

EFFECTO ANTIHIPERGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE RUDA (*Ruta graveolens*) EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS HIPERGLICÉMICAS

Antihyperglycaemic Effect of the Rue (*Ruta graveolens*) Methanol Extract in an Experimental Model of Hyperglycemic Rats

Manuel A. Meléndez J^{*,1} y Sonia M. Alvarado-Rico^{**}

**Pregrado de Ciencias Veterinarias. **Cátedra de Histología y Embriología.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela Apartado 4563,
Maracay 2101A, estado Aragua, Venezuela.*

Correo-E:alejandro.ji@hotmail.com

Recibido: 27/04/11 - Aprobado: 07/12/11

RESUMEN

La ruda (*Ruta graveolens*) es una hierba perteneciente a la familia Rutaceae, caracterizada por presentar diversas propiedades medicinales. Se ha reportado su uso como parte de la terapéutica en la Diabetes mellitus, basada en el uso de productos naturales. Se condujo una investigación con el objetivo de evaluar el efecto antihiperglucemiante de esta especie vegetal. Se emplearon 70 ratas machos a las cuales se les administró vía oral, dosis crecientes del extracto metanólico de *Ruta graveolens* entre 0,5 y 2 g/kg. Se incluyó un control positivo, usando glibenclamida® (500µg/kg) como agente hipoglucemiante. Se determinó la concentración de glucosa en plasma en muestras seriadas tomadas de la cola a través del método de la glucosa oxidasa-peroxidasa. Se empleó jeringas de polipropileno de alta densidad y aguja de colecta simple, de uso veterinario. El extracto metanólico disminuyó la concentración de glucosa sanguínea a la dosis máxima evaluada 2,0 g/kg (<100 mg/dL). Así mismo, se identificó mediante espectrofotometría ultravioleta, los metabolitos secundarios: rutina y quercetina, los cuales pudieran contribuir a la acción hipoglucemiante. Los resultados sugieren que el extracto metanólico de la *Ruta graveolens* es capaz de reducir la concentración de glucosa en plasma de

ABSTRACT

Rue (*Ruta graveolens*) is an herb belonging to the Rutaceae family, characterized by various medicinal properties. Its consumption has been reported as part of therapy in diabetes mellitus, based on the use of natural products. We conducted an investigation was conducted to evaluate the antihyperglycaemic effects of this plant species. A total of 70 male rats were used which were administered orally, increasing doses of methanol extract of *Ruta graveolens* between 0.5 and 2 g/kg. It included a positive control, using glibenclamide® (500µg/kg) as a hypoglycemic agent. It was later determined the plasma concentration of glucose in serial samples taken from the tail carrying out the method of glucose oxidase-peroxidase and using polypropylene syringes and needles, high-density collection simple, veterinary. The methanolic extract reduced the blood glucose concentration to the highest dose tested (2.0 g/kg <100mg/dL). Also, were identified by UV spectrophotometer secondary metabolites: routine and quercetin, which could contribute to the hypoglycemic action. The results suggest that the extract methanol of *Ruta graveolens* is able to reduce plasma glucose concentration in hyperglycemic rats experimentally, which supports its potential use as an alternative to

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

ratas hiperglicémicas en forma experimental, lo cual soporta su potencial uso como una alternativa de la medicina tradicional; sin embargo, deben realizarse más estudios para estimar su potencial toxicológico a dosis hipoglicemiantes.

(Palabras clave: Extractos, *Ruta graveolens*, experimentación, rata, azúcar en sangre, plantas medicinales, hiperglucemia)

traditional medicine, however, more studies should be performed to estimate its toxicological potential at hypoglycemic dose.

