

Evaluación de la actividad biológica de extractos algales de *Aphanocapsa cf elachista* (West 1894) en modelos animales

Evaluation of the biological activity of the algal extracts from *Aphanocapsa cf elachista* (West 1894) in animal models

Linares-García A, ²Vargas-Solís RC, ¹Lozada-García MC, ²Pérez-Rodríguez R y ²Figuroa-Torres MG.

1 Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Depto. Sistemas Biológicos. Laboratorio de Farmacocinética. Calzada del Hueso No.1100. Col. Villa Quietud. México, 04960, D.F. Delegación. Coyoacán. Tel. 5483 7515

2 Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Depto. El Hombre y su Ambiente. Laboratorio de Ficológia y Fitofarmacología. Calzada del Hueso No.1100. Col. Villa Quietud. México, 04960, D.F. Del. Coyoacán. Tel. 5483 7000
Email: rvargas@correo.xoc.uam.mx

*Email responsable: rvargas@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

El objetivo de esta investigación consistió en determinar los efectos biológicos que presenta el alga *Aphanocapsa cf elachista* como hipoglucemiante y antiinflamatorio. Se obtuvieron extractos del alga, en tres disolventes orgánicos: hexano, diclorometano-metanol y uno acuoso. El estudio del efecto hipoglucemiante se realizó midiendo la cantidad de glucosa en sangre en ratones normoglucémicos a tiempos 120 y 240 min después de la aplicación de los extractos. Para el estudio de la actividad antiinflamatoria se utilizó el modelo del edema inducido con acetato de tetradecanoil forbol (TPA) en ratas Wistar, en tres etapas, con dosis de 20, 40 y 80 mg mL⁻¹ de los diversos extractos del alga. Entre los resultados obtenidos se encontró que el extracto de diclorometano mostró actividad hipoglucemiante favorable. En cuanto a la actividad antiinflamatoria, solo el extracto de diclorometano mostró actividad a dosis de 80 mg mL⁻¹. La efectividad hipoglucemiante y antiinflamatoria del extracto del alga *Aphanocapsa cf elachista* en el solvente diclorometano se debe probablemente a que contienen productos de carácter no polar que podrían ser responsables de los efectos farmacológicos. El extracto del alga en diclorometano puede considerarse una alternativa terapéutica para estos padecimientos.

Palabras clave: *Aphanocapsa cf elachista*, hipoglucemiante, antiinflamatorio, diclorometano.

ABSTRACT

The main goal of this study is to know the biological effects in the *Aphanocapsa elachista* algae as hypoglycemic and anti-inflammatory property. Three algae extracts dissolved in three different organic extracts: hexane, dichloromethane-methanol and aqueous. The of hypoglycemic effect study was done by measuring glucose blood quantity at normalglucemic mouses at 120 and 240 min after application of the extracts. To study anti-inflammatory activity was used a induced edema model with tetradenacoylphorbol acetate (TPA) in Wister's rats in three stages alga extracts doses of 20, 40 and 80mg mL⁻¹. The results show that dichloromethane extracts showed positive hypoglycemic activity. In case of anti-inflammatory activity, only the dichloromethane extract showed better results at 80 mg mL⁻¹ dosage. The effectiveness of hypoglycemic and anti-inflammatory effect of dichloromethane dissolved in dichloromethane-methanol from *Aphanocapsa elachista* algae is due to their non-polar products which could be responsible for pharmacological effects. The dichloromethane extract algae can be considered as an therapeutic alternative for these idleness.

Keywords: *Aphanocapsa e.*, Hypoglycemic, anti-inflammatory, dichloromethane extract

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo los remedios naturales derivados de las plantas medicinales fueron el único recurso del que disponían los antiguos médicos (Guevara 1989). En México, el uso de plantas medicinales está muy extendido, tanto en la población rural como en la urbana, llegando incluso a integrar este conocimiento a la terapéutica de muchas enfermedades prevalentes (Arévalo 1994).

