

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

“Desarrollo de un método molecular para la detección e identificación de adulterantes vegetales a partir de productos herbolarios comerciales empleados para el tratamiento de la Diabetes Tipo 2”

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

PRESENTA:

FLORINDA CAMPOS SUÁREZ

Director del trabajo recepcional

Mtro. en B. Edgar del Carmen Sierra Palacios

México, D.F. septiembre de 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[©]

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.

México D.F., septiembre de 2015.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

A mis padres y hermanos que fueron el ejemplo a seguir para soñar y hacer mi sueño realidad.

A mis hijas Itzel Guadalupe Carmona Campos y Michel Denise Carmona Campos quienes con amor, siempre creyeron en mí y nunca dejaron de apoyarme.

A mi esposo Manuel Carmona Salazar por su apoyo incondicional.

A mis amigos y amigas que han estado en las diferentes etapas de este proceso brindándome amistad y cariño y con quienes he vivido grandes aventuras que nunca olvidaré. En especial a mis queridas amigas María del Carmen Franco González y Sandra Edith Luvian Hernández quienes me han acompañado y apoyado incondicionalmente, de inicio a fin en mi paso por la universidad, por sus enseñanzas, por las actividades y compromisos iniciados juntas.

A todas las personas que de alguna manera u otra han contribuido a mi desarrollo personal.

AGRADECIMIENTOS

Mi más grato agradecimiento a mi *Alma Mater*, La Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), por permitirme terminar la licenciatura de Promoción de la Salud.

Con profundo cariño y respeto mi agradecimiento al director de mi trabajo recepcional M. en B. Edgar Sierra Palacios por ser la base en mi inclusión en este camino, por transmitirme su entusiasmo, su conocimiento y entrega en la investigación realizada, por el respeto y compromiso que tomo en cada actividad que realizamos, por la oportunidad, el apoyo y la confianza brindadas durante este tiempo. Gracias por su disposición, sus consejos, sugerencias y apoyo en esta trayectoria. Gracias por ayudarme a lograr y concluir el ciclo académico que iniciamos.

Agradezco a la M. en C. Érica Carlota Merino González por las enseñanzas académicas y quien tiene todo mi respeto y admiración.

Al comité de lectores de este trabajo:

1. DR. JOSÉ ALBERTO MENDOZA ESPINOZA
2. DRA. PATRICIA BUSTAMENTE CAMILO
3. DR. JAIME MARCIAL QUINO
4. M. C. EDUARDO FLORES SOTO

Así como por el apoyo y las enseñanzas de mis maestros y tutores.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM-2)	2
2.1.1 Aspectos generales de la Diabetes Mellitus tipo 2	2
2.2 Plantas medicinales	5
2.2.1 Generalidades	5
2.2.2 Historia del uso de las plantas medicinales en México	6
2.2.3 Empleo de las plantas medicinales en México	10
2.2.4 Plantas medicinales para la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2)	10
2.2.5 Productos herbolarios comerciales utilizados para la DM-2 en México	13
2.3 Adulterantes vegetales en productos herbolarios	15
2.4 Técnicas de Identificación de adulterantes Vegetales	18
2.4.1 Marcadores taxonómicos o morfológicos	19
2.4.2 Marcadores químicos	19
2.4.2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	20
2.4.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)	20
2.4.2.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CLAR-MS)	20
2.4.3 Marcadores bioquímicos	21
2.4.3.1 Isoenzimas	21
2.4.4 Marcadores genéticos de ADN	22
2.4.4.1 RFLP	24
2.4.4.2 AFLP	25
2.4.4.3 RAPD	25
2.4.4.4 SSR o Microsatélites	26
2.4.4.5 SNP	26

2.4.4.6 SCAR	27
2.5 El marcador de ADN <i>rbcL</i>	27
2.6 Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. OBJETIVOS	32
Objetivo General	32
Objetivos particulares	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Adquisición de material biológico	32
6.2 Extracción de ADN	33
6.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	34
6.4 Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR)	35
6.5 Electroforesis de ADN en Geles de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	37
6.6 Identificación molecular de las plantas medicinales	42
7. RESULTADOS	43
7.1 Materiales biológicos analizados	43
7.2 Extracción de ADN a partir de capsulas de productos herbolarios comerciales empleados para el tratamiento de la DM-2	44
7.3 Diseño de primers para la amplificación por PCR del gen <i>rbcL</i>	45
7.4 Amplificación de un fragmento del gen <i>rbcL</i> por PCR	48
7.5 Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	49
7.6 Secuenciación del ADN proveniente de las bandas cortadas	52
7.7 Identificación molecular de las plantas medicinales presentes en los productos herbolarios estudiados	54
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
9. DISCUSIÓN	57
10. CONCLUSIONES	58
11. PERSPECTIVAS	58
12 RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA PROMOCIÓN DE LA SALUD	59
13. BIBLIOGRAFÍA	61

14. ANEXOS	68
14.1 ANEXO 1. Reactivos y equipo	68
14.2 ANEXO 2. Soluciones	69

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de algunos marcadores moleculares de ADN	24
Figura 2. Principio de la Técnica de DGGE	29
Figura 3. Preparación de un gel de agarosa	35
Figura 4. Equipo DCode Universal Mutation Detection System de BioRad	37
Figura 5. Gel de agarosa con ADN genómico	45
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias parciales de la del gen <i>rbcl</i> de diferentes especies de plantas medicinales	47
Figura 7. Productos de PCR en gel de agarosa	49
Figura 8. Separación de productos de PCR en gel de acrilamida- bisacrilamida (gel DGGE)	50
Figura 9: Gel de DGGE con las bandas cortadas	52

ÌNDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Plantas hipoglucemiantes depositados en el Herbario del IMSS	11
Tabla No. 2 Formulas herbolarias desarrolladas en la UACH para el tratamiento de la diabetes	14
Tabla No. 3 Suplementos alimenticios para la diabetes tipo 2	15
Tabla No. 4 Algunos tipos de adulteraciones en plantas medicinales	17
Tabla No.5 Concentración de agarosa empleada en los geles para la separación de fragmentos de ADN	34

Tabla No. 6	Reacción de PCR para la amplificación del gen <i>rbcL</i>	36
Tabla No. 7	Programa del termociclador, empleado para la amplificación del fragmento del gen <i>rbcL</i>	37
Tabla No. 8	Reactivos y cantidades empleados en la elaboración del gel para DGGE	39
Tabla No.9	Lista de plantas medicinales que contienen los productos herbolarios comerciales empleados en el presente estudio	43
Tabla No. 10	Optimización de concentraciones de ADN en el PCR del gen <i>rbcL</i>	48
Tabla No. 11	Bandas seleccionadas que fueron cortadas del gel de DGGE	51
Tabla No. 12	Secuencias obtenidas de cada una de las bandas cortadas del Gel de DGGE	53
Tabla No.13	Porcentajes de similitud de las secuencias obtenidas de las bandas seleccionadas del DGGE y su valor E	55

ABREVIATURAS

DM: Diabetes Mellitus

DM 2: Diabetes Mellitus tipo 2

IDF: International Diabetes Federation

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

OMS: Organización Mundial de la Salud

IMEPLAM: Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales

UMR: Unidades Médicas Rurales

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

RNA: Ácido Ribonucleico

FDA: Food and Drug Administration

HPCL: Cromatografía de líquidos de alta resolución

HPCL-MS: Cromatografía líquida unida a espectrometría de masas

PCR: Reacción en cadena de la ADN polimerasa

ppm: Partes por millón

RFLPs: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

AFLPs: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

RAPDs: Polimorfismo de productos amplificados al azar

SSRs: Secuencias simples repetidas

STR: Repeticiones cortas en tándem

SSLPs: Polimorfismos de longitud de secuencia simple

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

NGS: Secuenciación de nueva generación

SCARS: Regiones amplificadas de secuencias caracterizadas y secuenciadas

DGGE: Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante

g: Gramos

µl: Microlitros

ml: Mililitros

lt: Litros

p/v: Peso/volumen

TAE: Tris base, acético glacial y EDTA

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

PSA: Persulfato de amonio

v/v: Volumen/volumen

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ETA-EMBL: European Nucleotide Archive- European Molecular Biology
Laboratory

DDJB: DNA Data Bank of Japan

rbcL: Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa

PH: Producto herbolario

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se puede conceptualizar como la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias indígenas de distintas culturas (sean o no explicables), que se utilizan en la conservación de la salud; así como en la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. Dentro de la medicina tradicional en México el uso de las plantas medicinales son de los elementos más empleados (Estrada, 1984; OMS, 2002). En los últimos años el empleo de las plantas medicinales se ha incrementado notablemente debido a la búsqueda de tratamientos naturales y por el bajo costo que éstas representan en comparación con otro tipo de tratamientos. Además considerando que el aumento de la población mundial es de forma sostenida, situación que hace cada vez más difícil la atención de los pacientes por parte de los sistemas de salud y el aumento de las enfermedades crónico degenerativas a pasos agigantados, lo que llevará en algunos años al colapso de los sistemas de salud. Por lo que la forma de uso y el control de calidad en cuanto a seguridad y eficiencia de las plantas medicinales, se están convirtiendo en temas de relevancia para las autoridades sanitarias, así como para los usuarios de las terapias herbolarias.

Se considera que la seguridad y la eficacia de las plantas medicinales han sido demostradas a través del uso histórico; es decir, a través de la experiencia transmitida de generación en generación. No obstante, se reconoce que es necesaria la investigación científica para proporcionar evidencias adicionales de su seguridad y eficacia. Sin embargo, falta desarrollar normas estandarizadas y métodos apropiados para su evaluación a nivel internacional. Por lo que nunca estará de más la generación de conocimiento en cuanto a seguridad y eficacia de las plantas medicinales, lo que conlleva a que esta práctica se realice de forma correcta y con un bajo riesgo (OMS, 2005; Lucio, 2012).

Actualmente existe una tendencia en varias regiones del mundo de emplear las plantas medicinales para tratar padecimientos con alta prevalencia en la población. Una de esas enfermedades es la diabetes mellitus tipo 2, la cual es una enfermedad que ha cobrado relevancia mundial en las últimas décadas, ya

que afecta a 366 millones de personas y representa un costo anual de 465 millones de dólares. México es un país con serios problemas de diabetes, existen 6.4 millones de mexicanos adultos diagnosticados con diabetes y el problema está incrementando de forma alarmante año con año (Artola, 2012; ENSANUT, 2014). Por lo que una forma de tratar este padecimiento por parte de la población es a través del consumo de productos herbolarios, primero por la fuerte herencia en el uso de las plantas medicinales, segundo debido al mito de que no provocan efectos secundarios y por último por su fácil acceso (libre venta y bajo costo) (Babu y col; 2006). En el presente trabajo se buscó desarrollar un método que emplea el ADN para identificar las plantas medicinales usadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, cuando estas se encuentra formando parte de productos herbolarios. Dicho método permite detectar e identificar adulterantes vegetales en dichos productos.

2. Revisión de literatura

2.1 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM-2)

2.1.1 Aspectos generales de la Diabetes Mellitus tipo 2

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico de múltiples etiologías sistémicas degenerativas caracterizadas por la elevación crónica de la concentración de glucosa en la sangre (hiperglucemia), como consecuencia de una producción insuficiente de insulina. Los síntomas característicos de la enfermedad son: Poliuria (producción excesiva de orina), Polidipsia (aumento anormal de la sed), Polifagia (aumento anormal de hambre) y fatiga; esta última debida a la resistencia que las células van presentando a la insulina, lo que hace que la glucosa se acumule fuera de la membrana celular y no dentro, en donde es necesaria para satisfacer las necesidades inmediatas de energía, provocando así cansancio (American Diabetes Association, 1997).

La DM se clasifica en dos tipos principalmente, la tipo I o insulino-dependiente que se caracteriza por niveles bajos de insulina debido a que el sistema inmunitario de la persona destruye las células β pancreáticas, haciendo que el enfermo requiera inyecciones de insulina periódicamente para no morir. Este tipo de diabetes es común entre las personas más jóvenes menores a 30 años; puede traer consigo serias complicaciones si no es adecuada y oportunamente

atendida. El segundo tipo de diabetes es la no insulino-dependiente o DM-2, la cual se caracteriza por ser común entre personas obesas mayores de 35 años. Existen otros tipos de DM pero suelen ser menos comunes, tal es el caso de la diabetes gestacional, la cual se debe a la intolerancia a la glucosa manifestada en el tercer trimestre del embarazo y que es ocasionada por la resistencia a la insulina que ocurre en condiciones normales del embarazo (Rodríguez, 2012).

La DM afecta a más de 366 millones de personas en el mundo. En el 2012, los costos sanitarios globales debidos a la DM se calcularon en 465,000 millones de dólares (11% del gasto sanitario), la prevalencia mundial estimada por la Internacional Diabetes Federation (IDF) es de 8.3%, siendo la diabetes tipo 2 (DM 2) la que representa el 90% de los casos. Pero el mayor problema lo constituye el ritmo de crecimiento: Las previsiones para las próximas décadas debido al incremento mundial de la obesidad, y la vida sedentaria, llevan a estimar cálculos de proporciones pandémicas de DM-2 (Artola, 2012).

Por regiones, la más afectada según estas previsiones será el sureste asiático con 122 millones de pacientes diabéticos, el área del Pacífico con 71 millones de afectados y el continente americano donde se espera que la enfermedad llegue a afectar 67 millones de personas. Mientras, se calcula que en África rondará los 18 millones de personas, más del doble de los 7 millones actuales y que en Europa aumentará la prevalencia actual cifrada en 33 millones en el año 2000, hasta alcanzar los 48 millones de pacientes. Actualmente la diabetes mellitus tipo 2 se distribuye por todo el mundo aunque tiene mayor peso en los países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo (Aschner, 2012).

En México los datos de Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2014 identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos con DM-2, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. De las mayores prevalencias del padecimiento están en siete entidades federativas: Distrito Federal 12.3%, Nuevo León 11.4, Veracruz 10.6%. Estado de México 10.5%, Tamaulipas 10.3%, Durango 10.2% y San Luis Potosí 10% las cuales rebasan el promedio nacional de 9.1%. En tanto, los estados con menos casos son Chiapas con 5.6%, Quintana Roo 6.2%, Chihuahua 6.3%, Aguascalientes 7% y Oaxaca 7%. En el resto del país se ubican rangos de entre 7.4 y 9.9 % de frecuencia de DM (ENSANUT, 2014).

En la actualidad, las instituciones de salud enfrentan el reto de incidir en el alto costo que representa la creciente demanda de atención a la diabetes, y lograr la disminución del impacto de este padecimiento en las vidas de las personas. Se buscan y ensayan diversas estrategias médicas, mediante una combinación de la dieta, educación, ejercicio físico, etc. No obstante, la investigación está orientada principalmente en la obtención de nuevas drogas hipoglucemiantes que puedan ayudar al control de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro país y en otros países con un nivel socioeconómico semejante, un sector amplio de la población no tiene acceso a estos modernos esquemas, por las limitaciones económicas y culturales, surgiendo entonces la medicina natural como una alternativa de igual efectividad, pero con menores efectos secundarios típicos de los fármacos sintéticos y con la ventaja de ser más económica (Esquivel y col., 2012).

La principal estrategia desarrollada para lograr la integración de la medicina tradicional a los tratamientos para la DM-2 ha sido la investigación con plantas medicinales para comprobar de manera científica su eficacia. Además de su difusión entre las culturas, capacitación de recursos humanos especialistas en medicina tradicional. En países como china, India y Tailandia se han conseguido avances significativos en la articulación de modelos integrales de salud. Mientras que en algunos países de América Latina como México, Nicaragua y Brasil se tienen experiencia con avances hacia la integración de las medicinas tradicionales en la medicina moderna (OMS, 2002).

Actualmente los remedios tradicionales han sido de suma importancia para controlar la DM-2. En México la población recurre a otras alternativas terapéuticas principalmente aquellas basadas en el uso de plantas medicinales, debido a la gran aceptación cultural que tienen, su fácil acceso y bajo costo. A nivel mundial se han reportado más de 400 productos que se comercializan para el tratamiento de la diabetes (Esquivel y col., 2012)

2.2 Plantas medicinales

2.2.1 Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS), definió en un congreso realizado en China en 1980 a la “planta medicinal” como *“todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos”* (Ayón, 2007).

El uso de plantas medicinales ha estado presente a lo largo de la evolución del ser humano. Tiene una historia honorable, ya que en determinados momentos todos los medicamentos se obtenían de fuentes naturales, dando lugar al establecimiento de una relación cercana y productiva entre el hombre y su medio vegetal (Carballo y col., 2005).

Así como cada zona geográfica del mundo tiene una vegetación autóctona con la que se obtienen diferentes plantas medicinales, muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por los conocimientos del nuevo mundo (Ayón, 2007).

Las plantas medicinales desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la salud de la mayor parte de la población mundial. Existen 30 mil especies vegetales a nivel mundial, de las cuales se estima que el 10 por ciento tienen propiedades medicinales comprobadas, sin embargo, se reconoce que aproximadamente 10,000 especies vegetales se utilizan con dicho propósito sobre todo en los sistemas de medicina tradicional. Más del 80% de la población mundial usa preparaciones botánicas como medicinas. China destaca con el uso de 9 mil 905 plantas medicinales, mientras que en México sólo se utilizan cerca de 500, consideradas las más comunes (Jiménez, 2010). En los últimos años, el uso de remedios herbolarios en los países industrializados ha experimentado un crecimiento sin precedente (Salazar y col., 2004; Verde, 2009).

Las plantas con atributos medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre. Al desarrollarse la escritura y con la aparición del papiro se comenzaron a recoger información sobre el uso de éstas. En la Biblia se describen aproximadamente 200 plantas de uso medicinal, junto a sus aplicaciones (Petrovska, 2015).

Durante los siglos XII al XIII la escuela Árabe célebre por sus renombrados médicos que prescribían recetas con hierbas de las cuales algunas de ellas son utilizadas en la actualidad. En el siglo XVI en Barcelona se publicó “Concordia Pharmacopolarum” que es la primera farmacopea territorial del mundo (Marinoff, 2006).

