

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**Evaluación del efecto modulador de glucosa de cáscaras de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y huaya (*Melicoccus bijugatus* Jacq.) en ratas sanas y en un modelo de diabetes tipo 2**

**TESIS**

para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

Presenta:

**Claudia Ponce Sánchez**

**Codirectores:**

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

**Asesor:**

Dr. José Luis Gómez Olivares

Noviembre 2020

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 934299



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Folio 00220

Matrícula: 2183802040

Evaluación del efecto modulador de glucosa de cáscaras de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y huaya (*Melicoccus bijugatus* Jacq.) en ratas sanas y en un modelo de diabetes tipo 2.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 26 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designados por la Comisión del Posgrado:

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES  
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA  
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA  
DR. RICARDO REYES CHILPA



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: CLAUDIA PONCE SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobat*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

*[Signature]*  
MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

*[Signature]*  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

*[Signature]*  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

*[Signature]*  
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

VOCAL

*[Signature]*  
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

SECRETARIO

*[Signature]*  
DR. RICARDO REYES CHILPA

## Declaración de originalidad

La que suscribe Claudia Ponce Sánchez, alumna del posgrado de Maestría en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Evaluación del efecto modulador de glucosa de cáscaras de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y huaya (*Melicoccus bijugatus* Jacq.) en ratas sanas y en un modelo de diabetes tipo 2”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestra en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 19 de Noviembre del 2020.

ATENTAMENTE



Claudia Ponce Sánchez  
Nombre y firma del alumno

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 18 de Noviembre de 2020

Comisión Académica del Posgrado  
Dra. Laura Josefina Pérez Flores  
Presente

La que suscribe Claudia Ponce Sánchez alumno(a) con número de matrícula 2183802040, del posgrado Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Evaluación del efecto modulador de glucosa de cáscaras de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y huaya (*Melicoccus bijugatus* Jacq.) en ratas sanas y en un modelo de diabetes tipo 2” a desarrollar en Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Claudia Ponce Sánchez

Nombre completo y firma autógrafa

## **Comité Tutorial**

Codirectores:

### **Dr. Fernando Díaz de León Sánchez**

Laboratorio postcosecha de recursos fitogenéticos y recursos naturales, Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

[fdls5@yahoo.com.mx](mailto:fdls5@yahoo.com.mx)

Teléfono: 55 2128 4214

### **Dr. José Alberto Mendoza Espinoza**

Laboratorio de Productos Naturales, Universidad Autónoma de la Ciudad de México,

Campus Casa Libertad

[amendozaespinoza@gmail.com](mailto:amendozaespinoza@gmail.com)

Teléfono: 55 7227 7339

Asesor:

### **José Luis Gómez Olivares**

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

[gool@xanum.uam.mx](mailto:gool@xanum.uam.mx)

Teléfono: 58046593

## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto a:

### **Mi familia**

A mi padres, Miguel e Hilda, a mis hermanos y hermana, Joel, Christian, Miguel, Alejandro, Sergio y Adriana que sin su apoyo no hubiera podido lograr esta meta más en mi vida.

### **Mis amigos**

Javi, Ilse, Mara e Isra por animarme y escucharme en mis momentos más difíciles.

### **Mis directores**

Dr. Fernando Díaz y Dr. Alberto Mendoza todo su apoyo, tiempo y paciencia durante todo este proyecto.

*A la memoria de mi mamá “**Hilda Sánchez Medina**”  
y hermano “**Alejandro Ponce Sánchez**”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente a cada una de las personas que contribuyeron en cada una de las fases de este proyecto.

Al Dr. Fernando Díaz de León Sánchez, por aceptarme dentro del grupo de investigación y aceptar dirigir este trabajo. Le agradezco mucho su confianza, paciencia y comprensión depositadas en mi persona, por sus conocimientos y comentarios positivos durante mi formación, por su apoyo tanto académico como personal.

Al Dr. Alberto Mendoza Espinoza, por aceptarme dentro de su laboratorio y aceptar dirigir este proyecto a pesar. Le agradezco mucho su paciencia para transmitirme sus conocimientos con amabilidad y mucha alegría.

Al Dr. José Luis Gómez Olivares por aceptar asesorarme durante este trabajo, por su paciencia y apoyo. Le agradezco mucho todos sus comentarios durante mi formación.

A Javi e Ilse, mis mejores amigos, por todo su apoyo durante mis momentos más bajos, por cada sonrisa, por cada momento inolvidable. Agradezco mucho por haberlos conocido. Los quiero mucho amiguitos.