Se ha observado que, por su composición química, las algas poseen propiedades farmacológicas, se pueden citar como ejemplo las que tienen actividad como antitumorales por su contenido en dideminas y las briostatinas (Muñoz 1992), otras que mejoran la circulación sanguínea por su contenido de laminina que es el compuesto activo que proviene de *Laminaria sp.*, o ulvalina aislada de *Monostrena nitidum* que tiene actividad hipocolesterolémica, compuestos fenólicos aislados del alga *Prophyra dentata* (Kaztowska 2010) y el compuesto algasol T₁₃ ambos usados como antiinflamatorio, existen otras sustancias aisladas de algas con distintas actividades biológicas, utilizadas para eliminar la seborrea, la caída del cabello o caspa, entre otras (Muñoz 1992). En la actualidad, se conocen miles de especies de algas, que en su mayoría no se han estudiado para conocer sus propiedades biológicas, a pesar de ello, solo se emplean para fines terapéuticos algunas cuantas.

Aphanocapsa cf *elachista* (del griego, Aphanes-oculta o invisible, y Kapsa- cápsula), es una cianobacteria, cianoprocarionta o alga verde-azul, que forma colonias gelatinosas, observables a simple vista, formadas por pequeñas células esféricas. Se distribuye en todo el mundo, siendo común en ambientes dulceacuícolas, encontrándose como epífita sobre plantas sumergidas. En México ha sido reportada en el Estado de México: en Tianguistengo, en la Laguna Victoria; en Puebla: en Xochiltepec, en la Laguna de San Felipe y en los márgenes de Tlaxcala. Estos organismos producen lipopolisacáridos (moléculas que contienen lípidos y azúcares) que pueden causar irritación a la piel y problemas gastrointestinales; sin embargo, a la fecha no se han encontrado reportes de efectos nocivos relacionados con la exposición a esta alga (Villegas et al. 1997).

Actualmente se emplean algunas algas, plantas y cortezas naturales como alternativas terapéuticas para combatir padecimientos que se presentan con mayor frecuencia en los seres humanos como la diabetes mellitus y las inflamaciones, debidas a la respuesta a varias enfermedades, como resultado de una falla en el sistema cutáneo debido a alguna enfermedad como la diabetes por ejemplo.

Se conoce que la inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos por organismos patógenos, siendo frecuentemente una respuesta reparadora. Cuando hay inflamación se produce en la piel enrojecimiento (eritema) por dilatación de los vasos sanguíneos, además de hinchazón (edema) por escape de líquido a los tejidos blandos y endurecimiento (induración) por acumulación de líquidos y células (Kumar et al. 2005). En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o incluso cáncer.

Otra enfermedad muy frecuente que hay que considerar en la actualidad es diabetes mellitus, la cual se caracteriza por la presencia de hiperglucemia, es decir, cuando se presenta un conjunto de trastornos metabólicos en los cuales la utilización de la glucosa está alterada. En el ser humano esta enfermedad tiene una alta incidencia (4 a 5%) en todo el mundo. Debido al alto índice con que se presenta la diabetes mellitus, existe una clara necesidad de fuentes alternativas como drogas hipoglucemiantes orales o parenterales y también de diferentes estrategias de terapia. Por siglos las plantas han sido usadas en la medicina folclórica para el tratamiento de la diabetes (Pérez 2008; Giner y Castillo 2003), especialmente en países del tercer mundo, como una fuente potencial para la obtención de fármacos antidiabéticos, con el problema que algunos de ellos producen efectos colaterales secundarios. Esto indica la importancia de los estudios fitoquímicos y farmacológicos para el aislamiento de nuevos productos naturales, con propiedades hipoglucemiantes (Sanabria 1983), más efectivos y que no produzcan efectos nocivos.

Para los estudios de la actividad antiinflamatoria, se utilizó acetato de tetradecanoil forbol (TPA), compuesto que produce edema y después de cuatro horas se observan los resultados.