Los primeros herbolarios datan de la época de los asirios, los babilonios y los fenicios y constituyen una recopilación de los conocimientos de la época sobre las propiedades curativas de las plantas, comenzando la historia de la fitoterapia. Desde el año 3,000 a. C. hasta nuestros días, hay numerosas referencias y escritos como el famoso papiro egipcio de Ebers (1,552 a. C.) que contiene muchas preparaciones medicamentosas a base de vegetales. Teniendo en cuenta las plantas medicinales, podemos decir que existen cuatro tipos generales de medicina. Ellas son la asiática, europea, indígena y neo-occidental. Tanto la asiática como la europea datan de hace 1,500 años, se encuentran en la farmacopea y son por lo tanto más conocidas; en el caso de la indígena es distinto, ya que es transmitida oralmente. En Asia las herboristerías más sistematizadas son las de India, China y Japón. Estas siguen aún las ideas de diagnóstico y tratamiento utilizadas por milenios (Carballo y col., 2005).

Al inicio de los setenta del siglo XX, la OMS empezó a prestar atención a los éxitos alcanzados por China en la solución de la atención primaria en salud con el uso de sus recursos vegetales y con sus numerosas tradiciones ancestrales. Desde entonces, y con el aval de la OMS, la investigación de los remedios tradicionales de muchas culturas cobró nuevo interés para los investigadores en todo el mundo, quienes centraron sus primeros esfuerzos en países de gran biodiversidad y riqueza cultural (OMS, 2000).

2.2.2 Historia del uso de las plantas medicinales en México

El origen de la herbolaria en el continente Americano está directamente relacionado con la llegada del hombre a este territorio, quienes ingresaron por el estrecho de Bering hace unos 70,000 años, de este lugar se internó a otros lugares del continente llegando a la Patagonia de América del Sur hace unos 10,000 años a. C. y en el valle de México se han encontrado granos de polen

fósil de maíz domesticado cuya antigüedad fluctúa entre 60,000 y 80,000 años (Carlson y col., 2003).

Cuando los españoles llegaron al nuevo mundo se sorprendieron de las habilidades de los curanderos aztecas y del gran acervo de las plantas medicinales que utilizaban, al grado de que el conquistador Hernán Cortés, en una de sus cartas informativas para el rey de España, comentó que los curanderos indígenas eran superiores a los europeos. Sin embargo, la conquista del nuevo mundo propició que las prácticas curativas y el uso de la herbolaria se fuera desvirtuado gradualmente y perdiendo a través de las generaciones, solo algunos grupos indígenas continuaron dependiendo de los curanderos tradicionales y de la inmensa variedad de plantas medicinales que ofrece la flora de las Américas. Mucha de la herencia herbolaria de los indígenas está documentada en el denominado Códice Badiano, también conocido como el libro de las hierbas medicinales de los indios. El libro fue escrito en Náhuatl por el Xochimilca Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano (Serna y col., 2009).

En la época prehispánica náhuatl los jardines eran muy importantes puesto que merecían un auténtico reconocimiento del valor que tenían las plantas, además de un gran respeto hacia la naturaleza. La gran biodiversidad con que se contaba desde entonces, servía también en la representatividad de sus adornos, los cuales eran utilizados en sus vestidos, como símbolos de lugares, cosas, así como en sus metáforas poéticas. Asimismo, durante el reinado de Moctezuma Ulhuicamina (1440-1469) quinto Huey tlatoani, se crea el jardín botánico de Huaxtepetl. Este jardín fue el único que se conservó después de la conquista y suministró por mucho tiempo plantas medicinales para el Hospital de Huaxtepetl, el cual funcionó hasta mediados del siglo XVII. Desde la antigüedad, son célebres también los jardines reales de Chapultepec, Texcoco y las huertas de los señores de Huaxtepetl: El señor de Iztapalapa también tenía grandes jardines de gran hermosura que asombró a los invasores españoles (SEDEREC, 2012).

El uso de plantas con fines medicinales entre los mayas data de tiempos prehispánicos, aunque, a raíz de la conquista Española, la transmisión de conocimientos relacionados con el empleo de hierbas con la finalidad de

devolver la salud a los enfermos se vio relegada e incluso condenada, por considerarla cosa del demonio y que, por ende, había de erradicarse para lograr la conversión de la utilidad de ciertas hierbas, plantas, raíces, flores o frutos para sanar dolencias comunes padecidas por conquistados y conquistadores españoles –como el franciscano Diego de Landa en su *Relación de las cosas de Yucatán*- consignaron por escrito algunas de estas prácticas curativas. A su vez, traducciones de códices escritos en maya al castellano –y que lograron preservarse, como el Códice de Madrid y el de Dresde- fueron realizadas por indígenas mayas (Rodríguez, 2012).

El conocimiento sobre las plantas medicinales se acumuló gradualmente, a través de los siglos, constituyendo la base para el desarrollo de la civilización del México antiguo. En el siglo XVII la producción bibliográfica de plantas medicinales fue importante, ya que se escribieron algunos libros importantes para conocer la ciencia herbolaria de nuestros antepasados. Uno de los libros famosos es el escrito por Fray Juan de Torquemada en 1615, *Monarquía Indiana*, donde escribe no sólo de medicina sino historia, religión, tradiciones, costumbres y conocimientos de la época en las más diversas áreas, menciona los jardines que existían, los cuales constituyen una de las evidencias más palpables del conocimiento botánico de nuestros antepasados. Con respecto a otras publicaciones especializadas en medicina y herbolaria, hay varios textos que han trascendido a través de los años y que, ahora, son fuentes importantísimas para conocer la evolución de la medicina en México, así como para el estudio moderno de los conocimientos vertidos en estas obras. Una de las obras más importantes es el *Tesoro de Medicina* de Gregorio López escrita entre los años 1672 y 1674, donde presenta recetas para las enfermedades más diversas (Aguilar, 2002).

Hasta mediados del siglo XVIII las dos culturas médicas depositaban todo el peso de su terapéutica en las mismas plantas medicinales. Para los médicos, el estafiate o “ajenjo de la tierra” movilizaba la pituitaria (flema), ablandaba el estómago y curaba las cámaras (diarrea); para los curanderos, la misma planta pero con el nombre de iztahuyatl servía para curar el “susto”, se decía beber después de “ramearlo” se quitaba el calor del cuerpo si se tomaba como “agua de tiempo”. A finales del siglo XVIII la medicina en la Nueva España estaba

integrada por un 25% de plantas autóctonas y un 75% de vegetales traídos por la cultura española (Carlón y col., 2003).

Los científicos mexicanos se unieron en una asociación que representó un refugio para las ciencias de fines del siglo XIX, así se funda la Sociedad Mexicana de Historia Natural, integrada por prestigiosos científicos. En esta institución se realizaron trabajos sobre la flora mexicana que incluyeron la recolección y clasificación sobre las propiedades farmacológicas de las plantas mexicanas más importantes. En los últimos decenios del siglo XIX se escribieron trabajos sobre el tema entre los que destacan: Sinonimia vulgar y científica de las plantas de México, del Dr. Alfonso Herrera; Lecciones de farmacología del doctor Leonardo Oliva; repertorio de plantas medicinales mexicanas y materia medica nacional, del doctor Fernando Altamirano, y varios más, en los que se intentó establecer las bases para el desarrollo de una industria farmacéutica nacional y a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, la química y la farmacología influían de manera importante en el estudio de las plantas medicinales (Aguilar, 2002).

Los avances significativos que se observan en el estudio de la herbolaria, en el siglo XX, se dan a partir de los años setentas, primeramente con la fundación en 1975 del Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, más conocido por sus siglas IMEPLAM. El objetivo principal de este instituto fue llevar a cabo el estudio científico de la medicina tradicional indígena y propiciar el aprovechamiento de los recursos naturales, sobre todo de las plantas, para la producción de fármacos nacionales. Con la creación del IMEPLAM se reactivó la investigación sobre plantas medicinales en México. A principios del siglo XX, el Instituto inicia un herbario medicinal, actualmente conocido como Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (1981-1985), que está ubicado en el Centro médico Nacional siglo XXI. Su acervo abarca más de 120,000 especímenes, y en él se establecieron las bases para la investigación farmacológica y química de las plantas útiles, son una fuente de información que daría paso a la creación de fitofármacos, es decir, de productos hechos a partir de plantas medicinales, nuevo concepto en el desarrollo y uso de medicamentos a partir de plantas (Aguilar y col., 2009).

2.2.3 Empleo de las plantas medicinales en México

En México se estima que aproximadamente 60% de los habitantes, utilizan plantas medicinales para tratar diversos padecimientos (González-Stuart, 2010). En los años ochenta el IMSS logro coleccionar 4 mil 400 vegetales empleados por la terapéutica tradicional y sintetizó la información sobre su uso, la posología y el tratamiento de los padecimientos para los cuales se utiliza cada una. Posteriores estudios estadísticos sobre la distribución de tales recursos permitieron establecer cuadros básicos de plantas medicinales de mayor demanda, así como los padecimientos tratados con mayor frecuencia con ellas. Se incluyó entonces que en el país se emplea 220 plantas para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales; 141 para afecciones dermatológicas y traumatismos, 115 para males del aparato genitourinario y biología de la reproducción, 81 para el aparato respiratorio; 54 para trastornos del sistema nervioso y cardiovasculares, más de 42 de uso ritual o mágico. En total, 653 variedades botánicas de amplia difusión en el territorio nacional (Aguilar, 2002)

Los datos más recientes indican que se tienen unas 5,000 plantas medicinales depositadas en el Herbario IMSS, procedentes de diversos estados del país. Uno de los logros más importantes, durante este siglo XX, para validar la medicina tradicional y ponerla al servicio de las poblaciones rurales marginadas fue la creación de la Unidades Médicas Rurales (UMR), dependiendo del programa IMSS-COPLAMAR, donde, mediante la participación conjunta de médicos universitarios y médicos tradicionales, se logró un combate efectivo de las enfermedades orgánicas (diabetes, cáncer, hipertensión, etc.) y síndromes de filiación cultural (espanto, mal de ojo, empacho, etc.) (Aguilar y col., 2009; Figueroa, 2009).

2.2.4 Plantas medicinales para la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2)

Ante el aumento del padecimiento de la DM-2 y los altos costos de los tratamientos médicos, las personas han optado por emplear un número cada vez creciente de plantas para poder controlar los niveles de glucosa en sangre. Por lo que algunos investigadores se han dado a la tarea de recopilar toda aquella información con el uso de plantas medicinales para el tratamiento de la

diabetes. Una de las instituciones que se ha visto más involucrada en la en la recopilación de esta información etnobotánica es el herbario del IMSS. A la fecha tienen registradas más de 300 especies vegetales de unas 70 familias diferentes, que según información recabada son usadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes (Juárez, 2006) (tabla 1).

Tabla No.1 Plantas hipoglucemiantes depositadas en el Herbario del IMSS.

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Maguey	<i>Agave salmiana</i> Otto	Parte aérea
Cuajilote	<i>Anacardium occidentale</i> L	Raíz
Mango Marañón	<i>Mangifera indica</i> L.	Hojas, corteza
Zanahoria	<i>Daucus carota</i> L.	Raíz
Flor de mayo, Teresita o veneno de perro	<i>Plumeria rebra</i> L., <i>Catharanthus</i> L. y <i>Rauwolfia tetraphyla</i> L.	Flor, hoja y raíz
Coyol	<i>Acrocomia Mexicana</i>	Raíz
Guaco	<i>Aristolochia asclepiadifolia</i> Brandg	Tallo
Acahualillo, Aceitilla	<i>Bidens Aurea</i>	Hojas, parte aérea
Ajenjo	<i>Artemisia absinthium</i>	Hojas
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i> L.	Hojas, flores
Arnica	<i>Zexmenia gnaphaloides</i>	Parte aérea
Capitaneja	<i>Verbesina crocata</i>	Hojas
Cardosanto	<i>Cirsium mexicanum</i> DC.	Raíz
Chintuza	<i>Guardiola angustifolia</i>	Hojas
Diente de elefante	<i>Selloa planteginea</i> HBK	Hojas
Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i> W.	Raíz
Estafiate	<i>Artemisia ludovisiana</i>	Parte aérea
Hierba amarga	<i>Pethenium hysterophorus</i>	Raíz
Huixim	<i>Verbesina persicifolia</i> DC	Hojas
Hierba dulce	<i>Eupatorium conyzoides</i>	Parte aérea
Limpia Tuna	<i>Zaluzania augusta</i>	Raíz
Matarique	<i>Psacalium sinuatum</i>	Raíz
Prodigiosa	<i>Brickellia cavanillesii</i> DC.	Tallo, hojas y flores
Simonillo	<i>Conyza filaginoides</i>	Tallo, hojas y flores
Té de Burro	<i>Hidalgoa ternata</i>	Tallo, hojas
Xapulli	<i>Haplopappus venetus</i>	Toda la planta
Zeta	<i>Bidens pilosa</i> L.	Tallo, hojas
Mano de león	<i>Begonia heracleifolia</i> Ch.	Tallo
Palo muerto	<i>Berberis moranensis</i> H.	Tronco, rama.
Cuajilote, Chote	<i>Parmentiera aculeata</i>	Raíz
Tronadora	<i>Tecoma stans</i>	Rama, raíz

Continuación

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Apombo, Zapote reventador, Pochote	<i>Pachira aquatica</i> Aubl.	Corteza
Cuelayo	<i>Cordia eleagnoides</i> DC.	Flor
Lágrimas de San Pedro	<i>Tournefortia hirsutissima</i>	Tallo
Lentejilla	<i>Lepidium virginicum</i> L.	Rama
Berro	<i>Roripa nasturtium</i>	Rama
Heno	<i>Tillandsia usneoides</i> L.	Toda la planta
Palo mulato	<i>Bersera simaruba</i>	Corteza
Choya	<i>Opuntia fuligida</i>	Tallo
Duraznillo	<i>Opuntia leucotricha</i> DC.	Tallo
Garambullo	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Tallo
Junco	<i>Aporocactus flagelliformis</i>	Tallo
Niguilla	<i>Rhipsalis baccifera</i>	Toda la planta
Nopal, nopal blanco, nopal corriente, nopal de coyote	<i>Nopalea indica</i> , <i>opuntia atropes</i> , <i>opuntia tomentosa</i> , <i>opuntia megacantha</i>	Tallo,
Nopalli	<i>Nopalea cochenillifera</i>	Cladiodo
Xoconoxtle	<i>Opuntia imbricata</i>	Fruto
Papaya	<i>Carica papaya</i> L.	Hoja
Chancarro	<i>Cecropia peltata</i> L.	Hojas
Guarumbo	<i>Cecropia obtusifolia bertol</i>	Hojas
Hierba de puerco	<i>Chenopodium glaucum</i> L.	Toda la planta
Castaño	<i>Terminalia catappa</i> L.	Fruto
Siempreviva	<i>Sedum praealtum</i> DC.	Hojas
Chilacayote	<i>Cucúrbita ficifolia bouchè</i>	Fruto
Cundamor.	<i>Momordica charantia</i> L.	Hojas
Pepino	<i>Cucumis sativus</i> L.	Fruto
Pisto	<i>Apodanthera buraeavii</i>	Fruto
Sandía chiquita	<i>Melothria pendula</i> L.	Fruto
Wereque	<i>Ibervillea sonora</i> greene	Raíz
Árbol de la vida	<i>Cyathea fulva</i> fee	Raíz
Picón	<i>Saurauia pringlei</i> ruse	Hojas
Zapote negro	<i>Diospyros dygina jacq</i>	Fruto
Cola de caballo	<i>Equisetum hyemale</i> L.	Toda la planta
Chaya	<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Hojas
Hierba de la golondrina	<i>Euphorbia postrata</i> ait.	Hojas
Sangre de grado	<i>Crotón draco schldl.</i>	Hojas
Caña fistula	<i>Cassia fistula</i> L.	Fruto
Fenogreco	<i>Trigonella foenugraecum</i>	Fruto
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cáscara del fruto

Continuación

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Frijolillo	<i>Senna occidentalis</i>	Hojas
Guamúchil	<i>Pithecellobium dulce</i>	Corteza
Guayacán	<i>Lonchocarpus cruentus L.</i>	Hojas
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i>	Hojas
Mezquite	<i>Prosopis juliflora</i>	Fruto
Palo dulce	<i>Eysenhardtia polistachya</i>	Tallo
Pata de vaca	<i>Bauhinia divaricata L.</i>	Hojas
Retama	<i>Crotalaria acapulcensis</i>	Ramas
Nogal	<i>Juglans regia L.</i>	Hojas
Cuachalalate	<i>Ampypterygium</i>	Corteza
Agrimonia	<i>Teucrium cubense Jacq.</i>	Hojas, tallos
Marrubio	<i>Marrubium vulgare L.</i>	Tallos, hojas, raíz
Mastranzo	<i>Mentha suaveolens J. F.</i>	Hojas
Sàbila	<i>Aloe vera L.</i>	Hoja
Tepozán	<i>Buddleia americana L.</i>	Raíz, tallo y hojas
Injerto	<i>Phoradendronspp</i>	Hojas
Cadillo	<i>Pavonia schiedeana</i>	Tallo
Malvavisco	<i>Malvastrum coromandelianum</i>	Hojas
Guaco	<i>Cissampelos pareira L.</i>	Raíz, flor
Catarinilla	<i>Salpianthus</i>	Hojas
Chicalote	<i>Argemone ochroleuca</i>	Raíz
Cuasia	<i>Quassia amara L.</i>	Corteza
Guácima	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Fruto
Ortiga	<i>Ortica diotica L.</i>	Hojas
Valeriana	<i>Valeriana edulis ssp.</i>	Raíz

Fuente: Aguilar y Xolalpa, 2009.

Las plantas medicinales o sus extractos pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y la condición integral de los diabéticos, no sólo por sus efectos hipoglucemiantes sino también al mejorar el perfil lipídico; el estado antioxidante y la función capilar (Esquivel y col., 2012).

2.3 Productos herbolarios comerciales utilizados para la DM-2 en México

Ante el aumento de la diabetes en el mundo, en los países donde la herbolaria es una alternativa de de tratamiento, han aparecido productos comerciales con formulas herbolarias para tratar dicha enfermedad. En la gran mayoría de los casos, los productos herbolarios comerciales (PHC) están formulados con una

mezcla de 2 o más plantas medicinales, normalmente bajo la presentación de pastillas o capsulas.