(Key words: Extracts, *Ruta graveolens*, experimentation, rats, blood glucose, drug plants, hyperglycaemia)

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que, en el mundo, de cada 10 personas siete padecen de *Diabetes mellitus* y que en el año 2004, la mortalidad a causa de esta enfermedad ascendió a 3,4 millones de personas (Figuroa *et al.*, 2009). La hiperglucemia es un signo común, tanto de la *Diabetes mellitus* tipo I como de la tipo II. Adicionalmente, se observa alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos, proteínas y un riesgo incrementado de las complicaciones vasculares. La diabetes es precedida por el incremento en los niveles de glucosa sanguínea, por tal razón, desde hace muchos años se han fabricado medicamentos capaces de mantener la concentración de glucosa en sangre dentro de los niveles normales (Moller, 2001; Oliveira *et al.*, 2008), entre ellos glibenclamida (O'Sullivan y Cashman, 1970) y metformina (Knowler *et al.*, 2007). No obstante, se han reportado ciertos efectos adversos (Wongpaitoon *et al.*, 1981; Salpeter *et al.*, 2003; Funke y Melzig, 2006; Figuroa *et al.*, 2009).

Para el año 2006, la OMS reportó que los gastos en salud por habitante ascendían a 396 dólares, de los cuales el 45% correspondían a medicamentos para el control de diabetes (Figuroa *et al.*, 2009). Atendiendo al alto costo del tratamiento, los pacientes recurren a la terapéutica natural como una alternativa menos costosa, aunado a la teoría de que los fitofármacos cuentan con menos propiedades citotóxicas que algunos medicamentos comerciales (Rates, 2001);

sin embargo, estos productos requieren de evaluación científica y deben ser empleados con cautela (Rizzo, 2000). Asimismo, se sostiene que el consumo de los extractos metanólico y acuoso de *Ruta graveolens* además de sus efectos emenagogo, antihelmíntico y antirreumático (Hnatyszyn *et al.*, 1974; Arenas y Savitry, 1994; Chávez *et al.*, 2003) y antihipertensivo (Berdonces, 1998), también, se ha reportado su efecto hipoglicemiante (Figuroa *et al.*, 2009), aunque existen datos que refieren su acción abortiva (Agra *et al.*, 2002). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antihiper glucemiante de la infusión oral del extracto metanólico de la *Ruta graveolens* en un modelo experimental de ratas hiperglicémicas, así como determinar la presencia de ciertos flavonoides en esta especie vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra vegetal

La ruda (*Ruta graveolens*) fue adquirida en el Mercado Principal de Maracay, ubicado en Maracay, estado Aragua, Venezuela. Se clasificaron muestras vegetales como hojas y tallos, ambos frescos, empleando la base de datos contenida en el Herbario "Víctor M. Badillo" del Instituto de Botánica Agrícola, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Animales experimentales

Los protocolos aplicados se diseñaron siguiendo las guías de buenas prácticas de manejo y empleo

de animales de laboratorio (Consejo Canadiense de Protección Internacional de los Animales, 1998; AVECAL, 2008). Se emplearon 70 ratas machos correspondientes a la cepa C57BL/6 o Black 6, con pesos comprendidos entre 250 y 350 g. Previo a la práctica experimental, se les aseguró una temperatura entre 21 – 22 °C, en condiciones de ciclo claro/oscuro de 12 h (Figuroa *et al.*, 2009), y se les suministró una dieta comercial granulada (Protinal®) e ingesta de agua *ad libitum*.

Preparación del extracto metanólico

El extracto de *Ruta graveolens* fue preparado con un equipo de extracción sólido-líquido, tipo Soxhlet (PX3840-S Científica Velaquim, C.A, México). Las hojas fueron secadas a 80°C, en estufa horno incubadora para laboratorio serie ov19200 (Thermolyne de Cienytec, Colombia). La extracción se realizó con 40 g y 300 mL de metanol al 70% por 12 h. Seguidamente, se procedió a disminuir el volumen de la solución por un rotavapor (Yamato análogo, TSRE300AW, Reactivos y Equipo S.A. de CV, México). El contenido resultante en gramos fue pesado en una balanza analítica (Shimadzu de fase incorporada, España). El producto de la extracción metanólica se reconstituyó en una solución con cloroformo: agua (v/v, 4:1). El derivado de la etapa orgánica se comprimió a presión fluida y la composición se restableció con etanol al 70% (Hawthorne *et al.*, 2000).

Espectros flavonados

Se realizaron evaluaciones de los flavonoides encontrados en la especie vegetal (Khazanie, 1995) empleando un espectrofotómetro de ultravioleta UV-Visible UVmini-1240 (Shimadzu), con diferenciaciones de onda para cada flavonoide entre 200 a 500 nm.