Este compuesto cuando se le aplica a neutrófilos de conejo produce agregación celular, degranulación, incremento de consumo de oxígeno y un incremento en la cantidad de actina asociada con el citoesqueleto sin elevar el nivel de calcio intracelular libre (Sha'afi et al, 1983).

Debido a las propiedades farmacológicas que presentan algunas algas verde azules (Kumar 2010), se consideró importante probar la acción hipoglucemiante y antiinflamatoria del alga *Aphanocapsa elachista* mediante el uso de sus extractos orgánicos (hexánico, de diclorometano y metanol) y acuoso mediante modelos con animales para desarrollar propuestas para la elaboración de medicamentos a base de productos naturales.

MATERIAL Y METODOS

Elaboración de extractos orgánicos (hexano, dicloro y metanol) de *Aphanocapsa cf elachista*.

Para la elaboración del extracto hexánico se siguió la técnica propuesta por (Sarker et al. 2006) que consistió en pesar 133.5 g del alga *Aphanocapsa cf elachista* previamente secada y molida, misma que se colocó en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL. Posteriormente se agregó hexano hasta cubrir el polvo del alga por completo, hasta 1cm por encima de este. Se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se filtró por gravedad con un embudo cónico y un papel filtro. El producto se colectó en un matraz de bola de 250 mL con disolvente (hexano). El matraz se colocó en el rotavapor para eliminar el disolvente. El extracto se retiró del matraz de bola con un poco de disolvente (hexano) y se vertió en un frasco limpio y previamente pesado. Se realizaron dos extracciones más, sucesivas, con el alga siguiendo el mismo procedimiento con el fin de obtener la mayor cantidad de extracto hexánico del alga. Finalmente el rendimiento del extracto hexánico fue de 200 mg. Para la obtención de los extractos de diclorometano y metanol se usó la misma técnica, obteniendo como rendimiento 500 mg de extracto de diclorometano y 3.9 g de extracto metanólico (Lock 1994).

Elaboración de extracto acuoso de *Aphanocapsa cf elachista*.

Se pesaron 52.3 g de alga *Aphanocapsa cf elachista* previamente secada y molida y se colocaron en un vaso de precipitados de 1000 mL, se vertió agua hirviendo hasta cubrir el polvo y se dejó reposar durante 20 min, terminado este lapso, se filtró por gravedad con ayuda de un embudo cónico y un papel filtro. El filtrado se separó en un vaso de precipitados de 500 mL. Se realizaron dos extracciones más mediante el mismo método para tener un total de tres extracciones. Posteriormente el extracto se liofilizó colocando 35 mL en viales de 100 mL, poniéndolos dentro de un congelador a -70°C . Una vez congeladas las muestras se colocaron en un liofilizador LABCONCO (Freeze Dry System, Freezone 12), a una temperatura de -53°C y a un nivel 2 de vacío. Se dejó el tiempo necesario (aproximadamente 13 días) hasta que en los viales ya no quedó nada de hielo o líquido, solo el extracto. El rendimiento fue de 4.5 g.

Animales.

Se utilizaron ratones machos, producidas en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio-Bioterio (UPEAL-B) de la cepa CD-1, con un peso de 25-28 g, con condiciones controladas de iluminación, agua, alimento de Purina, con periodos de luz-oscuridad de 12:12 horas; temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$; humedad de 55 %; alimentación y agua ad libitum.

Estudio del efecto hipoglucemiante.