Al no existir una legislación amplia y expedita para los PHC, regularmente estos productos son comercializados como suplementos alimenticios, situación que lleva a que no se les apliquen las mismas normas que a los medicamentos alopáticos (Garzón y col; 1999). Toda esta laxitud en las autoridades sanitarias conlleva a que no se tengan datos exactos sobre el número de PHC que son comercializados. Sin embargo, algunas instituciones educativas que cuentan con programas de investigación en plantas medicinales, como es el caso de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), ante el creciente aumento del padecimiento de la diabetes, han desarrollado formulas herbolarias y suplementos herbolarios para el tratamiento de este padecimiento (tabla 2 y 3).

Tabla No. 2. Formulas herbolarias desarrolladas en la UACH para el tratamiento de la diabetes.

Clave	Contenido	Enfermedad	Dosis	Presentación
D-250	<i>Tecoma stans</i> <i>Guazuma</i> <i>ulmifolia</i> y <i>Cecropia</i> <i>obtusifolia</i> ,	Diabetes mellitus- 2.	Control de. 3 a 6 tazas al día, una cucharadita por taza, hervir 7 min, a fuego lento, tomar 30 min.	Frasco con 300 gramos.
GUAZUMA (Extracto seco)	<i>Tecoma stans</i> <i>Guazuma</i> <i>ulmifolia</i> y <i>Cecropia</i> <i>obtusifolia</i> ,	Diabetes mellitus- 2.	Control de diabetes, 3 cápsulas al día, una cápsula 30 minutos antes de cada alimento con 1 vaso de agua.	Frasco con 90 cápsulas de 350 miligramos.

Fuente: Estrada, 2009.

Tabla No. 3. Suplementos alimenticios para la diabetes tipo 2

Clave	Contenido	Enfermedad	Dosis	Presentación
Licuido para diabéticos	<i>Deshidratado en polvo de cebolla morada, nopal dientes de ajo, limón y ejote.</i>	Auxiliar en el control de la diabetes.	2 cucharadas soperas en un vaso con jugo de toronja o agua, se puede endulzar con miel de maguey, y tomar al menos tres vasos al día.	Frasco con 400 gramos.

Fuente: Estrada, 2009.

2.3 Adulterantes vegetales en productos herbolarios

Un adulterante es la adición de un material distinto a los ingredientes indicados en un producto herbolario (Miller, 2001). Como mencionamos en el apartado anterior, un número importante de los PHC son comercializados como suplementos alimenticios, debido a que en dicha categoría la regulación sanitaria es sumamente laxa. Los productos herbolarios de acuerdo a la OMS son empleados por el 97% de la población mundial para mejorar su estado de salud, aunque no se conocen los datos específicos de consumo para cada una de las enfermedades en que son empleados. Esta demanda se ha incrementado debido a la publicidad y bajo costo en comparación con los tratamientos alopáticos, por ejemplo en el 2011 se comercializaron suplementos alimenticios por un valor de 293 millones de dólares en el mercado privado, es decir, en farmacias, tiendas de autoservicio, mercados, pequeños locales o de persona a persona. El crecimiento de este sector es superior al de las medicinas convencionales. En el periodo 2006 al 2011 la venta de suplementos alimenticios en nuestro país creció 24.9% y se espera que en el periodo 2012 al 2016 esta industria crezca 22.5%. Las razones del consumo de estos productos son diversas, entre ellas se encuentra la concepción errónea de que por ser de origen natural son seguros. Sin embargo, los productos herbolarios pueden provocar reacciones adversas importantes, la mayoría de ellas relacionadas con toxicidad inherentes a sus componentes o por interacciones con medicamentos alopáticos de prescripción médica (Garza, 2013).

El control y aseguramiento de la calidad en productos herbolarios normalmente se realiza por medio de métodos analíticos, debido a la forma en que muchas veces se encuentran las plantas medicinales en estos productos, en fragmentos o en polvo, el objetivo de estos procesos es asegurar la identidad de las plantas medicinales, su eficacia y la estabilidad del producto en el tiempo (Cardoso y Villarreal, 2009).

La mayoría de los productos manufacturados que utilizan las personas pasan por procesos de control y aseguramiento de la calidad, esto se hace más estricto cuando se trata de medicamentos alopáticos, por lo que los controles en productos herbolarios deberían ser de primordial importancia, ya que la presencia de algún material tóxico pudiera poner en peligro la vida de los consumidores (Waksman, 2009).

El empleo de los productos herbolarios está en aumento, por lo cual debemos tener muy presente la calidad de las plantas que sirven como materia prima para la obtención de estos productos o para la obtención de extractos a escala industrial. El control de calidad del material vegetal es un aspecto relevante, ya que garantizan la autenticidad, inocuidad, pureza, contenido de principios activos, así como también su efectividad y estabilidad (Waksman, 2009).

El control de calidad de productos herbolarios es un proceso que tiene que darse bajo parámetros internacionales estandarizados que están regulados por organismos o instancias competentes. Los aspectos que normalmente se evalúan son químicos y biológicos. Para que los productos herbolarios analizadas puedan estar dentro de los límites o parámetros deben cumplir otras normas como la de buenas prácticas de cultivo, buenas prácticas de fabricación y procesos de validación. El hecho de aplicar todos estos controles o especificaciones nos da un criterio suficiente para poder dictaminar si los productos están dentro de norma o no, desde la materia prima hasta el producto terminado (Permanand, 2006; Mukherjee, 2002).

La adulteración en plantas medicinales o productos herbolarios puede ser causada intencionalmente o puede ser accidental. Estas adulteraciones consisten en una sustitución de una o varias plantas medicinales, plantas medicinales de baja calidad, adición de ingredientes artificiales, etc. (tabla No. 4)

Tabla No. 4. Algunos tipos de adulteraciones en plantas medicinales.

Tipo de adulteración	Descripción
Sustitución con variedades comerciales inferiores	Es la sustitución de la planta medicinal por otro material vegetal de parecido morfológico, de menor calidad y que puede o no tener acción terapéutica deseada.
Adulteración con sustituyentes artificiales manufacturados	Se cambia la planta medicinal por un material artificial que presenta forma y apariencia similar a la planta de interés.
Sustitución por material vegetal agotado	Se adiciona material vegetal de interés pero que ya ha sido utilizado previamente para la obtención de extractos. Este tipo de adulteración se da principalmente con los aceites volátiles.
Sustitución por sustancias naturales similares pero más baratas	La planta medicinal es sustituida por otra planta que no tiene relación con la primera, estas puede tener o no acción terapéutica deseada.
Adulteración por adición de materiales pesados sin valor	Son materiales que se adiciona a la planta medicinal para incrementar su peso.
Adición de principios sintéticos	Se adiciona sustancias con actividad farmacológica para mejorar la calidad de materiales vegetales pobres.
Uso de la material vegetal de la misma planta con menor actividad farmacológica	El material vegetal se mezcla con otras partes de la misma planta que tiene menor concentración de principios activos o que no tiene.

Fuente: Mukherjee, 2008; Guillen y Sarmiento, 2012.

La Food and Drug Administration (FDA) ha identificado una gran variedad de compuestos no declarados con actividad farmacológica en más de 140 productos, en su mayoría comercializados bajo denominaciones de naturales o suplementos alimenticios. En un estudio realizado en Taiwán se encontró que un 24% de adulteraciones son compuestos con actividad farmacológica en una muestra de 2,609 productos de medicina tradicional china. Dentro de los ingredientes no declarados con los que se encuentran adulterados los productos antes mencionados se encuentran medicamentos de prescripción, sustancias controladas, fármacos con rechazo de aprobación por las agencias reguladoras, compuestos experimentales, además de análogos de fármacos que carecen de estudios en humanos por lo que son de riesgo desconocido. Los productos adulterados con frecuencia se comercializan para tratamiento de diabetes, hipercolesterolemia, insomnio, aumento del desempeño sexual y rendimiento físico, para bajar de peso, así como productos contra el dolor y reumatismo (Garza, 2013).

2.4 Técnicas de Identificación de adulterantes Vegetales

Existen varias formas de poder identificar o autenticar los productos herbolarios, el proceso consiste en detectar alguna característica morfológica o algún componente químico característico de cada una de las plantas medicinales que integran la fórmula. El problema que se tiene con las características morfológicas es debida a que la mayoría de los productos herbolarios están integrados por materiales pulverizados, lo que la opción más viable es la detección de compuestos químicos característicos de cada una de las plantas medicinales. Estos compuestos químicos que sirven para la autenticación de plantas medicinales se les conoce como marcadores. El avance de las técnicas de la química analítica, la bioquímica y la biología molecular han llevado a la identificación de varios tipos de marcadores, por lo que actualmente estos marcadores se agrupan en 4 tipos: taxonómicos, químicos, bioquímicos y genéticos. A continuación se hará una descripción de cada uno de éstos y la tecnología que permite su desarrollo e identificación.

2.4.1. Marcadores taxonómicos o morfológicos

Estos fueron los primeros marcadores empleados en la identificación de plantas medicinales. Para la identificación de las plantas medicinales se emplean caracteres morfológicos que describen a los vegetales o identifican a una especie. Normalmente estos caracteres se mantienen en todos los individuos de la misma especie, presentan poca variabilidad y son altamente heredables. Aunque en las especies cultivadas con frecuencia se pueden encontrar unos pocos caracteres que muestran diferentes grados de variabilidad, especialmente en aquello de interés particular para el hombre como son el tipo y la forma de la hoja, la forma del fruto y la forma de la flor.

Para poder realizar la identificación de cualquier planta por marcadores morfológicos, se requiere que el ejemplar este completo con raíz, hojas, tallos, flor y fruto; muchas veces esto último complica el proceso de identificación, por lo que pudiéramos decir es una desventaja. Mientras los marcadores bioquímicos (isoenzimas) o ADN, como se describe más adelante, pueden ser utilizados para caracterizar el genotipo de un individuo a partir de muestras de células o tejidos en cualquier estadio fisiológico (Franco y col., 2001).

2.4.2 Marcadores químicos

La identificación de una planta medicinal se puede realizar por medio de la presencia de uno o más compuestos químicos. Normalmente se busca un compuesto químico de interés farmacológico que sea estable en el tiempo, regularmente estos compuestos químicos pueden pertenecer al grupo de los alcaloides, cumarinas, taninos, flavonoides, saponinas, terpenos, antraquinonas o lignanos. Uno de los cuidados que se debe tener en cuenta a la hora de realizar el análisis de los metabolitos, es que la concentración de los metabolitos cambia de un tejido a otro. Actualmente son muchas las plantas que se pueden identificar a través de su perfil cromatográfico o de metabolitos secundarios (Zhang y col; 2011).

Las principales técnicas utilizadas en la caracterización de compuestos químicos o metabolitos en plantas medicinales son: Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), Cromatografía en capa fina (CCF), Cromatografía

líquida o de gases acoplada a espectrometría de masas (CLAR-MS o CG-MS) (Nicoletti, 2012).

2.4.2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La CLAR es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La separación cromatográfica en CLAR es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria (Romero, 2002).

2.4.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Esta técnica es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es una capa uniforme (silica gel o el polímero C18), homogénea aplicada sobre un soporte inerte (generalmente plástico). También se utiliza el término de “cromatografía plana” que engloba la cromatografía de capa fina y la cromatografía en papel. La muestra es desplazada por la fase estacionaria por un sistema de eluyentes (solventes), que pueden ser compuestos químicos puros o mezclas. La separación de los metabolitos está en función de su polaridad y la interacción con la fase estacionaria (Gutiérrez, 2002).

2.4.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CLAR-MS)

Esta técnica permite el análisis preciso de masas para la separación, identificación, caracterización y cuantificación de diferentes compuestos químicos presentes en muestras complejas. El equipo permite identificar compuestos sintéticos, caracterizar y analizar modificaciones en proteínas, definir perfiles de biomarcadores, identificar metabolitos o detectar la presencia de pesticidas.

La exactitud de masas típica es menor a 1 ppm, confiriendo eficacia, fiabilidad y reducción de falsos positivos. La velocidad de adquisición de datos es de hasta 40 espectros por segundo y permite la compatibilidad con los flujos de trabajo

de cromatografía de alto rendimiento. La capacidad de resolución es de hasta 40,000 lo que implica el poder de separar los compuestos a nivel traza (impurezas, metabolitos o biomarcadores a bajas concentraciones); incluso en presencia de compuestos mucho más abundantes. La alta sensibilidad en columna es a nivel de femtogramos. Su capacidad de realizar alternancia rápida de la polaridad entre barridos permite analizar los iones positivos y negativos en un solo procedimiento. El ajuste automático e identificación confiable de una masa de referencia interna garantiza una exactitud de masa coherente, y una determinación de la composición elemental en un intervalo de concentraciones (masa/carga $-m/z-$) (Esquivel, 2012).

2.4.3. Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas, isoenzimas o aloenzimas, constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción, traducción, por lo que se ven menos influidos por el ambiente que otros marcadores.

2.4.3.1 Isoenzimas

Las isoenzimas fueron descubiertas por Hunter y Markert en 1957 y son variantes moleculares de una misma enzima, pero pueden tener diferentes propiedades. Ciertos cambios en la secuencia de ADN (mutaciones) que codifica para estas enzimas pueden resultar en cambios en la composición de aminoácidos. Si estos cambios se producen, las proteínas podrían tener la misma actividad biológica, pero como su composición de aminoácidos varía, podrían tener diferente carga neta y por tanto diferentes velocidades de migración electroforética de las formas iso-enzimáticas. Las isoenzimas han tenido un rol prominente en estudios de poblaciones vegetales para determinar variabilidad, estructura genética, sistemática, biología evolutiva, así como en descripción de germoplasma e identificación de variedades (Nuez y col., 2000). Se han utilizado varias estructuras de la planta, tales como hojas, raíces o botones florales, de las cuales se obtiene un extracto crudo, en un soporte permeable (almidón, PAGE) bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de

un teñido histoquímico. La separación se realiza mediante la carga eléctrica neta, peso molecular, punto isoeléctrico y/o combinación de estos criterios (separación multidimensional). De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alelos de un mismo gen. La metodología necesaria para el desarrollo y utilización de este tipo de marcadores es relativamente sencilla, rápida y económica (Becerra y col., 2000).

2.4.4. Marcadores genéticos de ADN

En la actualidad podemos encontrar un sin número de metodologías que emplean el ADN para desarrollar proyectos que tiene el objetivo de identificar especies y variedades vegetales de una forma más rigurosa en referencia con los métodos tradicionales.

El uso de los marcadores moleculares de ADN cada vez se incrementa ya que elimina los problemas que se presentaban con otro tipo de marcadores. Tienen una aplicación extensa y cada día se desarrollan otras aplicaciones. En entre los usos más cotidianos de estas metodologías se encuentra, la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e ínter específica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, y dispersión de especies (Claros, 2000).

Los marcadores moleculares son un grupo de técnicas que permite el estudio del genoma de un organismo a nivel del ADN. No se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectable es teóricamente ilimitado (Domínguez, 2012). A continuación se citan y describen algunos de los marcadores más relevantes (figura 1). Los del primer grupo hacen uso de enzimas que hidrolizan el ADN en una secuencia específica (nombradas técnicamente enzimas de restricción), por lo que después de la digestión enzimática, el ADN fragmentado es corrido en geles de acrilamida, donde finalmente se observa un patrón de bandas de ADN de

distintos tamaños (Valadez y Günter, 2000). En el caso del segundo grupo de marcadores moleculares de ADN se emplea la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), la cual es tecnología que permite sintetizar o fabricar ADN de *novο* a partir de un ADN molde *in vitro*. El objetivo es obtener una cantidad importante de un fragmento de ADN de interés, la formación de una nueva molécula de ADN se inicia a partir de una pequeña secuencia de ADN de 15-30 pb, denominada primer o cebador, dicha secuencia es complementaria a la secuencia del ADN molde que se quiere copiar (Solís y Andrade, 2005). Para poder realizar la técnica de PCR, se requiere extraer el ADN genómico del organismo de estudio, posteriormente se elabora la reacción química *in vitro* con los componentes adecuados para la formación de las nuevas moléculas de ADN. La reacción es colocada en un termociclador (equipo de PCR) para ser sometida a un patrón de temperaturas que permite la multiplicación de las moléculas de ADN. En el primer paso, las moléculas de ADN molde son desnaturalizadas (separación de las hebras de ADN), seguido los cebadores se alinean a su secuencia complementaria del ADN molde y por último la enzima ADN polimerasa comienza con el pegado de nucleótidos en uno de los extremos del cebador o primer. El equipo de PCR puede repetir varias veces el ciclo anterior hasta obtener una cantidad adecuada de ADN de interés (Nuez y Carrillo, 2000). El tercer grupo hace uso de las enzimas de restricción y la amplificación o multiplicación de ciertos fragmentos de ADN generados por la hidrólisis enzimática del ADN.

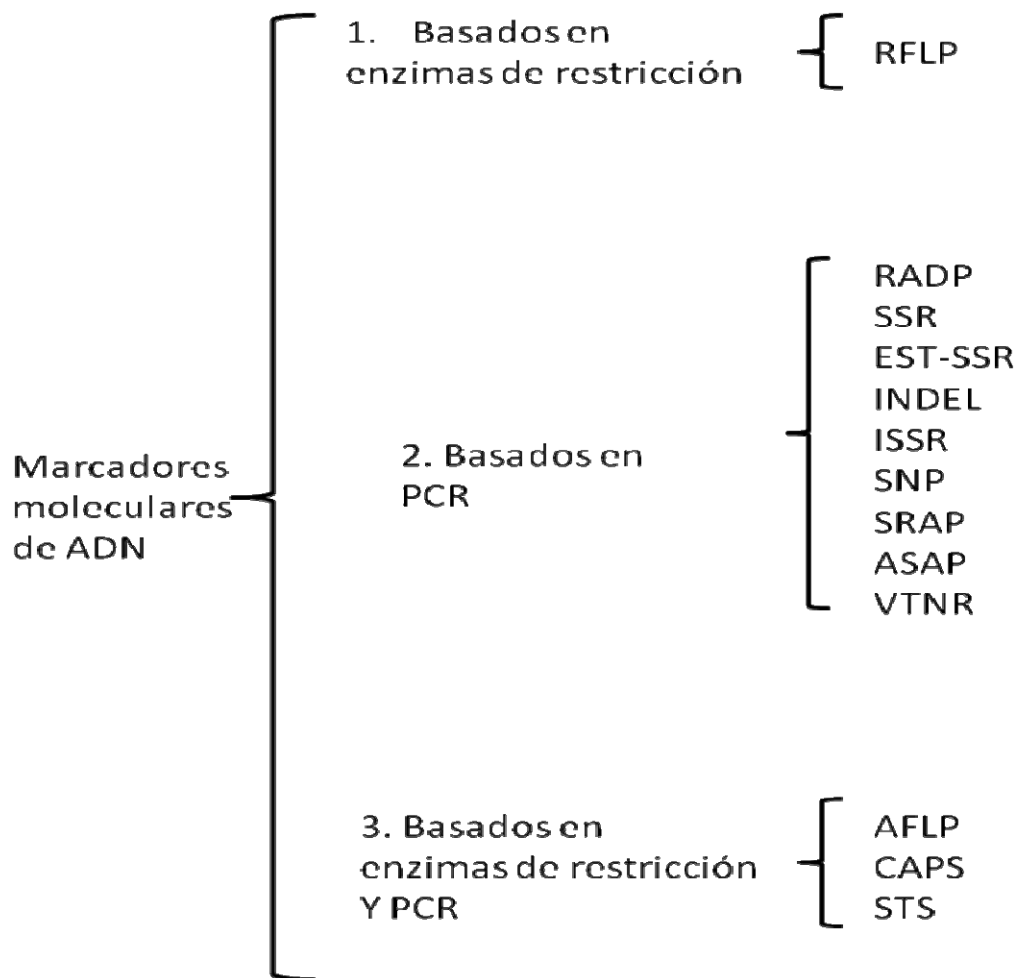


Figura 1. Clasificación de algunos marcadores moleculares de ADN (Shu y col; 2012).