Inducción de la diabetes y cuantificación de la glucosa in vivo

A las ratas se les administró a través de la vena coccígea, una solución de Alloxan monohidratado al 10%, en dosis única de 160 mg/kg de peso animal (Fleitas *et al.*, 2000), durante 5 d. Se determinó la concentración de glucosa en sangre, con el objeto de diagnosticar hiperglucemia, cuando la concentración de glucosa sanguínea fuese >180 mg/dL. Se realizó seguimiento a las concentraciones de glucosa

sanguínea pre y post –tratamiento cada 24 h durante 25 d. La toma de muestras se realizó a nivel de la vena lateral de la cola y se procesó con bandas reactivas para análisis con glucómetro *Optium Xceed* (Laboratorio Abbott, división Abbott Diabetes Care, España; Yarto, 2009).

Protocolo experimental

Los animales se dividieron en siete grupos (Tabla 2), a los cuales se les administró el extracto metanólico de *Ruta graveolens* a través de una sonda gástrica en dosis crecientes entre 0,5 g/kg a 2,0 g/kg, diluidos en 1 mL de agua destilada, cada 24 h durante 25 d, siguiendo el protocolo aplicado por Figuroa *et al.* (2009) para otras especies vegetales con propiedad hipoglicemiante. También, se mantuvo un grupo control positivo, al cual se le causó hiperglucemia empleando el método descrito por Fleitas *et al.*, 2000 y un control negativo, al cual se le administró agua destilada vía oral. Finalmente, se diseñó un grupo experimental, al cual se le administró 500µg de glibenclamida®, por vía oral durante 25 d, cada 24 h, como un control intraensayo para evaluar la sensibilidad de los métodos aplicados para determinar la reducción en las concentraciones de glucosa sanguínea (Figuroa *et al.*, 2009).

Determinación de glucosa en sangre

Para cuantificar la concentración de glucosa en sangre a través del método de la glucosa oxidasa-peroxidasa, se extrajo sangre de la vena lateral de la cola (Yarto, 2009), empleando jeringas estériles de polipropileno de alta densidad de 80 USP con aguja de colecta simple siliconada, 20G x 15” 367215, (Laboratorios *Diagnostic System*, Buenos Aires, Argentina). Este procedimiento se repitió diariamente durante 25 d, después de la administración de los preparados. Posteriormente, 1 mL de sangre se mezcló con una gota de heparina como anticoagulante en un tubo Eppendorf. Luego, se depositó en un tubo de vidrio de 13 x 75 mm, con tapa de silicona normal hemorrepeleante (Laboratorios *Diagnostic System*, Buenos Aires, Argentina), que contenía 0,46 mL de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). La sangre se mezcló y centrifugó a 1500 g durante 10 min, empleando una centrifuga Unicen 21 (modelo CE-126, *Labopolis Instruments*, Barcelona, España), donde se mezclaron 10 µL de sangre con 2mL del reactivo de trabajo (reactivo 4-aminofenazona/ enzimas

+ reactivo fenol [solución de fenol 5 mmol/L en buffer de fosfato 100 mmol/L, pH= 7,0]), según procedimiento descrito por Hnatyszyn *et al.* (1974) y Singh *et al.* (2007). La solución obtenida se mezcló hasta homogenizar y se incubó durante 20 min a 37°C. Finalmente, se realizó lectura de la absorbancia formada en un espectrofotómetro de rayos ultravioleta UV-Visible UVmini-1240, (Shimadzu) a 450 nm (Lott y Turner, 1975). La concentración de glucosa se calculó mediante una solución estándar de glucosa (Singh *et al.*, 2007).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza, incluyendo el tratamiento como fuente de variación expresando los valores como media ± el error estándar de la media. Se aplicó la prueba de “t” de Student en donde se encontraron diferencias significativas (p<0,05). El análisis estadístico de los datos obtenidos e interpretación de las diferencias para datos pareados existentes se realizaron empleando el paquete estadístico del programa IBM SPSS Statistics 19,0 de ambiente Windows (Salkin y Akey, 2001).

RESULTADOS

Análisis de los espectros flavonados

El análisis por espectrofotometría de ultravioleta de los flavonoides estimados en este estudio demostró variaciones de onda comprendidas entre 245 a 489 nm para cada flavonoides (Tabla 1).