Se emplearon 25 ratones macho normoglucémicos de 25-30 g de peso. Se dividieron en grupos de cinco animales, un grupo para cada extracto de *Aphanocapsa cf elachista* (metanol, hexano, diclorometano y acuoso) y un grupo restante se consideró grupo control o de referencia. A cada ratón se le hizo una punción en la cola y se le determinó el nivel de glucosa a tiempo cero antes de administrar algún extracto. A cada grupo se administró el extracto correspondiente por vía oral con una dosis de 625 mg kg^{-1} de peso. Se dejó que transcurrieran dos horas. Después de este tiempo se volvió a puncionar la cola y se obtuvo la lectura de

glucosa en sangre. Se dejó que transcurrieran otras dos horas más y posteriormente se volvió a tomar otra muestra. Terminadas las tres muestras que es tiempo cero, dos y cuatro horas, se evaluaron los resultados para verificar el efecto glucémico por parte del alga *Aphanocapsa cf elachista* (Pérez 2009)

Estudio del efecto antiinflamatorio.

Este experimento se llevó a cabo mediante el modelo de edema inducido con TPA y se utilizó como compuesto de referencia en el primer experimento rymadil y para el segundo y tercero indometacina para una mejor respuesta control (Matiz 2011; Nom 1999). Los ratones se dividieron en grupos de cinco. Cada grupo corresponde a un extracto (hexánico, diclorometano y metanólico) y se puso otro grupo con rimadyl o indometacina, 1 mg 20 mL⁻¹ (medicamento de referencia) y el grupo solo tratado con TPA (Sigma). Los ratones se pesaron y colocaron en jaulas previamente etiquetadas. Se les administró pentobarbital sódico (3.5 mg Kg⁻¹ vía intraperitoneal) como anestesia. En la oreja derecha se aplicaron 10 µL de solución etanólica de TPA (0.25 mg mL⁻¹). Diez minutos después en la misma oreja se aplicaron 20 µL de solución metanólica de los extractos (20mg mL⁻¹). En la oreja izquierda solo se aplicaron los vehículos (20mg mL⁻¹ de metanol y 10 µL de etanol). El procedimiento anterior se hizo en forma tópica. Cuatro horas después los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas con la ayuda de un sacabocados. La diferencia en peso entre la muestra de la oreja derecha e izquierda representa el edema. El porcentaje de inhibición de edema para cada grupo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (C - E) / C \times 100$$

En donde:

C= edema promedio tratado con TPA

E = edema promedio de grupo tratado con TPA y con extracto de *Aphanocapsa cf elachista*.

RESULTADOS

El efecto hipoglucemiante de los extractos orgánico y acuoso del alga *A. cf elachista* se muestra en la Fig.1. Los extractos orgánicos de hexano y diclorometano presentaron una disminución considerable en los niveles de glucosa con respecto al grupo control. En el caso del hexano el nivel de glucosa disminuyó de 73.4 mg dL⁻¹ a 55 mg dL⁻¹ y en el caso de diclorometano de 60.2 mg dL⁻¹ a 34.8 mg dL⁻¹. Los extractos de metanol y acuoso fueron inactivos ya que los niveles de glucosa aumentaron en vez de disminuir, en el caso del metanol aumentó el nivel de glucosa de 64.6 a 70.2.

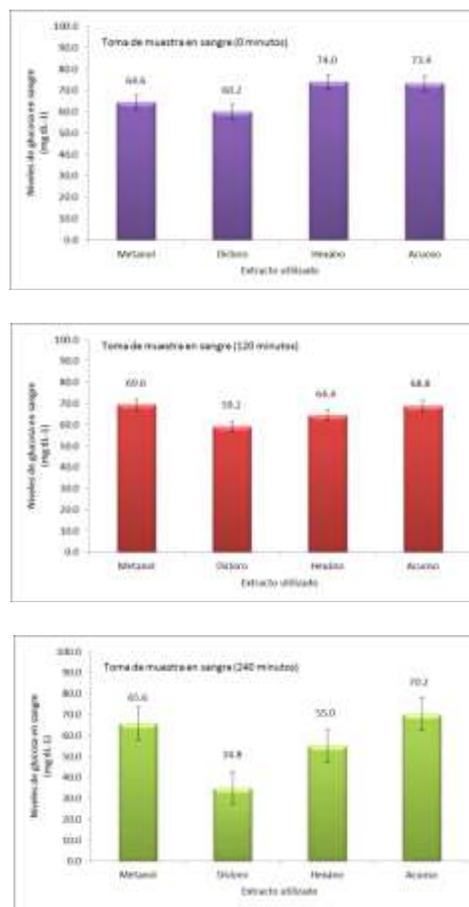


Fig. 1. Efecto hipoglucemiante del extracto de diclorometano de *Aphanocapsa cf elachista* en ratones normoglicémicos. P=0.02