2.4.4.1 RFLP

Los RFLPs (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) muestran las diferencias entre individuos en sitios concretos de la secuencia de ADN, por medio del corte del ADN por enzimas que reconocen secuencias específicas de nucleótidos, dichas enzimas son conocidas como enzimas de restricción tipo II. La presencia de una alteración en la secuencia de corte de una enzima de restricción a nivel del ADN, puede deberse a una mutación puntual o a alteraciones de mayor nivel, tales como deleciones o inserciones (Botstein y col., 1980). Por lo que el patrón de restricción de dos o más muestras nos indica la presencia o ausencia de diferencias a nivel de la secuencia de ADN, lo que significa que los organismos son o no iguales.

Este tipo de marcadores han sido empleados extensamente en la autenticación e identificación de plantas medicinales y productos herbolarios, del genero *Lupinus*, *Hedysaru*, *Triticum*, *Musa*, *Dendrobium* y *Fritillaria* (Heubl, 2010; Domínguez, 2012).

2.4.4.2 AFLP

Los AFPLs (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente), son una técnica muy útil, aplicable a la identificación de cualquier organismo sin cocimiento previo de la secuencia de ADN. Se fundamenta en la amplificación por PCR de ciertos fragmentos generados a partir del corte del ADN genómico, por parte de 2 enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN generados son acoplados a conectores, los cuales tienen una secuencia complementaria a los primers empleados en el PCR, lo que permite la generación de un gran número de marcadores con pocas reacciones de PCR (Agarwal y col; 2008). La detección de los fragmentos amplificados se realiza en geles de acrilamida o en electroforesis capilar acoplada a fluoróforos o radioactividad.

Aunque los AFLPs son más complicados o tediosos de realizar, han sido utilizados en la identificación de un buen número de plantas medicinales, por ejemplo *Panax*, *Actaea*, *Plectranthus*, *Caladium*, *Cannabis* y *Rehmannia* (Heubl, 2010; Hao y col; 2010).

2.4.4.3 RAPD

Los RAPDs (polimorfismo de productos amplificados al azar), fueron los primeros marcadores de ADN basados en la PCR que surgieron, fueron desarrollados en los 90's (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col; 1990). Presentan la ventaja de ser fáciles de interpretar, por lo que su empleo está demasiado extendido en todos los organismos. Se fundamenta en la amplificación por PCR de fragmentos al azar, por lo que no se requiere un conocimiento previo de las secuencias de ADN, el punto destacado de esta técnica es el empleo de primers de tamaño corto de 8-10 nucleótidos. Otra característica importante es su bajo costo, por lo que muchas plantas medicinales han sido estudiadas por medio de esta técnica, tales como:

Glycyrrhiza, Atractylodes, Astragalus, Amomum, Scutellaria, Panax, Aconitum, Ginkgo, Anectochilus, Lycium, Angelica, Bupleurum, Dendrobium, Magnolia, Asarum, Apocynum, Trollius, Phyllanthus, Indigofera, Coptis, Codonopsis, Taraxacum, Elephantopus, Rehmannia, etc. (Hao y col., 2010; Heubl, 2010; Domínguez, 2012).

2.4.4.4 SSRs ó microsatélites

Las secuencias simples repetidas (SSRs), son secuencias de ADN repetidas con una alta variabilidad como los microsatélites, minisatélites o midisatélites y satélites, son de gran valor en la búsqueda de polimorfismos que se distribuyen en todo el genoma.

Estos marcadores son conocidos también como repeticiones cortas en tándem (STR) o polimorfismos de longitud de secuencia simple (SSLPs), son las secuencias repetidas en tándem más cortas (1-6 pb) encontradas en el ADN. Tienen la característica de ser altamente polimórficas y abundantes (Hamada y col; 1982). Para el empleo de de estos marcadores moleculares se requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN, sobre todo de la región que flanquea al microsatélite, ya que es esta zona donde se diseñan los primers que permiten la amplificación del microsatélite. Los fragmentos de ADN generados son separados en geles de acrilamida acoplados a la detección por fluorescencia o en electroforesis capilar. Una desventaja es el alto costo de la técnica y una ventaja es su automatización y reproducibilidad.

Los microsatélites han sido utilizados para la identificación o autenticación de diferentes plantas medicinales como *Panax, Acanthopanax, Dendrobium, Cymbopogon, Bupleurum*, y *Schisandra* (Heubl, 2010; Domínguez, 2012).

2.4.4.5 SNP

Los polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) son generados normalmente por mutaciones de todo tipo, este cambio en la secuencia del ADN de los organismos a permitido utilizarlos como marcadores para ver la variabilidad genética entre individuos o poblaciones. Son los polimorfismos más ampliamente estudiados, principalmente en mamíferos. Actualmente con el surgimiento de la secuenciación de nueva generación (NGS), estos

marcadores tienden a emplearse cada vez más. Una de las desventajas que tienen es que se debe tener conocimiento de la secuencia de ADN, en pocas palabras se debe tener un genoma de referencia para poder realizar el análisis de estos marcadores, además del alto costo y difícil interpretación de los resultados. En plantas medicinales se han ocupado poco, pero actualmente ya se han realizado algunos estudios, para poder hacerlo más sencillo solo se buscan SNP en regiones intergenicas o no codificadoras de proteínas. Las plantas medicinales donde han sido probados estos marcadores son *Panax ginseng* y *P. quinquefolius*, *Lonicera japonica* (Chen y col; 2013; Domínguez, 2012).

2.4.4.6 SCAR

Las regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCARs) es una técnica propuesta por Paran y Michelmore en 1993. Los SCAR se fundamentan en la secuenciación de un fragmento polimórfico obtenido por RAPDs y el posterior diseño de un juego de primers de alrededor de 20 pb, que específicamente solo amplifican a dicho fragmento. La ventaja que tienen sobre los RAPDs es su alta especificidad, su fácil análisis y su alta reproducibilidad. Esta técnica se ha empleado en la autenticación de plantas de *Panax* y la discriminación de especies de los géneros *Artemisia*, *Phyllanthus*, *Pueraria*, *Sinocalycanthus*, *Embelia* y *Lycium* (Kiran y col; 2010; Heubl, 2010).

2.5 El marcador de ADN *rbcL*

En la última década se han utilizado ciertas secuencias de genes o regiones intergénicas para la identificación molecular de plantas medicinales. Estas secuencias empleadas para la identificación puede formar parte del ADN nuclear, mitocondrial o del cloroplasto, esto dependiendo principalmente del organismo que se está estudiando. De acuerdo a la experiencia de varios investigadores los marcadores de ADN que mejores resultados han aportado se encuentran en el genoma nuclear y de cloroplasto. Este último, se ha convertido en el favorito para la identificación y autenticación de plantas medicinales en los últimos años. Las secuencias nucleotídicas de ADN del cloroplasto empleadas en estudios de identificación molecular son alrededor de

10 (*accD*; *ndhJ*; *rpoB*; *matK*; *rbcL*; *rpoC1*; *psbA-trnH*; *ycf5*, etc.), una de las más empleadas es la secuencia nucleotídica parcial de la subunidad grande de la enzima fotosintética ribulosa-1,5-bifostato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO), codificada por el gen *RbcL*. Dicho gen es universal en todas las plantas, presenta un número alto de copias a nivel del genoma, ha sido ampliamente secuenciado y es fácil de amplificar por PCR (Penjor y col; 2010; Newmaster y col; 2006; Vijayan y Tsou, 2010).

2.6 Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gradiente químico (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis -DGGE-) o de temperatura (Temperature Gradient Gel Electrophoresis -TGGE-) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos.

La técnica de DGGE fue diseñada por Fischer y Lerman (1983), inicialmente para detectar mutaciones puntuales en humanos ya que se pueden separar fragmentos de ADN cuyas secuencias de nucleótidos difieren en una sola base nitrogenada (Muyzer y Smalla, 1998). Posteriormente, a partir de los trabajos propuestos por Muyzer y col., (1993), la técnica comenzó a ser empleada en la identificación de microorganismos en muestras ambientales (Muyzer y Smalla, 1998).

Para poder separar los fragmentos de ADN con la misma longitud, se emplea un gel de acrilamida con la presencia de elementos desnaturalizantes como la urea y formamida (DGGE) o bien usando temperatura (TGGE). En el caso del DGGE el gradiente químico se dispone de menor a mayor concentración de los agentes desnaturalizantes., mientras la temperatura se mantiene constante entre 50-65 °C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida, en la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe (Figura1A). La concentración desnaturalizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno entre las bases nitrogenadas del ADN. Así fragmentos de ADN con secuencias nucleotídicas

diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Figura 2 A, B) (Fernández y Le Borgne, 2014).

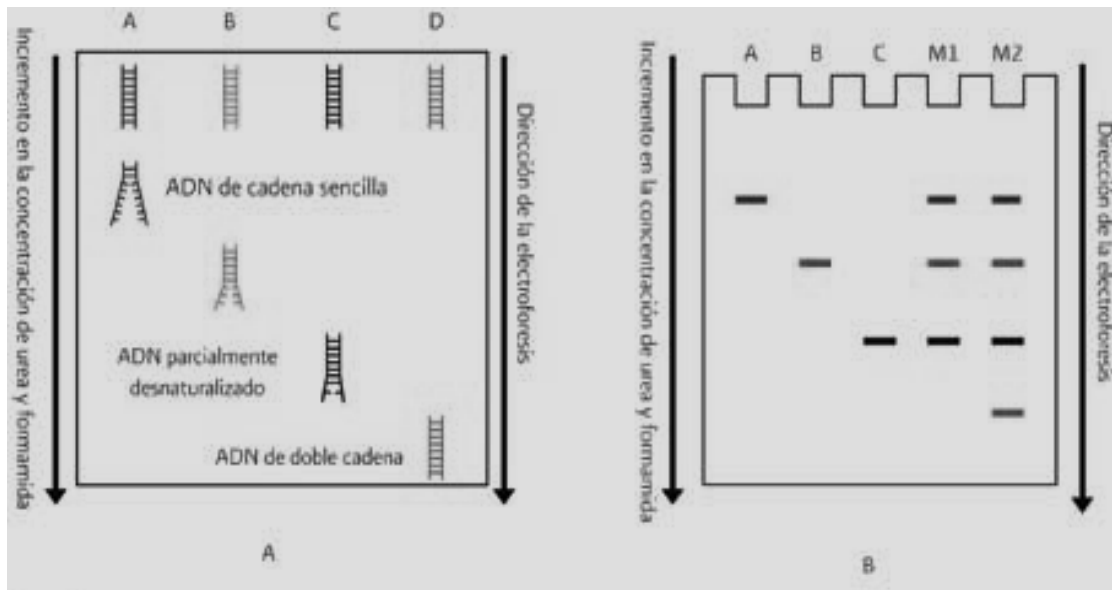


Figura 2. Principio de la Técnica de DGGE. A) Esta herramienta permite separar fragmentos de ADN que tienen el mismo tamaño (por ejemplo los fragmentos A, B, C y D), las separación de los fragmentos se fundamenta en las diferencias de su secuencia nucleotídica. Aquellos fragmentos de ADN pobres en guanina-citosina (fragmento A) se desnaturalizan a bajas concentraciones de urea y formamida, por lo que su migración en el gel se interrumpe rápidamente y ocupan posiciones superiores. Ocurre lo contrario con los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina (fragmento D), cuya migración por el gel sólo se retarda a altas concentraciones de urea y formamida, ocupando posiciones inferiores. B) M1, mezcla de fragmentos A, B y C; M2, mezcla de fragmentos A, B, C y D (Fernández y Le Borgne, 2014).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de los productos comerciales derivados de plantas medicinales es muy diverso e incluye, por ejemplo, compuestos químicos puros con actividad farmacológica; plantas medicinales usadas tradicionalmente (té, tintura, etc.) partes de la planta enteras o pulverizadas; extractos no estandarizados, con poca información de calidad, y por tanto, sin información de eficacia clínica, efectos farmacológicos y clínicos establecidos. Esto debido a la poca o nula

regulación de estos productos. Actualmente no se conoce el número de productos comerciales herbolarios que se comercializan en nuestro país (Torres, 2009).

Algunos autores mencionan que muchos de estos productos herbolarios son adulterados por lo fabricantes con compuestos químicos (medicamentos alópatas), materiales provenientes de animales o con materiales vegetales, con el objetivo de maximizar las ganancias, pero son nulos los estudios en México que se hayan realizado para verificar esta hipótesis. Sin embargo, para poder tener una idea, Newmaster y col., (2014), realizaron un estudio en productos herbolarios comercializados en E. U. A y Canadá, donde encontraron que un 60% de los productos analizados presentaban adulteración con distintos materiales. Es de destacar que la regulación sanitaria en estos países es más rigurosa que en México. Gutiérrez y Betancurt, (2005); reportaron que en México se tiene conocimiento de al menos 6 plantas medicinales que son ampliamente adulteradas, entre las que se encuentra la salvia (*Salvia officinalis*) que es cambiada por la salvia bolita (*Buddleia perfoliata*); zarzapadilla (*Smilax spp*) que es sustituida por el helecho águila (*Pteridium aquilinum*); damiana (*Turnera diffusa*) que se intercambia por la damiana de guerrero (*Turnera ulmifolia*), por citar algunos ejemplos.

Durante muchos años se ha tratado de buscar formas que permitan identificar los materiales presentes en los distintos productos herbolarios comerciales, sin embargo la gran heterogeneidad de los materiales que los integran, el cambio en el tiempo de los componentes químicos de las plantas medicinales y el origen de éstas últimas, hacen difícil poder determinar todos los ingredientes de las formulas herbolarias comerciales.

El problema de la adulteración de los productos herbolarios comerciales, reviste un problema de salud pública, ya que no se tiene conocimiento de cuáles son los adulterantes, por lo que es difícil establecer si los adulterantes puede causar un daño secundario a las personas que consumen estos productos (Prakash y col; 2013).

4. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado en base a sus estadísticas que el 80% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales para cubrir sus necesidades de salud. México tiene una fuerte tradición en el uso de la medicina herbolaria y es uno de los países con mayor diversidad en plantas medicinales, ya que cuenta con aproximadamente con 4,500 especies medicinales. Debido al rápido crecimiento del mercado de productos herbolarios, es necesario llevar a cabo estudios de control de calidad confiables, que deben ser considerados a la hora de la adquisición de estos productos, tanto por los prestadores de servicios de salud como por los pacientes (Waksman, 2012).

La Secretaria de Salud en México, contempla una serie de leyes que regulan la venta, uso y comercialización de productos herbales; sin embargo, cuando se considera a estos productos como suplementos alimenticios, en lugar de productos terapéuticos, no se les exige un control de calidad, ni siquiera para asegurar la autenticidad de la planta medicinales que los integran (Waksman, 2012).

El aumento en el comercio de los productos herbolarios y la falta de controles sanitarios, ha propiciado malas prácticas en su elaboración con la incorporación de materiales de relleno en los productos herbolarios, como lo confirman algunos estudios realizados en países como Estados Unidos, Canadá y China (Feria y col., 2007; Newmaster y col., 2013; Ernst, 2002). La adición de los materiales de relleno en los productos herbolarios es una práctica que pone en riesgo no solo salud de los consumidores, si no desgraciadamente su vida. Debido a las repercusiones que pudiera traer la adulteración de los compuestos herbolarios, los investigadores están tratando de encontrar técnicas que permitan conocer los materiales presentes en las formulas herbolarias. Los análisis taxonómicos y químicos no han podido establecerse como controles de calidad eficaces, por lo que algunos otros investigadores han optado por los análisis de ADN. Sin embargo, un número importante de técnicas moleculares de ADN no permiten una identificación eficaz de algunos materiales vegetales, cuando estos se encuentran formando parte de mezclas.

Por lo tanto, en el presente trabajo se propone una técnica molecular de ADN estandarizada que permita la identificación de los ingredientes vegetales en formulas herbolarias, por lo que serviría también en la detección de adulterantes vegetales en productos herbolarios comerciales empleados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. La implementación de esta técnica por parte de las instituciones sanitarias reguladoras de los productos herbolarios, beneficiaría a todos aquellos consumidores que emplean productos herbolarios para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

Desarrollar un método molecular para la detección e identificación de adulterantes vegetales a partir de productos herbolarios comerciales empleados para el tratamiento de la diabetes tipo 2

Objetivos particulares:

- a. Elaborar una búsqueda de productos herbolarios comerciales empleados para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.
- b. Optimizar el método de extracción de ADN a partir de materiales vegetales pulverizados, deshidratados y mezclados.
- c. Estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) para la amplificación de un fragmento del gen *rbcL* utilizado como marcador molecular.
- d. Afinar la técnica de Electroforesis en Geles de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) para la búsqueda e identificación de adulterantes vegetales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Adquisición del material biológico

Los materiales herbolarios comerciales para este trabajo se consiguieron en el Centro de la Ciudad de México, D.F. Específicamente en una tienda naturista del Mercado Sonora, ubicado en la calle de Circunvalación: Se adquirieron 7 productos herbolarios comerciales distintos que normalmente se comercializan para el tratamiento de la diabetes.