Cuantificación de glucosa

Los valores de la concentración de glucosa sanguínea de las ratas diabéticas sin tratamiento (Control 1), las cuales fueron estimadas entre 450 a 520 mg/dL ± 2,00 en un lapso de 25 d. Además, la administración de 500µg/kg glibenclamida® (Grupo 1) produjo una significativa disminución (p=0,05) en la glucosa sanguínea (519 a 115-112 mg/dL ±

4,03) como puede observarse en las Figuras 1, 2 y 3.

Los datos presentados en la Figuras 1, 2 y 3 y Tabla 3 y 4 demuestran que las concentraciones de glucosa sanguínea de las ratas tratadas con el extracto metanólico de *Ruta graveolens*, durante 25 d y a dosis crecientes entre 0,5 a 2,0 g/kg, presentaron una disminución progresiva de la glucosa sanguínea.

DISCUSIÓN

Los resultados referidos a la cuantificación de glucosa sanguínea post-administración de *Ruta graveolens* en ratas hiperglicémicas, permiten apreciar que el extracto metanólico de esta especie vegetal disminuye las concentraciones de glucosa sanguínea, análogo a lo reportado para otras especies como *Citrus* y *Cndoscolus* (Figuroa *et al.*, 2009) y la *Bauhinia megalandra* (González y Motta, 2010).

El extracto de *Ruta graveolens* en una posología de 2,0 g/kg, ejerció un efecto antihiperglucemiante similar a la actividad central de la glibenclamida® (Fármaco control) en una dosis de 500 µg/kg, demostrando así que su acción farmacológica se lleva a cabo a dosis bajas, aunque se ha considerado su efecto toxicológico y abortivo, como lo demostró Agra *et al.* (2002) tras referir esta especie vegetal como responsable del desprendimiento embrionario.

Posiblemente, la disminución de glucosa en sangre se deba a los constituyentes químicos como rutina y quercitina (Usandizaga, 2000; Melito *et al.*,

Tabla 1. Análisis espectrofotométrico de la especie vegetal *Ruta graveolens*

Flavonoide	λ_{Max} (e)
Rutina	220
Quercetina	380

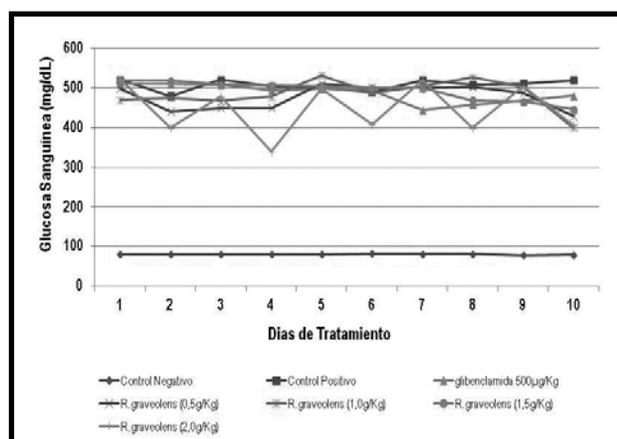


Figura 1. Representación gráfica de las concentraciones de glucosa sanguínea de los grupos experimentales, medidas desde el día 1 al 10 cada 24 h post-administración del fármaco control (glibenclamida®) y las dosis crecientes (0,5g/kg y 2,0g/kg) del extracto metanólico de *Ruta graveolens*

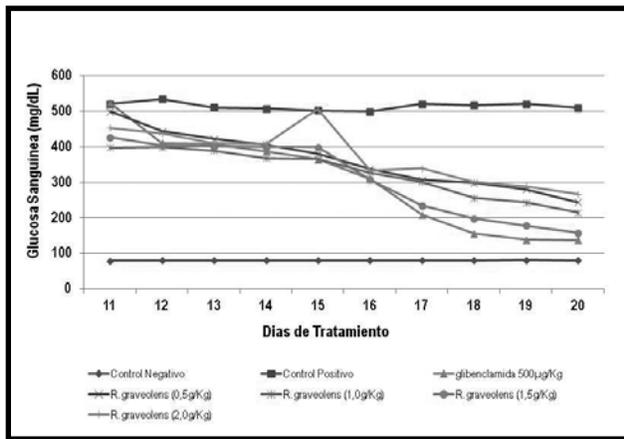


Figura 2. Representación gráfica de las concentraciones de glucosa sanguínea de los grupos experimentales, medidas desde el día 11 al 20 cada 24 h post-administración del fármaco control (glibenclamida®) y de las dosis crecientes (0,5g/kg y 2,0g/kg) del extracto metanólico de *Ruta graveolens*