Fig.1. Dichloromethane extracts hypoglycemic effect of *Aphanocapsa cf elachista* in normal glycemic mice. P=0.02

De acuerdo con el análisis estadístico ANDEVA se determinó que existe una diferencia significativa (con una $P=0.02$) de la actividad hipoglucemiante entre los diversos extractos de *Aphanocapsa cf elachista* a los 120 y 240 min. Además se calculó una prueba de τ , y se observó que la diferencia significativa proviene del extracto de diclorometano, lo cual determina la existencia de actividad hipoglucemiante para este extracto.

El efecto de los extractos orgánico y acuoso de *A. cf elachista* sobre el edema inducido por TPA en la primera etapa del estudio antiinflamatorio se presenta en la Fig.2, donde se destacan los resultados de los extractos de diclorometano, hexano y Rimadyl (medicamento referencia) que alcanzaron niveles de inhibición de la inflamación del 50.46, 113.09 y 73.38% respectivamente. Los extractos de diclorometano y hexano del alga así como el grupo tratado con el medicamento de referencia muestran una reducción significativa en el edema producido por el agente irritante comparado con en el grupo control, lo que constituye la evidencia preliminar de su actividad antiinflamatoria. De forma opuesta, el extracto metanólico y acuoso de *A. cf elachista* son inactivos en la primer etapa de este estudio.



Fig. 2. Efecto de los extractos orgánicos y acuoso a dosis de 20 mg Kg^{-1} de peso de *A. elachista* sobre el edema inducido con TPA.

Fig. 2. Organic extracts and aqueous effect of 20 mg Kg^{-1} body weight dose of *A. elachista* on TPA-induced edema.

El análisis estadístico muestra que los extractos de diclorometano y hexano, a pesar de tener altos porcentajes de inhibición de la inflamación, no son

significativos, para poder aceptar el efecto antiinflamatorio, mostrando que no existen diferencias significativas ($P<0.05$) al comparar los datos de cada extracto con el grupo control (tratado únicamente con TPA) en una prueba de τ de student.

El efecto de los extractos orgánicos y acuoso de *A. cf elachista* a dosis 40 mg mL^{-1} sobre el edema inducido por TPA (Fig. 3), en donde se observa que destacan los resultados de los extractos de diclorometano y acuoso del alga y de la indometacina (medicamento de referencia) los cuales alcanzaron niveles de inhibición de la inflamación del 54.22, 52.82 y 44.96 respectivamente. El extracto metanólico presentó una inhibición de 41.52, inferior que el presentado por el medicamento de referencia. Los extractos de diclorometano, acuoso y metanol, así como el grupo tratado con el medicamento de referencia, en este caso indometacina, muestran una reducción significativa en el edema producido por el agente irritante en el grupo control, lo que constituye la evidencia preliminar de su actividad antiinflamatoria. De forma contraria, el extracto hexánico, que en la etapa anterior tuvo un elevado porcentaje de inhibición, en este caso presentó



Fig. 3. Efecto sobre la inflamación inducida por TPA a ratones machos cepa CD-1, de los diversos grupos administrados con extractos a una dosis de 40 mg Kg^{-1} de peso, de *Aphanocapsa cf elachista*.

Fig. 3. Effect on TPA-inflammatory induced male mice CD-1 strain, from different groups extract supplied with 40 mg Kg^{-1} body weight dose of *Aphanocapsa cf elachista*.

resultados negativos, lo cual muestra su inactividad.