6.2 Extracción de ADN

La extracción de los ADN se realizó de acuerdo al manual del proveedor del kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega^R), como a continuación se describe:

- 1.- El material proveniente de una capsula se pulverizo en un mortero estéril con 500µl de agua destilada estéril para obtener una mejor disgregación del componente vegetal.
- 2.- Se tomó un volumen de 500µl de la suspensión celular y se le adicionó 600µl de la “solución de lisis de núcleo”, se mezcló durante 3 segundos.
3. Posteriormente, se incubó a 65°C durante 15 minutos. Al término de la incubación, se agregó 3 µl de la “solución de RNasa” y se mezcló por inversión.
4. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y enseguida se dejó enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Después se agregó 200µl de la “solución de precipitación de proteínas” y se mezcló durante 20 segundos.
6. Se centrifugó a 16,000 X g durante 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril nuevo.
7. Enseguida se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3.5 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío (-20°C). El tubo se dejó incubando durante toda la noche a -20°C.
8. Al otro día se centrifugó a 16,000 X g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
9. El ADN se lavó con 600µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclado varias veces por inversión. Se volvió a centrifugar a 16,000 X g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante.
10. El tubo con el ADN fue puestos invertido sobre papel absorbente para eliminar los residuos de etanol.
11. Por último, el ADN fue re-suspendido en 100µl de “solución de rehidratación de ADN” e incubado a 65°C durante 10 minutos. El ADN extraído se guardó a -20°C hasta su uso.

6.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis de ADN en geles de agarosa se realizó de acuerdo a lo reportado por Sambrook y Russell (2001):

1. La concentración de agarosa en los geles depende del tamaño de fragmento de ADN que se quiere separar (tabla No. 5). Se utilizaron geles de agarosa al 0.8% (p/v) para correr el ADN genómico y al 2% (p/v) para el análisis de los productos de PCR.

2.- La agarosa fue disuelta en tampón TAE 0.5X (anexo 2), agregándole “GelReed^{MR}” (concentración final de 0.0075X) para poder visualizar el ADN (figura 3).

3. Una vez solidificado el gel de agarosa se agregó el tampón de electroforesis TAE 0.5X.

Tabla No. 5. Concentración de agarosa empleada en los geles para la separación de fragmentos de ADN

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

Fuente: Sierra-Palacios, 2005.

4.- Las muestras de ADN fueron preparadas colocando 5-10µl de ADN y 3µl de tampón de carga 6X (anexo 2). Cada muestra de ADN fue puesta en un pocillo del gel de agarosa (figura 3). Siempre en el carril número 1 se colocó el marcador de selección de ADN.

5. La electroforesis se corrió a 120 volts durante 1 hora. La visualización del ADN se apreció en un fotodocumentador “MultiDoc IT” de la marca UVP. El

tamaño de los fragmentos de ADN se pudo estimar comparándolo con las bandas de ADN del marcador de selección.

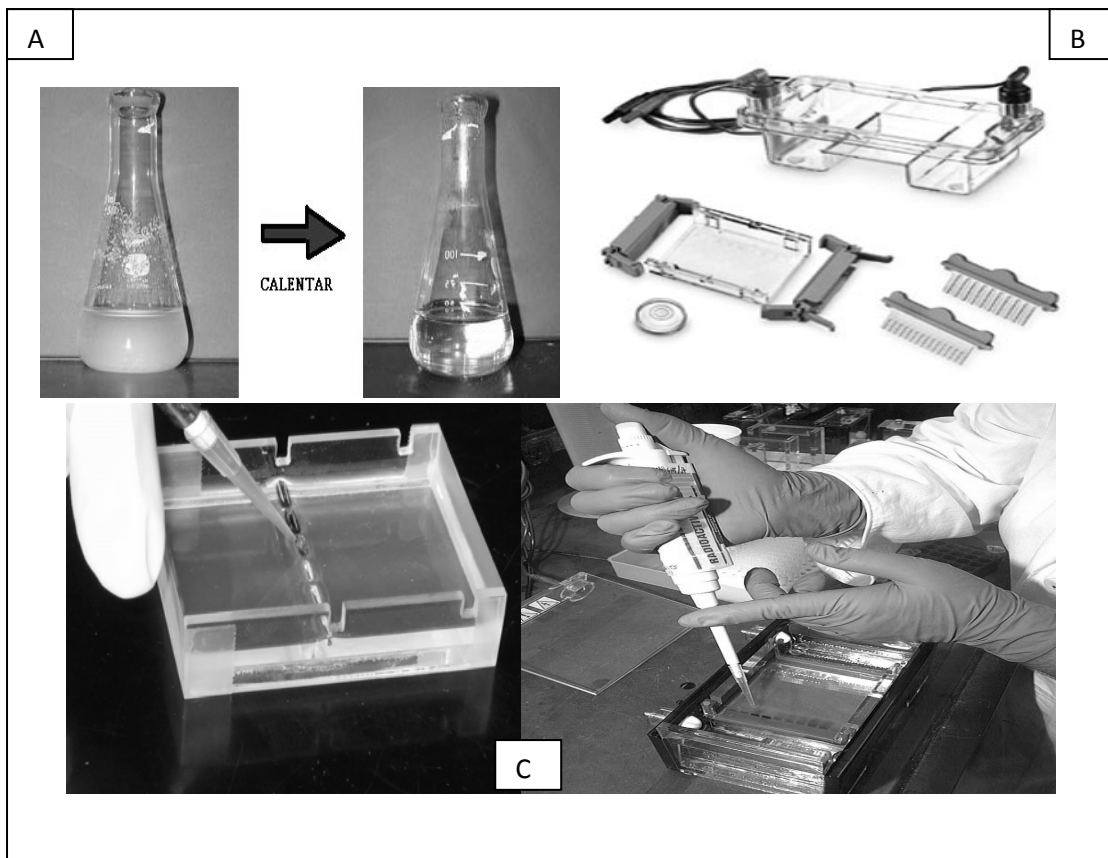


Figura 3. Preparación de un gel de agarosa. A) Disolución de la agarosa por calentamiento hasta punto de ebullición. B) Equipo de electroforesis: cámara, cubeta y peine. c) Carga de muestras de ADN en los pocillos del gel de agarosa.

6.5 Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR) se realizó en forma general de acuerdo a lo reportado por Sambrook y Russell, 2001; Serrato y col; 2014.

1. La amplificación del marcador de ADN *rbcL* se realizó de acuerdo a lo publicado por Bafeel y col. 2012; Muizer y col. 1993; con algunas modificaciones. Los primers empleados en la presente investigación fueron diseñado de acuerdo a un alineamiento múltiple de secuencias del gen *rbcL* de

13 plantas medicinales distintas, dichas secuencias fueron extraídas de la base de datos de ADN ENA-EMBL (figura 6).

2. La reacción de PCR se elaboró de la siguiente manera: 1µl ADN, 5µl tampón de la enzima *Vent*, 0.5µl de MgCl (50mM), 1µl de dNTP's (10 mM) , 1µl primer forwar RbcL-GC-F [5'-cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gat act gat atc ttg gca gc-3'] (10pmol/µl o µM), 1µl Primer reverse RbcL-R [5'-ggg tta ata gta cat cc-3'](10pmol/µl o µM) y 0.2µl enzima *Vent* (5u/µl) (tabla No. 6).

3. Una vez elaboradas la reacción de PCR, los tubos fueron colocados en un termociclador Maxygen, el cual se programó de acuerdo a la tabla No. 7.

4. Terminado el PCR, los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2%(p/v), para su visualización se empleó un fotodocumentador.

Tabla No. 6. Reacción de PCR para la amplificación del gen *rbcl*.

Concentración	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Muestra	Cap- 1	Cap- 2	Cap- 3	Cap- 4	Cap- 5	Cap- 6	Cap- 7
H2O	14.3µl	14.3µl	14.3µl	14.3µl	14.3µl	14.3µl	14.3µl
Tampón [5x]	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
MgCl [50 mM]	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
dNTP's [10 mM]	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
Primer F [10 µM]	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
Primer R [10 µM]	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
ADN [20 ng/µl]	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
Enzima <i>Vent</i> [5 U/µl]	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Tabla No. 7. Programa del termociclador empleado para la amplificación del gen *rbcL*

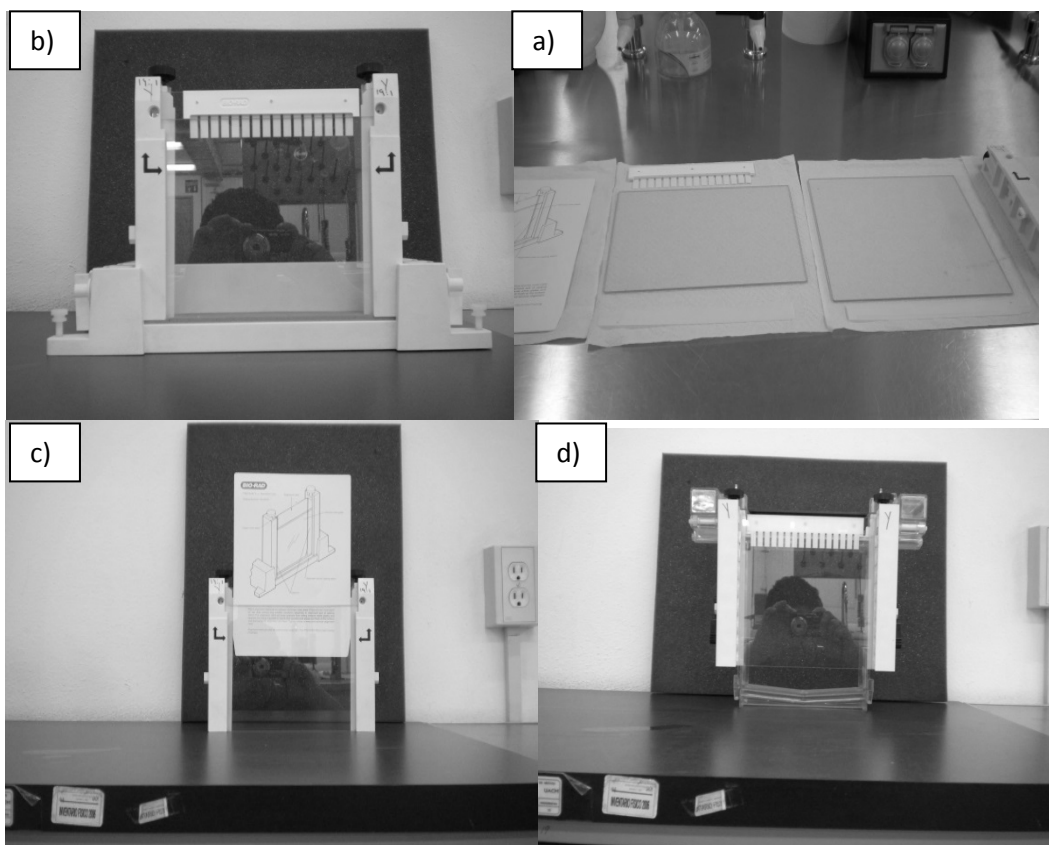
Etapa	Temperatura °C	Tiempo.
Desnaturalización inicial	94°C	5 min.
Desnaturalización	94°C	30 seg.
Hibridación	54°C	2 min.
Polimerización	72°C	1 min.
Polimerización final	72°C	5 min.
Termino	4°C	Indeterminado

30
ciclos

6.6 Electroforesis de ADN en Geles de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La Electroforesis de ADN en geles de gradiente Desnaturalizante (DGGE) se realizó de acuerdo al manual de DCode System for DGGE de Bio Rad, (2012).

1. Para la elaboración del DGGE se empleó un equipo DCode Universal Mutation Detection System de BioRad (figura 4).



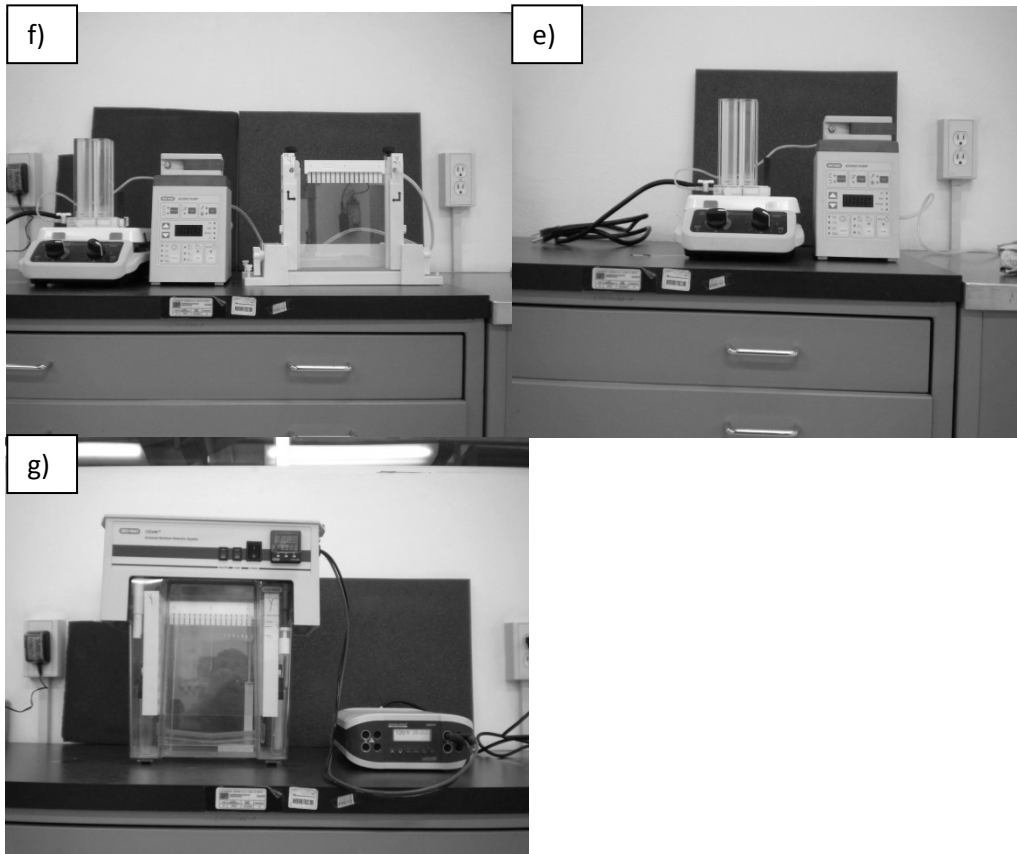


Figura 4. Equipo DCode Universal Mutation Detection System de BioRad. a) Cristales, espaciadores, postes y peine. b) Ensamblaje de los cristales con los postes y la tarjeta de alineamiento. c) Base de ensamblaje con cristales ensamblados (postes de sujeción, junta de goma y peine). d) Sistema formador de gradiente y bomba peristáltica. e) Llenado del gel. f) Marco sujetador (con el gel y el ensamble de vidrios) y g) Módulo de electroforesis y control de temperatura (Bio Rad., 2012).

2. Preparación de los geles

a). Se alinearon los espaciadores a lo largo de los bordes del vidrio más grande, colocado encima el vidrio pequeño y sujetándolos juntos con los postes de sujeción.

b) Se colocaron los vidrios ensamblados en la base para geles, de forma tal que el vidrio más grande estuviera situado del lado opuesto a la junta de goma (figura 4c), checando en todo momento que la base para geles estuviera nivelada.

- c) Posteriormente se alinearon los separados con la tarjeta de alineamiento.
- d) Enseguida se instaló el sistema formador de gradiente y la bomba peristáltica, la que tiene la función de llenar el ensamble de los vidrios (molde) con acrilamida (figura 4d).
- e) Se colocó un sello en el fondo del ensamble de los vidrios con 800 μ L de la solución de acrilamida al 0%, 4 μ L de persulfato de amonio (PSA) al 10% (p/v) y 4 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (anexo 2). Se dejó polimerizar el sello durante 45 minutos.
- f) Se preparó por separado en tubos “Falcon” de 50ml las soluciones desnaturalizantes de baja capacidad desnaturalizante al 20% (v/v) y la de alta capacidad desnaturalizante al 50% (v/v), posteriormente se agregaron las soluciones polimerizantes (PSA y TEMED) (tabla No. 8) y se mezcló por inversión.

Tabla No. 8. Reactivos y cantidades empleados en la elaboración del gel para DGGE.

Solución	Solución de trabajo de baja capacidad desnaturalizante 20%	Solución de trabajo de alta capacidad desnaturalizante 50%
Solución stock desnaturalizante al 0%	4ml	10ml
Solución stock desnaturalizante al 100%	16ml	10ml
TEMED	20 μ l	20 μ l
PSA al 10% (p/v)	76 μ l	76 μ l

- g) A continuación las soluciones desnaturalizantes preparadas al 20 y 50% fueron puesta en el aditamento formador de gradientes (figura 4e). El formador de gradiente se conectó a la bomba peristáltica y fue colocado sobre una parrilla de agitación, en su interior se colocó un par de magnetos, que tienen la función de mezclar las soluciones desnaturalizantes para homogenizar el gradiente químico del gel.

h) Enseguida se encendió la bomba peristáltica y se comenzó con el llenado del gel a una velocidad de 7.8 ml/min. Antes de que se llenara totalmente el gel se colocó el peine. Se dejó polimerizar el gel durante 2 (figura 4e).

3. Pre calentamiento del tampón de electroforesis y preparación del tanque de electroforesis.

a) Se prepararon 7 litros de TAE 0.5X, los cuales se adicionaron a la cámara de electroforesis.

b) Se ensambló el equipo de DGGE (cámara de electroforesis y módulo de control de temperatura) y se echó andar el equipo para calentar el tampón de electroforesis a 64°C.

c) Una vez polimerizado el gel, se retiró cuidadosamente el peine, posteriormente se colocó el ensamble con el gel en el marco sujetador (figura 4f).

d) Enseguida se colocó el marco sujetador (con el gel y el ensamble de vidrios) dentro de la cámara de electroforesis en la posición vertical.

