Ch. N; Whiting, D; Guariguata, L; Aschner, M. P; Forouhi, N; Hambleton I.** 2013. Atlas de la Diabetes de la FID sexta edición versión online del Atlas de la Diabetes de la FID: [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas) 30-34
- Hebert, P; Cywinska, A; Ball, S; de Waard, J.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Philosophical transactions of the royal society b: biological sciens.* 270.
- Hernandez, A.** 2011. Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su evaluación biológica in vitro e in vivo Tesis de Maestría, UPIBI-IPN, Bioprocesos.
- Hernández, A. M; Gutierrez, J. P; Reynoso, N. N.** 2013. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública Méx* ; Vol. 55, 129-136.
- Hollingsworth, P. M; Graham, S, W; Little D. P.** 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. Vol. 6, 1-13
- Jardón, D. A; Magos, G. G; Martínez, V. M.** 2014. Isolation of a new anti-inflammatory 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbitacin-type triterpene from *Ibervillea sonorae*. *Nat Prod Commun.* Jan, 9: 6-15.
- Ji, S. G; Huo, K. K; Wang, J; Pan, S. L.** 2008. A molecular phylogenetic study of *huperziaceae* based on chloroplast *rbcL* and *psbA-trnH* sequences. *Journal of Systematics and Evolution* 46, 213–219.
- Johnson, M; Zaretskaya, I; Raytselis, Y; Merezuk, Y; McGinnis, S; Madden, T.L.** 2008. NCBI BLAST: a better web interface. Vol. 36, 5-9
- Jouve, N.** (2008). *Explorando los genes: Del big-bang a la nueva Biología.* Madrid: Ediciones Encuentro Ensayos de Ciencia, 582-589.
- Juárez-Rosete C. R; Aguilar-Castillo J. A; Juárez-Rosete M. E; Bugarín-Montoya R; Juárez-López P. Cruz C. E.** 2013. Hierbas aromáticas y medicinales de México: tradición o innovación. *revista bio Ciencias* 2(3): 119-129

- Karp, A; Kresovich, S; Bhat, K; Ayad, W; Hodgkin, T.** 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)*. , 9-47.
- Katewa S.S; Chaudhry, B.L; Jain, A.** 2004. Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *J. of Ethnopharm.* 92: 41-46
- Kleppe, K; Ohtsuka, E; Kleppe R; Molineux, I; Khorana H.G.** 1971. "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." *J. Molec. Biol.* vol. 56, 341–61.
- Koh, H. L; Wang, H; Zhou, S; Chan, E; Woo, S. O.** 2006. Detection of aristolochic acid I, tetrandrine and fangchinoline in medicinal plants by high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40, 653-661.
- Kress, W. J; Wurdack, K. J; Zimmer, E. A; Weigt, L.A; Janzen, D. H.** 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369-8374
- Ligarreto, G.** 2003. Caracterización del germoplasma en análisis estadísticos de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Colombia. 77-84.
- Link, I.** 2009. Historia de la medicina herbolaria.1-20
- López, E.R; Hinojosa, A.** 1988. Catálogo de plantas medicinales Sonorenses. Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora, México, 143.
- Lozoya, X.** 1998. La herbolaria en México. 2-5
- Marín, S. N; Ordoñez, C. S.** 2008. Determinación de metabolitos Secundarios Volátiles y Semivolátiles, y Ácidos Aristolóquicos en *Aristolochia Ringens* Vahl. Bucaramanga Colombia. : Tesis. Universidad Industrial de Santander, 23-25
- Martínez, M. A; García, P. Y; Tobón C. J; Vélez, P. S; Álzate, G. F; Galeano, J. E.** 2004. Valores de referencia para el control de calidad de plantas medicinales como materia prima para fines terapéuticos en Colombia. *Vitae*, vol. 11, núm. 2, 2004, 43-49.
- McMurry, J.** 2012. Química Orgánica. México: Edición 7. Ed Brooks Cool. 408-
- Millet, O.** 2011. Elucidación estructural de proteínas en solución por RMN. *Revista QuímicaViva - Número 2*, 63-70

- Mora, A. C; Galeano, J. E; Osorio, D. E.** 2013. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia 1. Medellín: Universidad de antioquia, Facultad de química farmaceutica, 8-15
- Mullis, K. B.** 1990. "The Unusual Origins of the Polymerase Chain Reaction". *Scientific American*, vol. 262, 56–65.
- Mullis, K. B; Faloona, F. A.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335- 350.
- Muñetón, P. P.** 2009 "Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo". *Revista Digital Universitaria*. Vol.10, No.9.  
<<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>> [11-09-2014].
- Nevárez, R. A. J.** 2014. Evaluación de la actividad anti-tumoral y anti-inflamatoria de *Ibervillea sonora*. México: tesis. IPUBI\_IPN.
- Newmaster, G. S; Grguric, M; Shanmughanandhan, D; Ramalingam, S; Ragupathy, S.** 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine*, 11: 222  
<http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/222>
- Ochoa, P. A; González, B. Y; Viso, G. F.** 2006. Las reacciones adversas de las plantas medicinales y sus interacciones con medicamentos. *MEDISAN*: 10(4).  
[http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol10\\_4\\_06/san12406.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol10_4_06/san12406.htm).(10-09-2014).
- Oliveira, P. S., et al.** Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Quím. Nova* [online]. 2012, vol.35, n.9, pp. 1728-1732.
- OMS.** (1986). *Carta de Ottawa*. Canadá, 1-4.
- OMS.** 2014. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023.  
<http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/s21201es.pdf>
- Othaix, D. A.** 2012 . Utilización de isoenzimas como marcadores moleculares en el estudio de la variabilidad de frutos nativos. Universidad de la República Uruguay: Tesina. 11-15