El análisis estadístico ANDEVA muestra que a pesar de tener altos porcentajes de inhibición de la

inflamación por parte de los extractos de diclorometano y acuoso, éstos no son significativos para poder aceptar el efecto antiinflamatorio de dichos extractos, debido a que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$) y comparando los datos de cada extracto con el grupo control (tratado únicamente con el agente de inductor del edema TPA), con una prueba de τ de Student.

Para confirmar la actividad del extracto de diclorometano y metanólico se probó una tercera dosis de 80 mg mL^{-1} e indometacina sobre el edema inducido por TPA, en la Fig.4, se presentan los valores los obtenidos en este experimento. El extracto de diclorometano alcanzó una inhibición de la inflamación del 70.66 %, mientras que el extracto metanólico, no mostró actividad.

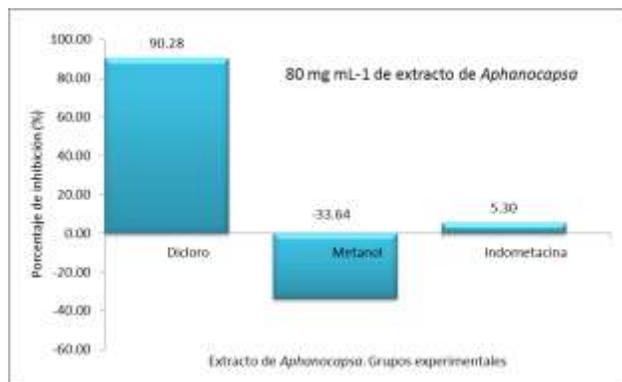


Fig. 4. Actividad antiinflamatoria del extracto de diclorometano sobre el edema inducido a ratones machos cepa CD-1 de *Aphanocapsa elachista*. $P < 0.01$

Fig.4. Inflammatory activity of dichlorometane extract on induced edema male mice CD-1 strain of *Aphanocapsa elachista*. $P < 0.01$

Con base en estos resultados, se aplicó un análisis estadístico de τ de Student para evaluar específicamente los datos obtenidos de los diferentes grupos tratados con los extractos de *Aphanocapsa cf elachista* comparados con el grupo control. El resultado fue significativo para el extracto de diclorometano ($P = 0.01$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para el inicio de esta investigación se revisó la literatura y se encontró que no había estudios sobre la actividad biológicas del alga *Aphanocapsa cf*

elachista, por lo que se decidió iniciar con la investigación sobre el efecto hipolucemiante del alga, para ello se utilizó un modelo experimental que ha sido usado por algunos investigadores para evaluar dicha actividad con extractos derivado de plantas (Aybar et al. 2001, Vats et al. 2002, Alarcón-Aguilar et al. 2000). Los resultados preliminares de esta investigación muestran que a la dosis probada en ratones normoglucémicos, los extractos acuoso, metanólico y hexánico no presentan actividad a diferencia del extracto de diclorometano que al tiempo de 240 min disminuyó significativamente el nivel de glucosa, lo que sugiere un efecto hipoglucemiante, por lo que sería importante continuar con la experimentación para conocer el mecanismo de acción del extracto y determinar si es capaz de estimular la liberación de insulina por el páncreas a través del bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP que hay en la membrana de las células β del páncreas, mecanismo que provoca la despolarización, entrada de calcio y liberación de insulina; monitoreando las concentraciones de ésta en el animal. Otro efecto a investigar, es que el extracto sea eficiente para mantener los niveles de glucemia en el organismo a través de la utilización periférica de la glucosa, al aumentar la captación de glucosa y disminuir la gluconeogénesis (Taylos y Reide, 1999).

Por otro lado es necesario continuar con este estudio para fraccionar el extracto y purificar e identificar los compuestos activos y conocer su mecanismo de acción.