4. Preparación y cargado de las muestras

a) Se colocaron en tubo de microcentrífuga de 500µL, 10µL de ADN de producto de PCR del gen *rbcl*, se le añadió 5 µL de tampón de carga 6X (azul de bromofenol, azul de xileno cianol, glicerol y agua destilada). Se mezclaron en el vortex por 10 segundos.

b) Con las puntas especiales de 20µl delgadas, se tomó los 15µl de la muestra con el tampón de carga y se colocó cada muestra en un pocillo del gel de acrilamida.

5. Electroforesis

a) Se colocó el módulo superior de electroforesis y control de temperatura.

b) Posteriormente se programó el equipo para mantener una temperatura constante de 60 °C durante la electroforesis.

c) Enseguida, el equipo de electroforesis se conectó a la fuente de poder, programándola a un voltaje de 200 volts durante 10 minutos. Terminado este programa, se cambiaron los parámetros de la fuente de poder a un voltaje de 85 volts durante 16 horas (figura 4g).

6. Tinción con plata

- a) Terminada la electroforesis, se apagó la fuente de poder y el equipo de electroforesis, dejándolo enfriar durante 15 minutos.
- b) A continuación se retiró el marco sujetador con el gel de la cámara de electroforesis.
- c) Posteriormente se retiró el gel del marco sujetador y se desarmó el ensamble de vidrios.
- d) El gel de acrilamida unido al “gel bond” fue lavado con agua destilada y colocado en el recipiente de tinción.
- e) Al gel se le adicionó 200ml de la solución de fijación 1X Cairns (anexo 2), agitándolo durante 3 minutos.
- f) Se eliminó la solución Cairns 1x y se almacenó para detener la reacción de tinción.
- g) Se agregó 200ml de solución de tinción de plata (anexo 2), agitando durante 10 minutos en el “shaker” a una velocidad de 150 movimientos/min.
- h) Se retiró la solución de tinción de plata, se lavó el gel y el contenedor con agua destilada. Posteriormente se agregó alrededor de 200ml de agua destilada al gel y se agitó durante 2 minutos.
- i) Se desechó el agua destilada y se lavó el gel con agua destilada limpia. Enseguida el gel fue puesto en el contenedor de desarrollo de la tinción.
- j) Se adicionó una pequeña cantidad de la solución de desarrollo (anexo 2) y se agitó durante un minuto de forma manual.
- k) Se retiró la solución de desarrollo y se adicionó el resto de la solución. Se agitó durante 1 hora.
- l) Después de la aparición de las bandas, se eliminó la solución de desarrollo y se agregó la solución de fijación Cairns 1X para parar la reacción de tinción, se agitó durante 5 minutos en el shaker a una velocidad de 150 movimientos/min.
- m) Se eliminó la solución fijación Cairns 1X y el gel se colocó sobre papel absorbente, una vez eliminado el exceso de líquido fue fotografiado en un fotodocumentador MultiDoc de UVP (Sanguinetta, 1994).

7. Recuperación del ADN contenido en bandas individuales

- a) A partir de los patrones de bandas visualizados una vez finalizada la tinción, se seleccionaron y cortaron las bandas más representativas con un bisturí estéril.

b) Cada una de las bandas fue colocada en un tubo de microcentrífuga estéril de 500µl con 50µl de agua destilada estéril.

c) Se incubaron los tubos durante toda la noche a 4 °C.

9. Re-amplificación del ADN recuperado de cada una de las bandas individuales

a) Se utilizó 1µl del ADN recuperado de cada banda en una reacción de PCR de 25µl. Para la re-amplificación por PCR se utilizaron los primers (*RbcL*-GC-F y *RbcL*-R) bajo las mismas condiciones de reacción y amplificación antes mencionadas.

b) Los productos de PCR de la re-amplificación fueron limpiados con el kit comercial Qiaex II (Qiagen) y enviados a secuenciar al laboratorio divisional de biología molecular de la división de CBS de la UAM-I.

6.7 Identificación molecular de las plantas medicinales

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídica del ADN de las bandas enviadas a secuenciar, se emplearon tres bases de datos de secuencias de ADN para buscar a qué secuencia se parecía cada una de las secuencias que se obtuvieron, por lo que se buscó en: Genbank (NCBI), ENA (EMBL) y DDJB. Las secuencias fueron ingresadas a un algoritmo en cada una de las bases de datos, que 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 (Altschul y col; 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). 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. Materiales biológicos analizados

Se consiguieron 7 diferentes productos comerciales para la diabetes tipo II, todos ellos en presentación como capsulas. Cada producto herbolario comercial fue re-etiquetado con un número, con el fin de guardar la privacidad de los nombres comerciales de los productos. Algunas de las formulas adquiridas no solo contienen material vegetal, sino también materiales de origen animal y fúngico (tabla No. 9).

Tabla No. 9. Lista de plantas medicinales que contienen los productos herbolarios comerciales empleados en el presente estudio

PLANTAS	Productos 1	Producto 2	Producto 3	Producto 4	Producto 5	Producto 6	Producto 7
ARANDANO	✓	✓					
NEEM	✓	✓					
WEREKE	✓	✓		✓			✓
ONAGRA	✓						
CARDO MARINO	✓		✓				
GUARUMBO	✓				✓	✓	
CHAYA	✓						
LAGRIMAS DE SAN PEDRO	✓				✓		✓
PRODIGIOSA	✓						✓
XOCONOSTLE	✓			✓	✓		
ACHICORIA	✓						
OLIVO	✓						
PALO DE ARCO	✓						
DIENTE DE LEÓN	✓						
NOPAL		✓		✓	✓		
YACÓN		✓					
SAVILA		✓		✓			
CAIGUA		✓					
ORTIGA		✓					
SALVIA		✓					
BARDANA		✓					
UÑA DE GATO		✓	✓				
REISHI			✓				
NONI			✓				
GRAVIOLA			✓				
MORINGA			✓				
EQUINACEA			✓				
PURPUREA							
CANCERINA			✓				
CUACHALALATE			✓				
FENOGRECO			✓				
NOGAL			✓				
ETCHO			✓				

Continuación

PLANTAS	Productos	Producto	Producto	Producto	Producto	Producto	Producto
	1	2	3	4	5	6	7
AJO CHINO			✓				
ZARZAPARRILLA			✓				
APIO				✓			
NARANJA				✓			
GUAYACAN AMARILLO					✓		
GUAYACAN ROJO					✓		
TRONADORA					✓		
MATARIQUE					✓		
LAMPAZO AMARILLO						✓	
RILLO						✓	
ESTRELLA						✓	
DIBETINA						✓	✓
JUDIAS						✓	
H. DE LA VIDA						✓	
ZACATECHICHI						✓	
ALMIDÓN DE MAÍZ						✓	
RAÍZ DE NOPAL							✓
PALO DE BRAZIL							✓
CASCARA SAGRADA							✓
HOJA DE CHANGARRO							✓

7.2 Extracción de ADN a partir de capsulas de productos herbolarios comerciales empleados para el tratamiento de la DM-2

El trabajo con materiales deshidratados y pulverizados represento todo un reto para la extracción del ADN, ya que no existe una metodología y/o un kit específico para estos materiales, por lo que se tuvo que realizar una serie de pruebas para poder ver cuál era el mejor método de extracción de ADN a partir de estos materiales. De todas las pruebas, se observó que el ADN extraído con el kit Wizard Genomic DNA de la marca Promega^{MR} fue útil para la amplificación por PCR. Por lo que se procedió a extraer el ADN de cada una de las muestras problema. Una vez extraído el ADN, fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) y teñido con "Gelred", en un extremo del gel se puso el marcador de selección (150 ng) y en cada uno de los carriles (1 a 7) se colocó 10 µl de ADN de los productos herbolarios analizados. Aunque la cantidad de ADN obtenido en la extracción fue baja (alrededor de 20 ng/µl), con una

degradación importante, fue suficiente para poder obtener productos mediante PCR (figura 5).

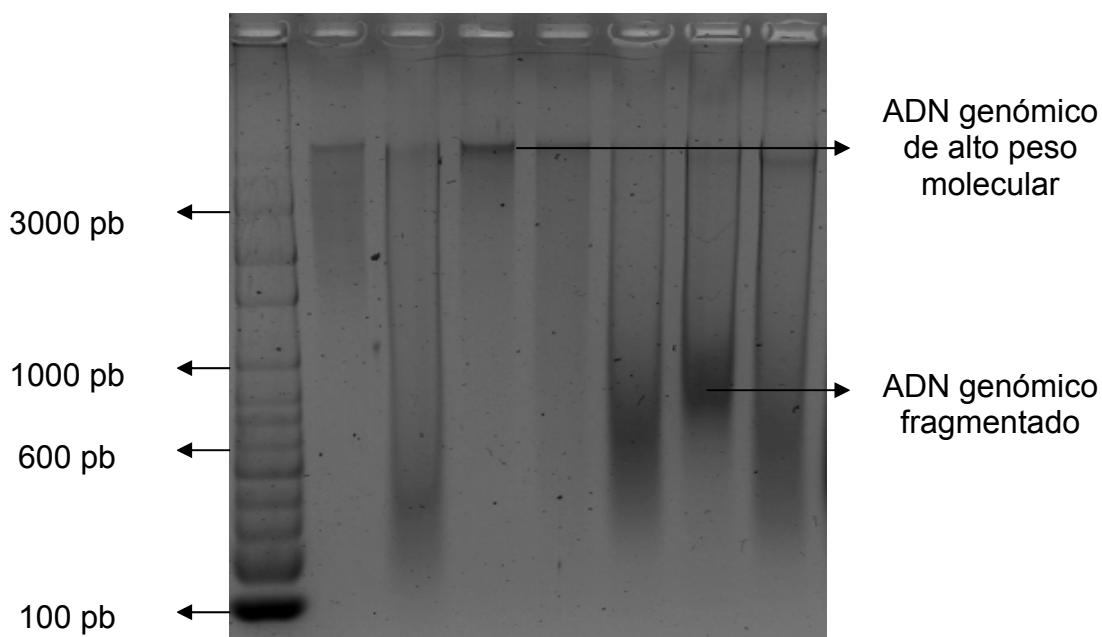


Figura 5. Gel de agarosa con ADN genómico. Carril M: marcador de ADN. Carril 1: producto herbolario 1. Carril 2: producto herbolario 2. Carril 3: producto herbolario 3. Carril 4: producto herbolario 4. Carril 5: producto herbolario 5. Carril 6: producto herbolario 6. Carril 7: producto herbolario 7.

7.3 Diseño de primers para la amplificación por PCR del gen *rbcL*

Para el diseño de los primers de DGGE se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad mayor del gen *rbcL* que codifica para la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, el cual se localiza en el genoma del cloroplasto. Para realizar los alineamientos de secuencias se seleccionaron las siguientes especies de plantas medicinales: *Adiantum capillus-veneris*, *Ibervillea lindheimeri*, *Ibervillea hypoleuca*, *Rosmarinus officinalis*, *Amphipterygium adstringens*, *Valeriana officinalis*, *Aloe spicata*, *Thymus caespititius*, *Thymus zygoides*, *Origanum majorana*, *Matricaria chamomilla*, *Mentha spicata*, *Cinnamomum verum*. Como se observa en la figura 6, existen secuencias altamente conservadas en algunas regiones, lo que permitió diseñar en estas zonas los primers para poder amplificar un fragmento del gen por PCR. Por otra parte, entre las secuencias conservadas existe variabilidad de las secuencias nucleotídicas entre una planta y otra, lo que permite

normalmente identificarlas por medio del ADN. Para el diseño del primer “forward” se utilizó la secuencia que se encuentra en la posición 81-101, obteniéndose la siguiente secuencia para dicho primer (DGGE-*RbcL*-F) 5'-GATACTGATATCTTGGCAGC-3', al cual se le adicionó una secuencia de 40 pb rica en GC en el extremo 5' (CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG), dicha secuencia tienen la función de no permitir la separación de las hebras de ADN en el extremos 5' de los productos de PCR bajo condiciones desnaturalizantes durante la electroforesis. La Temperature melting (T_m) de este último primer quedo en 83°C; mientras que para el caso del primer “reverse” se empleó la región 491-509, resultando la secuencia del primer (*RbcL*-R) 5'-GGTTTAATAGTACATCC-3' con una T_m de 54°C.

7.4 Amplificación de un fragmento del gen *rbcL* por PCR

Una vez obtenido el ADN genómico se procedió a la amplificación del fragmento del gen *rbcL* (marcador molecular para DGGE) que nos permitió realizar el análisis de DGGE. Debido a que los materiales vegetales durante la extracción de ADN no quedan completamente puros, normalmente algunos metabolitos (compuestos fenólicos, carbohidratos, etc.) quedan junto con el ADN extraído, lo que dificulta la amplificación del ADN por PCR. En este caso se requirió realizar una optimización de la concentración de ADN en la reacción de PCR para poder amplificar el ADN del marcador *rbcL*, en cada uno de los productos herbolarios usando diferentes diluciones a partir de las muestras de ADN concentradas (tabla No. 10).

Utilizando 1µl de las diluciones de ADN de cada muestra y se realizó una reacción de 25µl usando los primers diseñados. Con las condiciones de PCR establecidas, fue posible amplificar un de fragmento 470 pb del gen *rbcL* de los siete productos comerciales estudiados. los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% (p/v) y separados por electroforesis (figura 7).

Tabla No. 10. Optimización de concentraciones de ADN en el PCR del gen *rbcL*

Capsula	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
ADN (dilución)	1:25	1:10	1:25	1:25	1:25	1:10	1:10

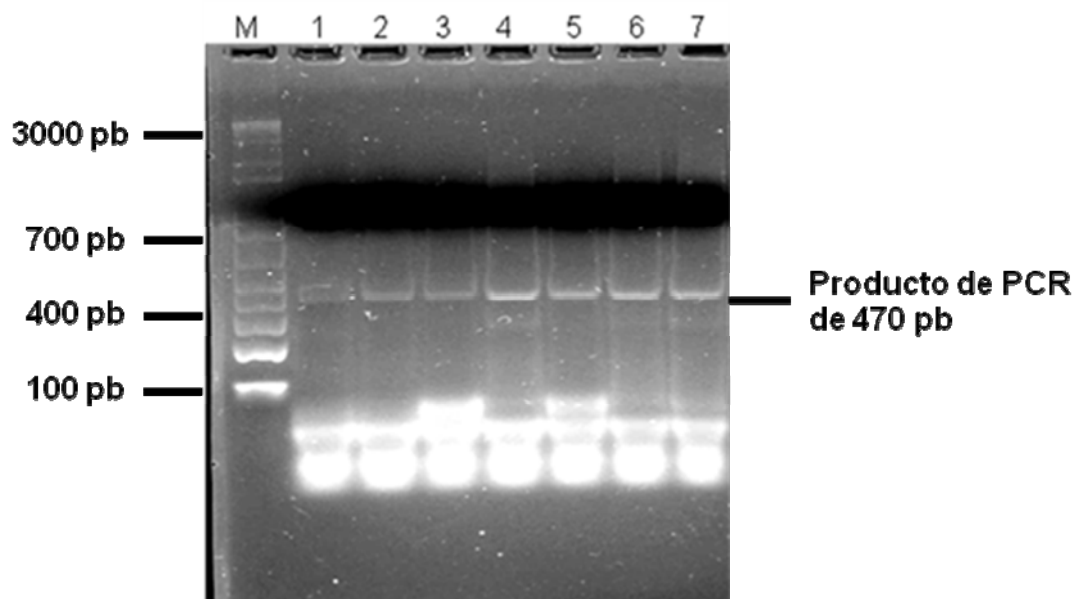


Figura 7. Productos de PCR en gel de agarosa. Gel de Agarosa con los fragmentos de ADN amplificado del marcador *rbcL* de cada uno de los productos herbolarios estudiados. Carril M- Marcador de molecular selección, carriles del 1-7- productos herbolarios.

7.5 Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

El empleo de esta técnica tiene como objetivo separar los productos de PCR amplificados del gen *rbcL*, para poder conocer o identificar cada una de las plantas medicinales que integran a un determinado producto herbolario comercial. Una vez obtenidos los productos de PCR del fragmento del gen *rbcL* de todos los productos herbolarios para la diabetes analizados, se procedió a su experimentación en geles de DGGE. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de acrilamida al 6% con una relación acrilamida/bisacrilamida de 37.5:1 respectivamente. El gradiente químico desnaturalizante que proporcionó la mejor separación de las bandas fue de 20 a 50% (figura 8).

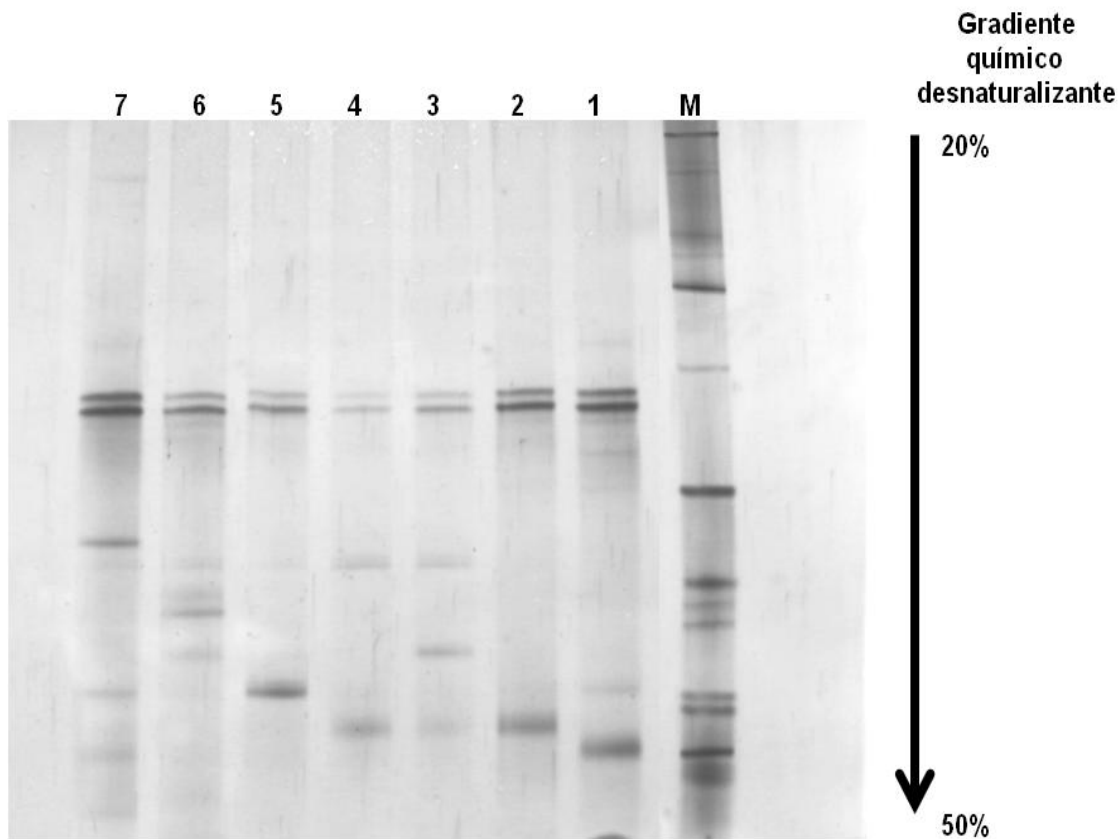


Figura 8. Separación de productos de PCR en gel de acrilamida/bisacrilamida (gel DGGE). Los productos de PCR del gen *rbcl* de cada una de las muestras analizadas fueron separados en un gel de DGGE con un gradiente desnaturante de 20% a 50%. Carril M: marcador de ADN; carril 1: PCR del producto herbolario 1; carril 2: PCR del producto herbolario 2; carril 3: PCR del producto herbolario 3; carril 4: PCR del producto herbolario 4; carril 5: PCR del producto herbolario 5; carril 6: PCR del producto herbolario 6; carril 7: PCR del producto herbolario 7.