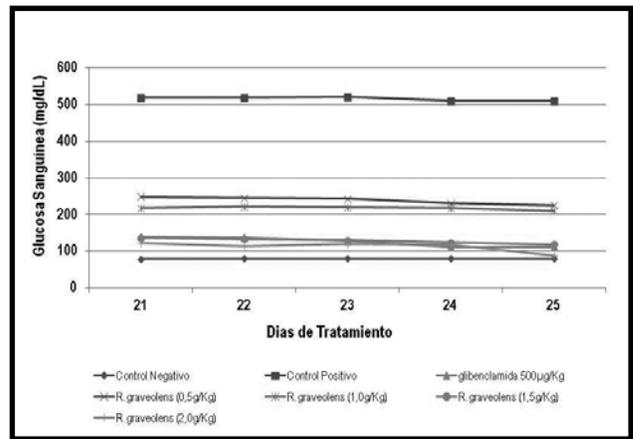


Figura 3. Representación gráfica de las concentraciones de glucosa sanguínea de los grupos experimentales, medidas desde el día 21 al 25 cada 24 h post-administración del fármaco control (glibenclamida®) y de las dosis crecientes (0,5g/kg y 2,0g/kg) del extracto metanólico de *Ruta graveolens*

Tabla 2. Distribución de la población en estudio

Grupo	Extracto – Fármaco	Dosis
Ratas controles (Control negativo)	Solución salina	1 mL
Ratas hiperglucémicas (Control positivo)	Solución salina	1 mL
Grupo		
I	glibenclamida	500 µg/kg
II	<i>Ruta graveolens</i>	0,5 g/ kg
III	<i>Ruta graveolens</i>	1,0 g/ kg
IV	<i>Ruta graveolens</i>	1,5 g/ kg
V	<i>Ruta graveolens</i>	2,0 g/ kg

Tabla 3. Valores del peso (g) y concentración de glucosa sanguínea (mg/dL) al día 25, tras la administración del fármaco control glibenclamida® y el extracto metanólico de *Ruta graveolens*

Grupos Experimentales	Peso (g)*	Glucosa (mg/dL)*
Control Negativo	220 ± 2,03	80 ± 7,02
Control Positivo	227 ± 7,05	510 ± 2,00
Hiperglicémicas + Glibenclamida (500 µg/kg)	222 ± 8,00	112 ± 4,03
Hiperglicémicas + <i>Ruta graveolens</i> (0,5 g/kg)	222 ± 9,02	225 ± 6,05
Hiperglicémicas + <i>Ruta graveolens</i> (1,0 g/kg)	239 ± 7,36	210 ± 4,32
Hiperglicémicas + <i>Ruta graveolens</i> (1,5 g/kg)	329 ± 5,44	118 ± 9,04
Hiperglicémicas + <i>Ruta graveolens</i> (2,0 g/kg)	305 ± 6,34	89 ± 8,24

Tabla 4. Concentración de la glucosa sanguínea (mg/dL) tras la administración diaria del fármaco control glibenclamida® y el extracto metanólico de *Ruta graveolens* a dosis crecientes entre 0,5g/kg y 2,0g/kg