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación a la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos y acuoso del alga *A. cf elachista*, solo el extracto de diclorometano a una dosis de 80 mg kg^{-1} de peso fue capaz de disminuir significativamente el edema inducido por el TPA a las 4 horas, por lo que se observó un efecto antiinflamatorio a diferencia de los otros extractos que no mostraron ningún efecto a las dosis probadas (Chen et al. 2004, Kupeli et al. 2007, Yeon 2009, Gorzalczy et al. 2011, Quaiyoom et al. 2012). Por lo que se propone que el posible mecanismo de acción del extracto de diclorometano lo ejerza a través de la inhibición de alguna isozimas. Existen dos isozimas de ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, estas tienen secuencias semejantes en un 65 %, pero

funciones diferentes, la CO-2 de las prostaglandinas regulan la inflamación, el dolor y la fiebre, esto se concluye debido a que la inducción del edema es por la liberación de prostaglandinas (Menendez et al. 2010). Por lo que es importante aislar sustancias más eficaces, que inhiban específicamente a la COX-2, y que no presenten efectos adversos a largo plazo, por lo que es trascendental el estudio de productos naturales derivados de algas y su mecanismo de acción, para un aprovechamiento sustentable.

Por lo que se puede concluir que el extracto de diclorometano tiene efectos tanto antiinflamatorios como hipoglucémicos y que los compuestos responsables de esta actividad son no polares.

Perspectivas.

Este estudio podría proporcionar una base para el potencial uso de esta alga, debido a los resultados obtenidos como son los efectos hipoglucemiantes y antiinflamatorio, lo cual podría contribuir al desarrollo nuevos fitomedicamentos efectivos y de bajo costo para dichos padecimientos y además que no produzcan efectos colaterales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Roberto T. Pérez R. quien proporcionó el material biológico para el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón-Aguilar FJ, M Jiménez-Estrada, R Reyes-Chilpa y RR Román. 2000. Hypoglycemic effect of extract and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 21-27.

Arévalo G. 1994. Las plantas medicinales y su beneficio en la Salud. Lima. Aidesep (1e) 450 p.

Aybar MJ, RAN Sanchez, A Grau y SS Sánchez. 2001. Hypoglycemic effect of water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74:125-132.

Chen RF, YC Shen, HS Huangm, JF Liao y CF Chen. 2004. Evaluation of anti-inflammatory and cytotoxic effects of anthraquinones and anthracenes derivatives in human leucocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology (England)* 56: 915-919.

Giner LE y GE Castillo. 2003. Fitoterapia y Diabetes. *Revista de Fitoterapia* (3):113-122.

Gozalczany S, P López, C Acevedo y G Ferraro. 2011. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 994-998.

Guevara L. 1989. Plantas medicinales. San Bartolomé de las Casas, Centro de estudios regionales andinos. Cusco. 19-22 p.

Herrera C, MP García-Barrantes, F Binns y M Vargas. 2011. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Witheringia solanacea* in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats. *J. Ethnopharmacology* 133: 907-910.

Horton-Szar D y M Dominiczak. 2010. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Ed. Elsevier Mosby. 237 p.

Indaberea JJ. 2006. Caso clínico de *Diabetes mellitus*. Facultad de Medicina. UNAM. 54p.

Kaztowska K, T Hsu, CH Chia-Chung, Y Wen-Chin, T Guo-Jane. 2010. Anti-inflammatory properties of phenolic compound and crude extract from *Porphyra dentate*. *Journal of Ethnopharmacology* 128(2): 123-130.

Kumar SR, N Thajuddin y C Venkateswari. 2010. Antibacterial activity of Cyanolichen and symbiotic cyanobacteria against some selected microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* 4(13): 1408-1411.

Kumar V, AK Abbas, N Fausto. 2005. Patología estructural y funcional. Ed. Elsevier. España. 48-81 p.