Posteriormente se realizó un análisis visual del patrón de bandeo del gel de DGGE. Para el caso del producto herbolario 1 se registraron 11 bandas separadas, mientras que para el producto herbolario 2 y 5 solo 5 bandas, 6 bandas para el producto herbolario 4, 13 bandas para el producto herbolario 6 y por último 11 bandas para el producto herbolario 7. Posteriormente era necesario saber la identidad de cada una de las bandas para saber si las plantas encontradas en cada uno de los productos herbolarios analizados correspondían con la información proporcionada por el fabricante de los

productos herbolarios. La identificación de las plantas medicinales se centro en 10 bandas (tabla No. 11), esto debido al presupuesto que se tenía para la secuenciación. Primero se cortaron aquellas bandas que se encontraban en todos las muestras analizadas (1B; 2A y 5A), a continuación aquellas que aparecían en algunos productos herbolarios (3A, 3B y 6A) y por último aquellas bandas que eran exclusivas de alguno de los productos (1A, 1C, 7A y 7B) (figura 9; tabla 11). Cada una de las bandas cortadas fue colocada con 50 μ l de agua destilada estéril, esto para permitir la recuperación del ADN y su posterior secuenciación.

Tabla No. 11. Bandas seleccionadas que fueron cortadas del gel de DGGE

Banda	Productos herbolarios
1 A	PH1.
1 B	PH1;PH2;PH3;PH4;PH5;PH6 Y PH7
1 C	PH1.
2 A	PH1;PH2;PH3;PH4;PH5;PH6 Y PH7
3 A	PH3 y PH7.
3 B	PH3, PH5, y PH6.
5 A	PH1; PH2; PH3;PH4;PH5; PH6 Y PH7.
6 A	PH6 y PH7.
7 A	PH7.
7B	PH7.

PH = Producto herbolario

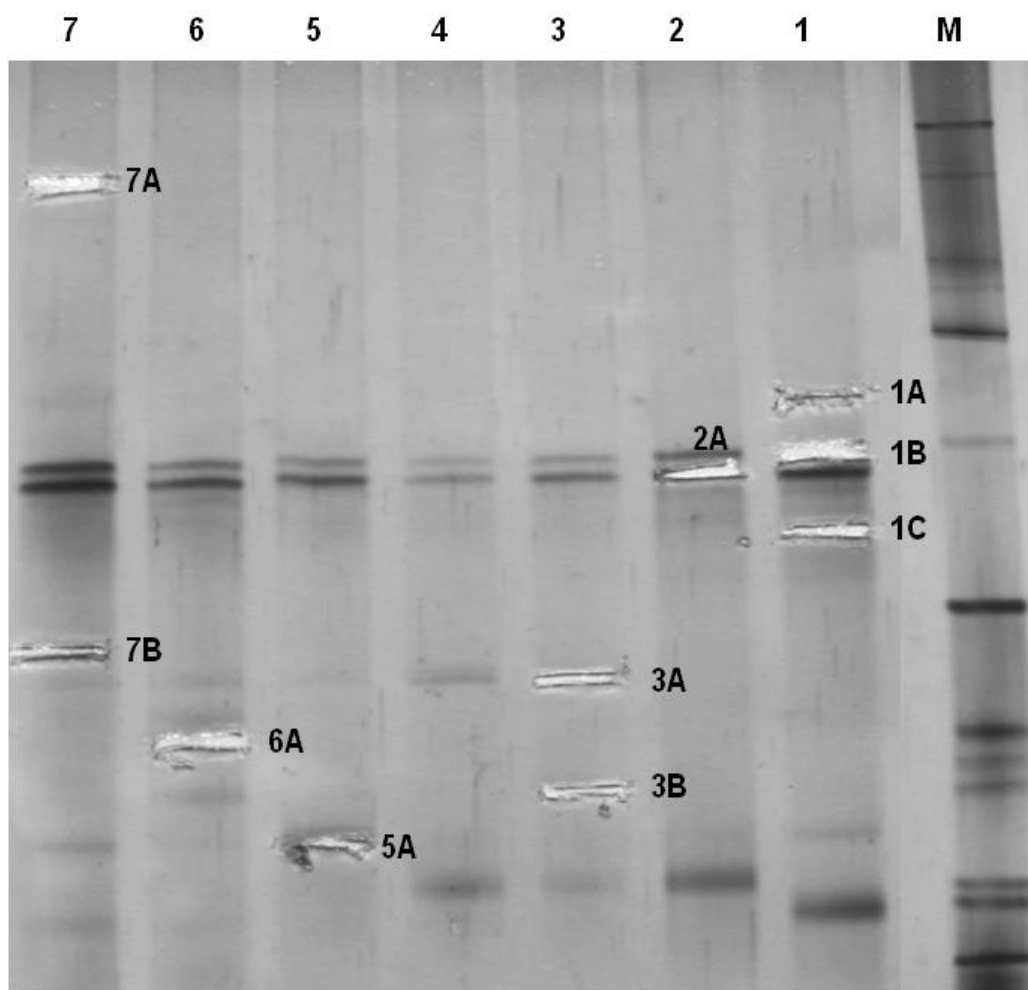


Figura 9: Gel de DGGE con las bandas cortadas. Carril M: marcador de ADN; carril 1: patrón de bandeado del producto herbolario 1; Carril 2: patrón de bandeado del producto herbolario 2; Carril 3: patrón de bandeado del producto herbolario 3; Carril 4: patrón de bandeado del producto herbolario 4; Carril 5: patrón de bandeado del producto herbolario 5; Carril 6: patrón de bandeado del producto herbolario 6; Carril 7: patrón de bandeado del producto herbolario 7.

7.6 Secuenciación del ADN proveniente de las bandas cortadas

Las secuenciación de las bandas se realizó con los primers de DGGE (DGGE-*RbcL-F* y *RbcL-R*), se obtuvieron siete secuencias, ya que tres bandas no se pudieron secuenciar (bandas 2A, 6A y 7B). La secuenciación de productos de PCR de forma directa presenta el inconveniente de no permitir obtener secuencias de la longitud exacta del fragmento, ya que las primeras y últimas 50 pb de la secuencia tienen que ser descartadas debido a que en estas regiones el secuenciador no detecta de forma eficiente cada uno de los

nucleótidos. A pesar de haber obtenido secuencias no limpias, estas fueron útiles para poder realizar la identificación (tabla No. 12).

Tabla No. 12. Secuencias obtenidas de cada una de las bandas cortadas del Gel de DGGE

Banda de ADN aislada del gel de DGGE	Secuencia de ADN de 5' - 3'
1 A	GCTACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCCGGAGTTCCCCCTGAAGAA GCAGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGAT GGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGAAGGTGCTACCACATTGAGGCTGTTGCTGGG GAAGAAAATCAATTTATTGCTTACGTGGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCT GTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCT CTACGTCTGGAGGATCTACGAATCCCCCTGCTTATTCCAAAACCTTTCCAAGTCCGCC CACGGTATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTTATTGGGATGT ACTATTAACC
1 B	GATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAAACCCCTCAACCTGGAGTTCCGTCAGAAGAA GCAGGAGCCGCGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTATGGACCGAC GGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCTGGA GAAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCT GTTACTAATATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGTGCT CTACGTTTGGAGGATTTGCGAATCCCTGTTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCT CACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCTCTACTGGGATGC ACTATTAAGCC
1 C	GATACTGATATTTTGGCAGCATTTTCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCGCCTGAAGAA GCAGGGGCCGCGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGAT GGACTTACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTATGGAATTGAGCCTGTTCTGGA GAAGAAAAGTCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCT GTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGTGCT CTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCTGTTGCGTATGTTAAAACCTTTCCAAGTCCGCCT CACGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTCTGTTGGGATGT ACTATTAACC
2 A	_____ No secuenciada
3 A	GATACTGATATCTTGGCAGCATTTTCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCGCCTGAAGAA GCAGGGGCCGCGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTATGGACCGAT GGACTTACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGCCGATGCTATGGAATTGAGCCTGTTCTGGA GAAGACAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCT GTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGTGCT CTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCGACTGCGTATGTTAAAACCTTTGAGGGTCCGCCT CACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTTATTGGGATGT ACTATTAACC
3 B	AATACTGATATCTTAGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCCGGAGTTCCCGCTGAAGAA GCAGGGGCTGCGGTAGCCGCCGAATCTTCTACTGGTACCTGGACAACCTGTGTGGACGGAT GGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATTGAGGCCGTTATTGGG GAAAAAATCAATTTATTGCTTATATAGCTTATCCTTTAAACCTTTTTGAAAAAGGTTCT GTTACTAACATGTTTACTTCCTTTGTGGGTAAGGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCT CTACTTTTAGAGGATCTGCAAATCCCCCTGCTTATTCCAAAACCTTTCCAAGGCCCGCCT CACGGCATCCAAGTTGAAAAAATAAATTGAACAAGTATGGACTTCCCCTATGGGGATGT ACTATTAACC

Continuación

Banda de ADN aislada del gel de DGGE	Secuencia de ADN de 5' - 3'
5 A	GATACTGATATCTTAGCAGCATTTTCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCCCCTGAAGAA GCAGGGGCTGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTATGGACTGAC GGGCTTACCAGTCTTGATCGCTACAAAGGTCGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGA GAAGAAAGTCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCT GTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGCGCT CTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCCACTTCTTACACTAAAACCTTTCCAAGCCCGCCTC ATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGCCCTATTGGGATGTA CTATTAACC
6 A	-----No secuenciada
7 A	GATACTGATATCTTGGCAGCAAGCATTCCGAGTAACTCCTCAGCTCGGGCGCCTGAAGAA GCAGGAGCTGCAGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTTTGGACTGAT GGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTATCACATCGAGCCCGTTCTGGG GACCCAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTATCCATTAGACCTATTTGAAGAGGGTTCT GTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAACGTATTTGGGTTCAAAGCCCTACGCGCT CTACGTTTGGAGGATCTACGAATCCCCCTGCTTATTCAAAAACCTTTCCAAGTCCGCCT CACGGTATCCAAGTTGAAAGGGATAAGTTGAACAAGTACGGTCGTCTTTATTGGGATGT ACTATTAACG
7 B	_____No secuenciada

7.7 Identificación molecular de plantas medicinales presentes en los productos herbolarios estudiados

Cada una de las secuencias obtenidas fueron ingresadas en el programa bioinformático Blast de las tres bases de datos de secuencias nucleotídicas de ADN (Genk Bank, ENA-EMBL y DDBJ) empleadas para la identificación de las plantas medicinales presentes en los productos herbolarios estudiados. Todas las secuencias mostraron un alto porcentaje de similitud con las secuencias almacenadas en las bases de datos, este resultando confirma con una alta probabilidad la identidad de cada una de las bandas secuenciadas. Los resultados indican que las plantas identificadas son: sábila (1A), nopal (1B), diente de león (1C), equinacea (3A), Ajo (3B), guarumbo (5A) y maíz (7A) (tabla No. 13).

Tabla No. 13. Porcentajes de similitud de las secuencias obtenidas de las bandas seleccionadas del DGGE y su valor E

Banda de iaslada del gel de DGGE	Planta medicinal	Base de datos Gen Bank		Base de datos DDBJ		Base de datos ENA- EMBL		Código de la secuencia utilizada para realizar la comparación
		% de similitud*	Valor E ^a	% de similitud*	Valor E	% de similitud*	Valor E	
1 A	Sábila (<i>Aloe vera</i>)	100	0.0	99	0.0	100	2 ⁻²³⁸	L05029
1 B	Nopal (<i>Opuntia ficus- indica</i>)	100	0.0	100	0.0	100	2 ⁻²³³	JX572807
1 C	Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	100	0.0	100	0.0	99	2 ⁻²³¹	HE963702
2 A	Nd**	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
3 A	Equinacea (<i>Echinacea purpurea</i>)	100	0.0	100	0.0	100	2 ⁻²³³	KF61303
3 B	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	100	0.0	100	0.0	100	2 ⁻²³³	KF769497
5 A	Guarumbo (<i>Cecropia obtusifolia</i>)	100	0.0	100	0.0	100	2 ⁻²³³	KF138134
6 A	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
7 A	Maíz (<i>Zea mays</i>)	100	0.0	100	0.0	100	2 ⁻²³³	AY167975
7 B	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

(*) Con secuencias almacenadas en cada una de la bases de datos empleadas. (a) Valor que indica que la secuencia encontrada para la comparación se realizó de forma aleatoria, entre más pequeño es el valor E, mayor similitud estadística existe entre las secuencias.

(**) No determinado.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La banda 1A que resulto ser la planta de sábila, no se encuentra registrada en el producto herbolario 1, sin embargo según la etiqueta del producto 2 y 4 tienen como ingrediente a esta planta, pero en el análisis del gel de DGGE no pudimos detectarla (figura 9), no se observó una banda que correspondiera a esta especie.

En el caso de la banda 1B que corresponde al nopal, se encontró en el análisis de DGGE que todos los productos analizados la presentan, sin embargo de acuerdo a los fabricantes de los productos herbolarios, solo los productos 2, 4 y 5 contenían dicha planta.

Con respecto a la banda 1C, que pertenece al diente de león, se visualizó una banda en el gel de DGGE en el producto herbolario 1, revisando todos los productos herbolarios mencionados en la tabla No. 9, efectivamente solo el producto 1 registra a esta planta.

Para el caso de la banda 3A, correspondiente a la equinacea, se observó su presencia en los productos herbolarios 3, 4, 6 y 7 en el gel de DGGE, pero solo un fabricante la reporta en la etiqueta, que corresponde al producto 3.

En el caso del ajo, banda 3B, esta se observa en los productos herbolarios 3, 5 y 6 en el gel de DGGE, de manera similar a la banda 3A, solo el fabricante del producto 3 reporta su presencia.

La banda 5A, la cual fue identificada como guarumbo, dicha banda la observamos en todos los productos herbolarios analizados en el DGGE, aunque en los productos herbolarios 4 y 6 no es clara, mientras que de acuerdo a la información mostrada por los productos adquiridos, se menciona que esta planta es ingrediente de tres fórmulas: 1, 5 y 6.

La banda 7A que pertenece a la planta de maíz, resultó solo observada en el producto herbolario 7 en el gel de DGGE, mientras que la información de los fabricantes menciona que está presente solo en el producto 6.

En el caso de la banda 2A, 6A y 7B, no se pudieron secuenciar, esto debido a contaminación de las bandas, lo quiere decir que la banda observada no era única, sino que probablemente 2 o más bandas de ADN estaban ocupando la misma posición o espacio.

9. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos es de destacar que pudimos detectar algunas plantas medicinales, las cuales estaban registradas en las etiquetas de los productos herbolarios analizados, no encontramos alguna planta que no estuviera registrada en algunos productos estudiados. Esto último puede deberse a que no se secuenciaron todas las bandas observadas en el gel de DGGE, pero también puede deberse a que la concentración en la que se pudieran encontrar estas plantas es demasiado baja, lo que no permitió su detección. Algunas plantas aunque son medicinales aparecieron en productos que no las declaran en su etiqueta, esto es algo normal, los fabricantes de fórmulas herbolarias normalmente no declaran en su etiqueta todos los componentes de sus productos, esto debido a que mantienen el secreto de sus fórmulas. En otros casos sucedió lo contrario, el fabricante menciona una determinada planta como ingrediente de su producto, pero no la presenta.

De acuerdo a las bandas seleccionadas, las secuencias analizadas en las tres bases de datos indicaban la presencia de la misma especie por lo cual podemos asegurar que todos los productos analizados están adulterados, ya sea con la adición de plantas no especificadas en la etiqueta o la ausencia de ciertas plantas, aunque en México no se han realizado estudios donde se verifique los adulterantes en productos herbolarios, con una cantidad suficiente de muestras y todo el rigor estadístico, en otros países han encontrado con estos estudios que más del 60% de los productos herbolarios comercializados presentan adulteración (Newmaster y col; 2013), aquí se debe tener en cuenta que los países donde se han realizados dichos estudios tienen reglamentaciones y controles sanitarios más estrictos que México (OMS, 2000). Falta todavía mucho por investigar en México sobre los adulterantes en productos herbolarios, de acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo los adulterantes encontrados son finalmente plantas medicinales (excepción para algunos, el maíz), pero se tendría que continuar evaluando muchos otros productos para verificar los tipos de adulterantes y su probable efecto en el humano.

De acuerdo a las plantas encontradas en los distintos productos herbolarios, algunas de ellas han sido utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo II, caso del nopal, diente de león, equinacea y ajo, sin embargo ninguna de ellas tiene estudios farmacológicos completos que indiquen que pueden emplearse para tratar la diabetes tipo II (UNAM, 2009). De las plantas medicinales detectadas, solo el guarumbo tiene evaluaciones farmacológicas en humanos, siendo de las pocas plantas que presentan actividad hipoglucemiante (Pérez-Guerrero y col; 2001).