	CN	CP	glibenclamida 500 µg/kg	<i>R.graveolens</i> (0,5 g/kg)	<i>R.graveolens</i> (1,0 g/kg)	<i>R.graveolens</i> (1,5 g/kg)	<i>R.graveolens</i> (2,0 g/kg)
1	80	520	510	498	469	519	520
2	80	479	510	440	474	518	399
3	80	520	507	449	467	507	479
4	80	503	494	449	478	505	339
5	80	499	498	510	532	503	498
6	82	489	493	500	487	499	407
7	81	519	444	499	504	499	519
8	81	507	457	502	527	468	399
9	78	511	467	487	502	465	503
10	79	519	480	428	400	446	406
11	79	520	523	499	398	426	453
12	80	534	410	444	399	404	438
13	80	511	407	422	389	401	410
14	80	507	387	406	368	399	408
15	80	502	365	379	365	399	505
16	80	499	309	337	327	308	333
17	80	520	209	307	302	235	339
18	80	517	156	299	256	198	301
19	81	520	139	280	243	178	289
20	80	510	138	244	215	158	267
21	79	518	140	248	217	137	122
22	80	518	138	245	222	133	114
23	80	520	128	243	220	130	120
24	80	510	112	230	218	124	118
25	80	510	112	225	210	118	89

CN=Control negativo; CP=Control positivo

2003; Fugh-Berman y Myers, 2004; Saieed *et al.*, 2006; Amori *et al.*, 2007, González *et al.*, 2007), de la familia vegetal Rutáceas, identificados en este estudio mediante espectrofotometría de ultravioleta, presentando variaciones de ondas elevadas para cada espectro flavonado, lo que sugiere una directa influencia sobre estos resultados, considerando la maquinaria metabólica presente a nivel intestinal, en la que los flavonoides participan (Coronil, 2009).

Algunas evaluaciones farmacológicas plantean que ciertos metabolitos secundarios influyen en el estado fisiológico del polipéptido independiente de glucosa (GLP-1) y el péptido 1 análogo del glucagón (GLP-1) como incretinas esenciales en la regulación de la glucosa, tras la liberación de insulina (Holts y Deacon, 1998; Brubaker y Drucker, 2004), aunque los mecanismos específicos relacionados con la bioquímica de estos péptidos post-administración de flavonoides y cumarinas, aún no han sido determinados, unido a la posible formación de complejos con polifenoles como lo señalan Karchesy *et al.* (1989).

La especie *Ruta graveolens* se desempeña como una planta medicinal alternativa en la terapéutica de la diabetes, y en virtud de ello, será recomendable desarrollar otras evaluaciones referidas a la cinética enzimática y actividad proteica de esta especie vegetal, en los diferentes metabolismos, ya que constituye un reservorio de conocimientos no totalizados para la etnofarmacología, aunque su uso indiscriminado podría ser un foco de alerta para la salud pública.

REFERENCIAS

Agraa, S.E.; Badwi, S.M.; Adam, S.E. 2002. Preliminary observations on experimental *Ruta graveolens* toxicosis in Nubian goats. *Trop. Anim. Health. Pro.*, 34: 271-81.

Amoni, R. E.; Lau, J.; Pittas, A. G. 2007. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *JAMA.*, 298:194-206.

Arenas, P.; Savitry, G. P. 1994. La Ruda: *Ruta chalepensis* (L.) Rutaceae. *Doininguezia*, 11:7-25.

AVECAL. 2008. Gobierno Bolivariano de Venezuela, Ministerio del poder popular para la Ciencia y la Tecnología. Manual para la producción y uso ético de los animales de laboratorio. MPPCYT, 93p.

Berdonces, J.L..1998. Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Tikal. Barcelona, España, 248 p.

Brubaker, P.L.; Drucker, D.J. 2004. Glucagon-like

peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology*, 145:2653-2659.

Chávez M.; Franco, L.; González, M.; Tlatenco, M. 2003. Tradición Herbolaria y Remedios Caseros". Mexico City. Ce-AcatI,A.C. 80-81.

Consejo Canadiense de Protección Internacional de los Animales. 1998. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Ottawa, Canadá. pp. 130-1510.

Coronil. G. 2009. Absorción intestinal de flavonoides presentes en la hojas de *Bauhinia megalandra* y sus efectos sobre la eliminación urinaria de glucosa en ratas. Trabajo especial de Grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, 59 p.

Figuroa, L.; Díaz, F.; Camacho, A.; Lopez, M. 2009. Efectos Inducidos por *Cnidioscolus chayamansa* Mac Vaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 19:898-907.

Fleitas, A.S.; Carballo, R.S.; Almeida, G.; Quintela, A.M.; Alfonso. M.A. 2000. Modelo experimental de diabetes en conejos. *Rev. Cubana Angiol. Circ. Vasc.*, 1:10-14.