Kupeli E, A Tosun, E Yesilada. 2007. Assesment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Daphne pontica* L. (Thymelaeaceae) *Journal of Ethnopharmacology* 113: 332-337.

Lamela M, J Anca, R Villar, J Otero y JM Calleja. 1989. Hypoglycemic activity of seaweed extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 27: 35-43.

Lock O. 1994. Investigación fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales. PUCP (2 ed) Lima-Perú. 42-45.

Matiz GE, LA Franco y J Rincón. 2011. Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L (Swartz). *Salud UIS* 43(3): 281-287.

Menendez R, MD Fernández y N García. 2010. Las algas marina como fuente de nuevos agentes antiinflamatorios. *Medio Ambiente y Desarrollo. Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente* 10: 1683-1692.

Muñoz A, A López, F Cházaro, Y Gamallo, A Otero, M Patiño, C Reguera, V Sabin y E. Vecino. 1992. Drogas del Mar. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Microbiología y Parasitología 250 p.

- Nelson LD y MM Cox. 2001. Lehninger. Principios de Bioquímica Ed. Omega. España. 781-788 pp.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO- 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México.
- Pérez GRM, SR Vargas, F Mota, MA José y GS Hernández. 2008. Hypoglycemic activity of aqueous extract of *Oscillatoria limnetica*, *Blennothrix ganeshii*, *Hydrodictyon reticulatum* and *Microcoelus lacustris* in normal and alloxan induced diabetic mice. *Journal and Complementary and Integrative Medicine* 5(1):1-10.
- Pérez RM, R Vargas, E García y Y Gallardo. 2009. Hypoglycemic activity of constituents from *Asianthus viminalis* in normal and Streptotocin induced diabetic mice. *Journal Natural Medicine* 63: 393-401.
- Quaiyoom A, R Khan, W Qamar, A Lateef, F Ali y M Tahir. 2012. Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13- (TPA)-induced NF-kB and COX-2 expression in mouse skin: abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and pro-inflammatory cytokine production. *Food and Chemical toxicology* 50: 1175-183.
- Reyes GMG, ST Izquierdo y TF García. 2006. Inflamación. Universidad Autónoma Metropolitana-X. 131 p.
- Rosenberg HF y JJ Galin. 1996. Inflammation. En Paul WE, *Fundamental immunology*. 4th ed. Ed. Lippincott Williams y Wilkins. 223-230 p.
- Sanabria G. 1983. Análisis fitoquímico preliminary. Bogota. Universidad Nacional. 113 p.
- Sarker SD, Z Latif, AI Gray . 2006. *Natural Products Isolation* 2a. ed. Ed. Human Press. EUA. 250p.
- Sha'afi RI, JR White, TF Molski, JS Hefcyk, M Volpi, PH Naccache y MB Feinstein. 1983. Phorbol-12-mysistate-13-acetate activate rabbits neutrophils without an apparent rise in the level of intracellular free calcium 114(2): 638-645.
- Silverthorn UD, WC Ober, CW Garrison, AC Silverthorn y BR Johnson. 2008. *Fisiología Humana*. 4^a ed. Ed. Panamericana. México. 185-190.
- Taylor M y P Reide. 1999. *Lo esencial de farmacología*. Ed. Harcourt. España. 240 p.
- Vats V, KK Grover y SS Rathi. 2002. Evaluation of anti-hyperglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 95-100.
- Villegas LF, ID Fernandez, H Maldonado, R Torres, A Zavaleta, A Vaisberg. 1997. Evaluation of the woundhealing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. *Journal of Ethnopharmacology* 193-200.
- Yeon LD, G Choi, T Yoon, Sook CM, Kil CB y Kyoung KH. 2009. Anti-inflammatory activity of *Chrysantemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J. Ethnopharmacology* 123: 149-154.
- Young JM y LM De Young . 1989 *Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agent in Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*. Spector J. y Back N.(eds) New York, EUA. 215-231 p.