- Padilla, P. C; Diez, D. J; Martínez G. E.; Bárcena, R. A; García, A. C.** 2014. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba Vol 1-4, 1-9.
- Phillips, M. W; Rodríguez, R. H; Fritz, P.** 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe Técnico 252 . CATIE. , 38-42
- Pomilio, A. B; Bernatené, E. A. Vitale, Arturo A.** 2011. Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray . Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 45, núm. 1. 47-79.
- Pourmohammad, A.** 2013. Application of molecular markers in medicinal plant studies. Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment. 5, 80-90.
- Rivera, F. R; Escalona, C. G; Garduño, S. L. Galaviz, H. C; Paniagua C. N.** 2011. Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 1-6
- Robles, Z. R; Velázquez, C. C; Garibay, E. A; Gálvez, R. J; Ruiz, B. E.** 2011. Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. J Med Food. Epub, 3-5
- Rubinson, K; Rubinson, J.** 2000. Análisis instrumental. Prentice Hall, 636, 704-705
- Saiki, R.K; Scharf, S; Faloona, F; Mullis, K.B; Horn, G. T; Erlich, H. A; Arnheim, N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230(4732):1350- 1354.
- San Miguel, H. A; San Miguel, R; Martín, G. F.** 2007. Espectrometría de Masas. Aplicaciones Clínicas. Importancia de las aplicaciones clínicas de la Proteómica. 11: 19-30
- Sang, T; Crawford, D; Stuessy, T.** 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). American Journal of Botany 84: 1120–1136.

- Sarwat M; Yamdagni, M. M.** 2014. DNA barcoding, microarrays and next generation sequencing: recent tools for genetic diversity estimation and authentication of medicinal plants. *Crit Rev Biotechnol.* 1-13
- Schlaepfer, L; Mendoza, E. J. A.** 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 41, núm.4, octubre-diciembre, 2010. 18-27
- Shaw, J; Lickey, E; Schilling, E; Small, R.** 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94, 275–288.
- Shukia R, Sharma S. B; Puri D, Prabhu K. M, Murthy P. S.** Medicinal plants for treatment of diabetes mellitus. *Indian J Clin Biochem.* 2000;15:169–77.
- Spooner, N. D.** 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: An example in wild potatoes. . *American Journal of Botany* 96, 1177–1189.
- Solis, R. L; Andrade, T. A.** 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? *Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana.* Vol. XVIII, Núm. 1, 41-46
- Sucher, N. J; Carles, M. C.** 2008. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Med* 74, 603–623.
- Sugiura, M.** 1992. The chloroplast genome. *Plant molecular biology* 19, 149–168.
- Tate, J, A; Simpson, B. B.** 2003. Paraphyly of *Tarasa* (*Malvaceae*) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723–737.
- Valadez, M, E; Kahl, G.** 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. México: Universidad Autónoma Chapingo. 102-113
- Vega, E; Espejo, A; Alarcón, A. F; Velasco, L. R.** 2009. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proc West Pharmacol Soc.* 52: 78-82.
- White, T. J; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Cap.38*, 315–322.

**Yadav, A; Ahmad, J; Anis, A; Chaudhary, A; Ahmad, A.** 2012. Development of Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Marker for the Authentication of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. European Journal of Medicinal Plants. 2(3): 186-198

**Yao, H; Song, J; liu, C; Luo, K; Han J; Li, Y.** 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. journal.pone.0013102, 1-15

### **Páginas de internet revisadas**

1. <https://www.google.com.mx/search?q=Plano+ubicación+del+mercado+merced++Sonora+del+D:F%3B&biw=102> (24-07-2015)
2. <http://mercadosonora.galeon.com/mapa.htm> (24-05-2015)
3. <http://myslide.es/documents/revista-conocimiento-89.html> (24-07-2015)
4. <http://www.ecosdelbosque.com/especie/cecropia-obtusifolia> (29-04-2015)
5. <http://quimica.laguia2000.com/general/analito>
6. [http://www.cromlab.es/COL\\_GC\\_ThermoFisher\\_GOLD.htm](http://www.cromlab.es/COL_GC_ThermoFisher_GOLD.htm) (20- 08-2015)
7. [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe-%20de%20agosto/leccin\\_10\\_analisis\\_de\\_espectros\\_de\\_la\\_regin\\_del\\_ir.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe-%20de%20agosto/leccin_10_analisis_de_espectros_de_la_regin_del_ir.html) (20- 08-2015)
8. <http://www.scielo.br/img/revistas/po/v18n1/10f1.gif> (14- Agosto-2015)
9. <http://lifetech.wiki.hci.edu.sg/DNA+Electrophoresis> (14-julio-2015)