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

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

González, J.; Benavides, V.; Rojas, R.; Pino, J. 2007. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chapensis* L "Ruda" en ratón (*Mus musculus*). *Rev. Peru. Biol.*, 13:223-225.

González, F.; Motta, N. 2010. Actividad Antihiperlipemiantes de *Bauhinia megalandra*. (Revisión). 14 pp. [en línea]. Dirección URL:http://vitae.ucv.ve/index_pdf. [Consultado: 03 Feb. 2011].

Grigorjev, C.; Brizuela, N.; 2010. Effects of ruta sp on the activity of the smooth gastrointestinal muscle isolated of rat. *Rev. Fac. Cs. Med.*, 67:73-76.

Hawthorne, S.; Grabanski, C.; Martin, E.; Miller, D. 2000. Comparisons of soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J. Chromatogr.*, 892:421-433.

Hnatyszyn, O.; Arenas, P.; Moreno, A.; Rondita, R.; Coussio, J.D. 1974. Plantas reguladoras de la fecundidad según la medicina folklórica. *Rev. Soc. Cien.*, 14:37 pp.

- Holst, J.J.; Deacon C.F. 1998. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*, 47:1663-1670.
- Karchesy, J.; Bae, Y.; Chalker-Scott, L.; Helm, R.F.; Foo, L.; 1989. Chromatography of proanthocyanidins. Chemistry and significance of condensed tannins. Hemingway R.W, Karchesy J.J. *Plenum Press*. pp. 139-151.
- Khazanie, P. 1995. Espectrofotometría en la química clínica. McGraw-Hill, México DF, México, 74 p.
- Knowler, W.; Barrett, E.; Fowler, S.; Hamman, R.; Lachin, J. 2007. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle inversion or metformin. *New. Engl. J. Med.*, 346:393-403.
- Lott, J.; Turner, K. 1975. Evaluation of trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin. Chem.*, 21:1754 -1760.
- Melito A.L.; Bernardi M. M.; Florio, J.C. 2003. "Avaliação da embriofetotoxicidade do extrato bruto de *Ruta graveolens* L. Admionistrado a camundongos em diferentes períodos de gestação". *Rev. Brasil. Toxicol.*, 16:63-70.
- Moller, D. 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414:821-827.
- Oliveira, E.; Silva, D.; Goncalves, S.; Danni. F. 2008. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) prospective diabetes study. *Lancet*, 352:53-837.
- O'Sullivan, D.; Cashman, W. 1970. Blood glucose variations and clinical experience with glibenclamide in diabetes mellitus. *Brit. Med. J.*, 2:572-574.
- Rates, S. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicol.*, 39:603-613.
- Rizzo, 2000. La idealización de un producto que muchas veces resulta peligroso para el ser humano. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8:184-187.
- Saieed, P.; Reza, R.; Abbas, D.; Seyyedvalli, R. 2006. Inhibitory effects of *Ruta graveolens* L. extract on guinea pig liver aldehyde oxidase. *Chem. Pharm. Bull.*, 54:9-13.
- Salkin, N.J; Akey, T.M. 2001. Using SPSS for windows. Analising and understanding data. New Jersey: Prentice-Hall. 28:218-219
- Saltpeter, S.; Greyber, E.; Pasternak, E. 2003. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.*, 163:2594-2602.
- Singh, M.; Balamurugan, M.; Gupta, A; Yadav, S; Sharma, A; Acharya, A; Ramasamy, M. 2007. Antidiabetic activity of glibenclamide loaded liposomes in alloxan induced diabetic rats. *Ars. Pharm.*, 48:31-36.
- Usandizaga, A. 2000. Recomendaciones para tener en cuenta. De interés general, Diario Hoy. Ed. Diario Hoy S.A. La Plata, Buenos Aires, Argentina. 15 p.
- Wongpaitoon, V.; Mills, P.; Russell, R.; Patrick, R. 1981. Intrahepatic cholestasis and cutaneous bulle associated with glibenclamide therapy. *Postgrad. Med.*, 57:244-246.
- Yarto, E. 2009. Urgencia y cuidados críticos en animales de compañía no convencionales Mamíferos. *JLAVEL*, 1:81-101.