10. CONCLUSIONES

1. Se pudo obtener ADN en cantidad y calidad suficiente a partir de materiales de plantas medicinales deshidratadas y pulverizadas, para poder realizar el análisis de identificación y autenticación de las plantas medicinales presentes en las formulas herbolarias.
2. Los primers diseñados para la amplificación de un fragmento de 470 pb del gen *rbcL*, funcionaron de forma correcta para realizar el análisis de DGGE de todos los productos herbolarios adquiridos.
- 3.- La región seleccionada para la amplificación del fragmento del gen *rbcL*, permitió discriminar entre una planta medicinal y otra, por lo que puede ser empleado como marcador molecular en otros estudios con plantas medicinales.
4. La técnica de DGGE fue eficiente para poder identificar o autenticar plantas medicinales presentes en productos herbolarios.
5. De los 7 productos analizados en este estudio, todos presentaron adulteraciones, ya que mostraron presencia y/o ausencia de los ingredientes señalados en las etiquetas, pudiéndose incluso identificar molecularmente algunos de sus componentes vegetales.

11. PERSPECTIVAS

1. Realizar pruebas para determinar cuál es la cantidad mínima de material vegetal que se puede detectar con este método.
2. Elaborar experimentos que permitan una mayor estandarización de la amplificación realizada por PCR, como ejemplo tomar plantas individuales y

someterlas al análisis de DGGE, para ver si en todas se genera solo una banda de ADN.

3. Probar primer con una mejor calidad de pureza, esto podría ser, limpiados por PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida).

4. Evaluar otras regiones del genoma de cloroplasto, mitocondria y núcleo de plantas medicinales para poder desarrollar otros marcadores moleculares.

5. Proponer la técnica de DGGE para elaborar códigos de barras de ADN (barcoding DNA) plantas medicinales.

12. RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA PROMOCIÓN DE LA SALUD

La Promoción de la Salud consiste en proporcionar a los pueblos los medios necesarios para mejorar su salud y ejercer un mayor control sobre la misma. Para alcanzar un estado adecuado de bienestar físico, mental, social donde un individuo o grupo debe ser capaz de identificar, realizar sus aspiraciones, satisfacer sus necesidades, cambiar o adaptarse al medio ambiente. La Salud se percibe pues, no como el objetivo, sino como la fuente de riqueza de la vida cotidiana (Chapela, 2003).

Durante la Conferencia de Ottawa en 1986, se concluyó que la promoción de la salud propone que los individuos y colectivos sean capaces de realizar sus aspiraciones, satisfacer sus necesidades y transformar el medio o adaptarse a él. Recomienda la superación de la inequidad en salud, proponiendo acciones que tengan como objetivo garantizar las oportunidades y recursos que posibiliten a las personas a alcanzar el máximo de salud (Resende, 2008).

Por lo antes mencionado, nos queda claro que la promoción de la salud busca proporcionar información y herramientas para mejorar los conocimientos, habilidades y competencias necesarias para la vida. Por lo que un conocimiento importante en la población mexicana es la utilización de plantas medicinales para tratar las distintas enfermedades. El conocimiento recabado durante siglos por los pobladores de estos territorios es infinito, su transmisión ha sido de forma oral y en los últimos siglos escrita, sin embargo es importante seguir recopilando dicho conocimiento, ampliándolo y actualizándolo. Ya que en estos momentos se comienza a tener serios problemas de salud en la

población, lo que en algún momento será difícil que los sistemas de salud puedan atender la demanda de todos los pacientes, situación que llevará a hacer uso más extenso del conocimiento herbolario (Velázquez, 2105). Por lo que es importante elaborar investigaciones que garanticen un consumo seguro y eficaz de plantas medicinales, por lo que difícilmente podrán causar algún daño. El presente estudio aporta una metodología que podrá servir para desarrollar procesos que permitan garantizar un consumo seguro de productos herbolarios comerciales para la diabetes mellitus tipo 2.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. 1997. Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Reports of the Experts Diabetes Care, 1183-1197.
2. Aguilar, C. A; López, V. M; Xolalpa, M. S. 2009. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. El Reino Vegetal, farmacología y terapéutica, 52-64.
3. Aguilar, A. M. 2002. Los tratamientos populares y el personal de salud. Relevancia de la herbolaria. Yolpahtli, 7-93.
4. Aguilar, A. A; Xolalpa, M. S. 2009. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. Revista Conocimiento 89: febrero (89): 53-61.
5. Artola, M. S. 2012. Estrategia en Diabetes del Sistema Nacional de salud. SANIDAD, 35-45.
6. Aschner, P. 2012. Guías ALAD de Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. ALAD, 1-78.
7. Ayón, P. Y. 2007. Estudio Etnofarmacológico de las diferentes especies endémicas de agave en la medicina tradicional del Estado de Hidalgo. Tesis, 2.
8. Babu, P. A. 2006. "A Database of 389 Medicinal Plants for Diabetes." Bioinformation 1.4: 130–131. Print.
9. Bafeel, S. O; Arif, I. A; Bakir, M. A; Al Homaidan, A. A; Al Farhan, A. H; Khan, H. A. 2012. DNA barcoding of arid wild plants using rbcL gene sequences. Genet Mol Res. 2012 Jul 19; 11(3):1934-41. doi: 10.4238/2012.July.19.12.
10. Becerra, V; Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. SCielo, 1-16.
11. Bio Rad. 2012. Manual The DCode™ Universal Mutation Detection System - Bio-Rad. Bio Rad Laboratories. USA.
12. Botstein, D; White, R. L; Skolnick, M; Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314- 331.
13. Carballo, M. A; Cortada, C. M; Gadano, A. B. 2005. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Red de Revistas Científicas

de América Latina. El Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica., 95-108.

14. Carlon, A. A; Barrera, S. A. D; Martinez, S. I; Sanchez, V. H. M. 2003. La medicina naturista es una alternativa para el control de la diabetes tipo 2. Tesis, 2-45.

15. Chapela, M. M. 2003. Promoción de la Salud. Un instrumento del poder y una alternativa emancipatoria. Promoción de la Salud, 1-15.

16. Chen, X; Liao, B; Song, J; Pang, X; Han, J; Chen; S; 2013. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal Panax species based on DNA barcoding. Gene. 2013 Nov 1;530(1):39-43. doi: 10.1016/j.gene.2013.07.097. Epub 2013 Aug 9.

17. Claros, M. G; Crespillo, R; Aguilar, M. L; Cánovas, F. M. 2000. DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive tree (*Olea europaea* L.). Euphytica 116: 131-142.

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

19. Dorado, P. G. 2005. Aislamiento y visualización de los ácidos nucleicos. Bioquímica y Biología Molecular, 1-11.

20. ENSANUT. 2014. Diabetes Mellitus: La urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 1-4.

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

22. Espinoza, A. L. 2001. Guía Práctica sobre la Técnica de PCR. Redalyc, 1-24.

23. Esquivel, G. E; Noriega, C. R; Bello, G. M. A; Saavedra, M. A; Salgado, G. R. 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. Biológicas, 45-52.

24. Esquivel, R. B. 2012. Espectrometría de Masas. Instituto de química UNAM, 1-3.

25. Estrada, L. E. Programa Universitario de Plantas Medicinales. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). <http://www.erickestrada.com/erickestrada.htm>. Consulta del 9 de octubre de 2014.
26. Estrada, E. 1986. Jardines Botánicos Comunitarios; plantas medicinales. *Revista Chapingo*, 10-11 (50-51).
27. Feria, R. I. 2007. Aplicación de la Biología Molecular en el Control de Calidad de los Fitomedicamentos. *Redalyc*, 49-57.
28. Fernández, S. M. R; Sylvie L. B. 2014. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) y Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I)
29. Figueroa, H. J. 2009. Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Revista Digital Universitaria*, 1-12.
30. Fischer, S. G; Lerman, L. S. 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1579–1583
31. Franco, J; Crossa, J; Ribout, J. M; Betran, J. 2001. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 103: 944-952
32. Garza, O. L. 2013. Confirmación de dexametasona y diclofenaco por LC-MS-SM como adulterantes en un producto herbolario. *Redalyc*, 498-504.
33. González-Stuart, A. E. 2010. Use of Medicinal Plants in Monterrey, México. *Not Sci Biol* 2 (4), 07-11.
34. Guillen, M. P. O; Sarmiento, B. G. I. 2012. Validación de las metódicas aplicadas a los procesos de selección, lavado, secado y almacenamiento para plantas medicinales a través de aplicación de técnicas oficiales basadas en la farmacopea de la organización mundial de la salud. Tesis. Universidad de Cuenca. Ecuador.
35. Gutiérrez, B. M. 2002. Separación de colorantes por cromatografía de capa fina. *Boletín Intexter*, 29-34.

36. Hao, D. C; Chen, S. L; Xiao, P. G; Peng Y. 2010. Authentication of medicinal plants by DNA-based markers and genomics. *Chinese Herbal Med.* 2010; 2:250–261.
37. Heubl, G. 2010. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Med.* 2010 Dec;76(17):1963-74. doi: 10.1055/s-0030-1250519. Epub 2010 Nov 5.
38. Jiménez, M. A. 2010. Plantas medicinales, opción de desarrollo económico de miles de mexicanos. Libro de la "Herbolaria Mexicana", 1-24.
39. Juárez, F. B. 2006. Diabetes mellitus y medicina tradicional. *CIENCIA*, 26-32.
40. Kiran, U; Salim, K; Khanda, J; Mirza, M; Ram, M. Z. 2010. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia* 81 (2010): 969–976.
41. Lucio, G. J. 2012. Aplicación de Métodos Quimiométricos para la caracterización y control de calidad de plantas medicinales. . Tesis Doctoral, 10-34.
42. Marinoff, M. A. 2006. Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad. *Farmacia, Facultad de Agroindustria, UNNE*, 1-4.
43. Miller, L. G; Hume, A; Harris, I. M. 2001. Adulteration: its various meanings. *Pharmacotherapy.* 21:770-1.
44. Mukherjee, P. K. 2008. Quality Control of Herbal Drugs an approach to evaluation of Botanicals. *Business horizontes, New Delhi* 2.
45. Mukherjee, P. W. 2002. Quality Control of Herbal Drugs: An Approach to evaluation of Botanicals. *Business Horizons Publishers, New Delhi, India.*
46. Muyzer, G; Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*73:127–141.
47. Nervi, L. L. 2007. Alma Ata y la Renovación de la Atención Primaria de la Salud. *Conferencias*, 1-5.
48. Newmaster, G. S; Meghan, G; Dhivya, S; Sathishkumar, R; Subramanyam R. 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine* 2013, 11:222 doi:10.1186/1741-7015-11-222.

49. Nuez, F. C. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Marcadores de ADN, 41-46.
50. OMS. 2000. Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios. Organización Mundial de la Salud, 1-45.
50. OMS. 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra, Suiza.
51. Garzón, M. L; James, G. A; Romero, A. 1999. La comercialización de medicamentos naturistas en la Ciudad de México. Journal of the Mexican Chemical Society, marzo-abril, 75-78.
52. OMS. 2005. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional, 2002-2005. Ginebra: Programa de medicina tradicional OMS.
53. Padilla, C. A; Diez, D. J. Martínez, G. E; Bárcena, R. J. A; García, A. C. 2002. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico. Bioquímica y Biología Molecular, 1-8.
54. Pérez, D. C. 2003. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR). Biología Molecular, 1-10.
55. Pérez-Guerrero, C; Herrera, M. D; Ortiz, R; Alvarez de Sotomayor, M; Fernández, M. A. 2001. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. J Ethnopharmacol. 2001 Aug;76(3):279-84.
56. Permanand, G; Mossialos, E; McKee, M. 2006. Regulating medicines in Europe: the European Medicines Agency, marketing authorisation, transparency and pharmacovigilance. Clin Med. Jan-Feb;6(1):87-90.
57. Petrovska, B. B. 2012. "Historical Review of Medicinal Plants' Usage." Pharmacognosy Reviews 6.11: 1–5. PMC. Web. 10 Aug. 2015.
58. Resende, C. S. 2008. Promoción de la salud, "Empowerment" y educación: una reflexión crítica como contribución a la reforma sanitaria. Scielo, 1-17.
59. Rodríguez, D. I. 2012. De enfermedades y remedios: La transmisión oral del uso doméstico de plantas con fines medicinales en Campeche, México. Apuntes, 62-71.
60. Rodríguez, S. J. 2012. Diabetes Mellitus Tipo 2. Ciencia, 1- 4.
61. Romero, G. A. 2002. Curso de métodos Moleculares. UNAM, 1-17.

62. Salazar y col., A. R. 2004. El consumo de productos herbolarios en Nuevo León. *Medicina Universitaria*, 248-254.
63. Sambrook, J; Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
64. Sanguinetti, C. J; Dias, N. E; Simpson, A. J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-919.
65. SEDEREC. 2012. Programa para la recuperación de la medicina tradicional y la herbolaria en la ciudad de México. *Gaceta Oficial del Distrito Federal*, 1-10.
66. Serna, S. S; Gutierrez, U. J. 2009. La herbolaria, como fuente de fármacos. *El Reino Vegetal, Farmacología y Terapéutica*, 46-51.
67. Serrato, D. A; Flores, R. LL; Aportela, C. J; Sierra-Palacios E. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. (Eds) Cornejo R. A; Serrato D. A; Rendón A. B; Rocha M. M. G. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) y Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I)
68. Shu, Q. Y; Forster, B. P; Nakagawa, H. 2012. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CAB International y FAO. Malta.
69. Sierra-Palacios E. 2005. *Cosntrucción de un cósmido para la expresión y clonación de genes fúngicos*. Tesis UAM-iztapalapa. México.
70. Torres, W. N. 2009. Control de calidad de fitofármacos. *El Reino Vegetal*, 17-23.
71. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana (http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html) (consultada 20-agosto-2015).
72. Velázquez, M. M. 2015. Caracterización fitoquímica, farmacológica de la semilla de la chía (*Salvia hispanica L*). Tesis licenciatura. UACM. México.
73. Verde, S. M. 2009. Avances en el uso de la herbolaria en el cáncer. *El Reino Vegetal Farmacología y Terapéutica*, 62-64.

74. Waksman, D. T. 2012. El Control de Calidad de Productos Herbolarios en la Salud Pública. Faspyn, 1-3.

75. Welsh, J; McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213–7218.

76. Williams, J. G. K; Kubelik, A. R; Livak, K. J; Rafalski, J. A; Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18:6531–6535.

ANEXOS

Anexo 1. Reactivos y equipos

Reactivos	Equipos
<ul style="list-style-type: none">- Kit de extracción de ADN Wizard (Promega)- DNA Genomic (Promega)- Agua inyectable (Pisa)- Agarose LE (Promega)- Colorante GelReed 10,000X (Biotium)- Orange G (Amresco)- dNTP's (Fermentas)- Primer RbcL-GC-F (IBT-UNAM)- Primer RbcL-R (IBT-UNAM)- Enzima Vent (5u/μl) (NE-Biolab)- MgCl (50mM) (NE-Biolab)- Tris base (Promega)- Acético glacial (Sigma)- EDTA (Amresco)- Acrilamida (Bio-Rad)- Bis-acrilamida (Bio rad)- Agua bidestilada (Bonatura)- Glicerol (Amresco)- Urea (Promega)- Formamida (Amresco)- Etanol 96% (Sigma)- Ácido acético (Sigma)- Nitrato de plata (Sigma)- Hidroborato de sodio (Sigma)- NaOH (Amresco)- Formaldehído (JT Baker)- TEMED (Amresco)- Persulfato de Amonio (Amresco)- Microtubos de 500 y 2000μL (Neptune)- Puntas de micropipeta 10, 200 y 1000μl (Neptune)	<ul style="list-style-type: none">- DCode Universal Mutation Detection (Bio-Rad)- Sistema formador de gradiente (Bio- Rad)- Bomba peristáltica (Bio-Rad)- Termociclador Maxygen (Axygen)- Vortex (Mixer) (Labnet)- Minicentrifuga (Labnet)- Fuente de poder (Labnet)- Horno de microondas (LG)- Cámara de electroforesis (Galileo Biocience)- Horno para secado (Felisa Horno)- Microcentrifuga (Thermo Scientific)- Termoblock (Labnet)- Fotodocumentador Multi Doc (UVP)- Congelador -20°C (Thermo Scientific)- Parrilla de agitación (Thermo Scientific)- Micropipetas P2, P20, P200 y P1000 (Labnet)

Anexo 2. Soluciones

a) Tampón 6x (Sambrook y Russell, 2001)

Reactivo	Cantidad
Orange G	2mg
Glicerol	4ml
ddH ₂ O	se aforó a 10ml

b) Tampón de electroforesis TAE 50X (Bio-Rad, 2012)

Reactivo	Cantidad
Tris base	242g
Ácido Acético glacial	57.1ml
EDTA 0.5M pH 8.0	100ml
ddH ₂ O	se aforó a 1000ml

c) Solución acrilamida/bis-acrilamida al 40% relación [37.5:1] (Bio-Rad, 2012)

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	39.93g
Bis-acrilamida	1.07g
Agua bidestilada	se aforó a 100ml

d) Soluciones desnaturalizantes (Bio-Rad, 2012)

Reactivo	Solución de 0%	Solución 100%
Acrilamida/ Bis al 40%	50ml	50ml
TAE 50X	2.5ml	2.5ml
Glicerol	5ml	5ml
Urea	-----	105.4g
Formamida	-----	100ml
ddH ₂ O	hasta 250ml	hasta 25ml

e) Solución de fijación Cairns 8X (Sanguinety y col., 1994)

Reactivo	Cantidad
Etanol 96%	200ml
Ácido acético	10ml
ddH₂O	40ml

f) Solución de fijación Cairns 1X (Sanguinety y col., 1994)

Reactivo	Cantidad
Solución Cairns 8X	50ml
ddH₂O	350ml

g) Solución de teñido de plata (Sanguinety y col., 1994)

Reactivo	Cantidad
Nitrato de plata	0.4g
Solución Cairns 1X	200ml

h) Solución de desarrollo (Sanguinety y col., 1994)

Reactivo	Cantidad
Hidrobórato de sodio NaBH₄	Lo que tome la punta de la espátula. aproximadamente 10 mg
NaOH 1.5 % (p/v)	250ml
Formaldehído	750 μ L

i) Persulfato de amonio al 10% (p/v) (Bio-Rad, 2012)

Reactivo	Cantidad
Persulfato de amonio	50mg
ddH₂O	aforar a 500 μ L