A Mara e Isra, amigos y compañeros de maestría, por todos los buenos momentos durante esta etapa, gracias por siempre estar conmigo.

Al laboratorio de poscosecha, Dr. Víctor Oídor por todo su apoyo y conocimientos en el manejo de animales y farmacología. Andrea y Daniela por su ayuda en el bioterio.

Al laboratorio de productos naturales, Bernita, Clarita, Alexa, Omar, Laurita, Mari y Dr. Edgar, por todo su apoyo y hacerme sentir como uno más de ustedes.

A mis hermanos y hermana Joel, Christian, Miguel, Alejandro, Sergio y Adriana por todo su apoyo incondicional, por sus enseñanzas, por todas las alegrías e infortunios en los que hemos salido juntos como familia.

Finalmente, los más importantes, a mis padres, Miguel e Hilda a quienes les debo todo lo que soy, por ser el ejemplo de trabajo duro, por su amor, por siempre apoyarme en mis decisiones, por sus consejos que me hacen ser mejor persona, por sus palabras de aliento en cada una de las etapas de mi vida.

## RESUMEN

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad con alta prevalencia en la población mundial. Este padecimiento se caracteriza por el aumento de glucosa en la sangre, intolerancia a la glucosa y la progresiva resistencia a la insulina. Actualmente, se encuentra una batería de fármacos denominados antidiabéticos orales cuyo objetivo es la disminución de glucosa capilar, tratamientos que se emplean de manera concomitante con el uso de plantas medicinales con efecto antidiabético. Sin embargo, existen pocos estudios que validen su uso, así como de los metabolitos y mecanismos por los cuales se produce el efecto. En este contexto el objetivo de este trabajo fue “determinar el efecto modulador de glucosa de las cáscaras liofilizadas de *Annona squamosa* L. (saramuyo) y *Melicoccus bijugatus* Jacq. (huaya) en ratas sanas y en un modelo de DT2”. Para ello en la primera fase se analizó el contenido químico de metabolitos secundarios, encontrando antraquinonas, azúcares reductores y triterpenoides detectados mediante pruebas colorimétricas, el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides (FT) por espectroscopia, el contenido de ácidos orgánicos y azúcares por HPLC y la capacidad antioxidante (CA) mediante el ensayo de ABTS+ del liofilizado de las cáscaras de saramuyo y huaya, encontrando en la cáscara de saramuyo mayor CFT, menor contenido de FT, mayor CA, menor contenido de ácidos málico y tartárico, menor contenido de sacarosa, glucosa y fructosa, comparado con la cáscara de huaya. En la segunda fase, se evaluó el efecto antihiper glucemiante en ratas sanas de tres dosis de liofilizado de cáscaras (25, 100 y 200 mg/Kg) mediante una prueba de tolerancia a la glucosa de 2h (PTGO-2h), encontrándose efecto antihiper glucemiante en las dosis de 100 y 200 mg/Kg de saramuyo y en las tres dosis de huaya. La tercera fase, se estandarizó el modelo

químico de DT2 en ratas neonatas Wistar macho utilizando una dosis única de estreptozotocina (STZ, 70 mg/Kg). Se realizó un curso temporal de 8 semanas para evaluar las diferencias en la glucemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina de ratas administradas con buffer citratos 0.1 M, pH 4.5 y ratas administradas con STZ. Las ratas administradas con STZ presentaron hiperglucemia a partir de la 2da semana, intolerancia a la glucosa en la 4ta semana, evaluada mediante una PTGO-2h, resistencia a la insulina en la 8va semana, evaluada mediante una prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal de 2h (PTII-2h). En la última fase, las ratas diabéticas de 8 semanas recibieron tratamientos de liofilizados en donde se obtuvo mejor efecto antihiperglucemiante: saramuyo 100 y 200 mg/Kg y huaya 100 mg/Kg. Al comparar los resultados de las ratas diabéticas administradas con el vehículo (agua) después del tratamiento de 14 días se encontró que, saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) disminuyeron la glucosa capilar sin ayuno de ratas diabéticas. Ambas cáscaras disminuyeron la intolerancia a la glucosa en ratas diabéticas a partir del minuto 60, sin embargo, solo saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) disminuyeron la resistencia a la insulina. Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que los liofilizados de saramuyo y huaya presentan efecto modulador de la glucosa en un modelo de rata sana y ratas diabéticas, en este último, modificando la resistencia a la insulina, efecto que podemos asociar al contenido de fenoles y flavonoides totales, por lo que podrían ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de DT2, siendo necesario evaluar la correlación química de algunos de los metabolitos del extracto contra la actividad biológica, así como explorar el mecanismo molecular del efecto modulador de los niveles de la glucosa.

## ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a disease with a high prevalence in the world population. This condition is characterized by increased blood glucose, glucose intolerance, and progressive insulin resistance. Currently, there is a battery of drugs called oral antidiabetics whose objective is to decrease capillary glucose, treatments that are used concomitantly with the use of medicinal plants with antidiabetic effect. However, there are few studies that validate its use, as well as the metabolites and mechanisms by which the effect occurs. In this context, the objective of this work was to determine the glucose modulating effect of the lyophilized peels of *Annona squamosa* L. (saramuyo) and *Melicoccus bijugatus* Jacq. (huaya) in healthy rats and in a T2D model. For this, in the first phase, the chemical content of secondary metabolites was analyzed, finding anthraquinones, reducing sugars and triterpenoids detected by colorimetric tests, the content of total phenolic compounds (CFT) and flavonoids (FT) by spectroscopy, the content of organic acids and sugars by HPLC and the antioxidant capacity (CA) by the ABTS+ assay of the lyophilisate of the saramuyo and huaya peels, finding in the saramuyo peel higher CFT, lower content of FT, higher CA, lower content of malic and tartaric acids, lower content of sucrose, glucose and fructose, compared to huaya peel. In the second phase, the antihyperglycemic effect in healthy rats of three doses of peel lyophilisate (25, 100 and 200 mg/Kg) was evaluated by means of a 2-hour glucose tolerance test (PTGO-2h), finding antihyperglycemic effect in the doses of 100 and 200 mg/Kg of saramuyo and in the three doses of huaya. In the third phase, the chemical model of T2D was standardized in neonatal male Wistar rats using a single dose of streptozotocin (STZ, 70 mg/Kg). An 8-week time course was conducted to evaluate differences in blood glucose,

glucose intolerance and insulin resistance in rats administered with 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 and rats administered with STZ. The rats administered with STZ presented hyperglycemia from the 2nd week, glucose intolerance in the 4th week, evaluated by a 2-hour PTGO, insulin resistance in the 8th week, evaluated by an insulin tolerance test by route 2h intraperitoneal (PTII-2h). In the last phase, the 8-week-old diabetic rats received lyophilized treatments where a better antihyperglycemic effect was obtained: saramuyo 100 and 200 mg/Kg and huaya 100 mg/Kg. When comparing the results of the diabetic rats administered with the vehicle (water) after the 14-day treatment, it was found that saramuyo (200 mg/Kg) and huaya (100 mg/Kg) decreased capillary glucose without fasting in diabetic rats. Both peels decreased glucose intolerance in diabetic rats from minute 60, however, only saramuyo (200 mg/Kg) and huaya (100 mg/Kg) decreased insulin resistance. Based on the results obtained, we can conclude that the saramuyo and huaya lyophilisates show a modulating effect of glucose in a model of healthy rats and diabetic rats, in this latter, modifying insulin resistance, an effect that we can associate with the phenol content. and total flavonoids, so they could be a therapeutic alternative for the treatment of T2D, being necessary to evaluate the chemical correlation of some of the metabolites of the extract against the biological activity, as well as to explore the molecular mechanism of the modulating effect of the levels of the glucose.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Dedicatoria</b>	vi
<b>Agradecimientos</b>	vii
<b>Resumen</b>	ix
<b>Abstract</b>	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1 Definición y clasificación de diabetes</b>	1
<b>1.2 Prevalencia y repercusiones económicas</b>	1
<b>1.3 Diagnóstico</b>	2
<b>1.4 Modelos de estudio de DT2</b>	2
1.4.1 <i>Estreptozotocina</i>	3
1.4.2 <i>Administración neonatal de STZ en ratas</i>	6
<b>1.5 Tratamiento</b>	7
1.5.1 <i>Tratamiento farmacológico</i>	7
1.5.2 <i>Tratamientos alternativos</i>	8
<b>1.6 Cáscaras de frutos tropicales como fuentes de compuestos bioactivos</b>	9
<b>1.7 Frutos tropicales</b>	12
1.7.1 <i>Saramuyo (Annona squamosa L.)</i>	12
1.7.1.1 <i>Origen y distribución geográfica</i>	12
1.7.1.2 <i>Descripción botánica y clasificación taxonómica</i>	13
1.7.2 <i>Huaya (Melicoccus bijugatus Jacq.)</i>	14
1.7.2.1 <i>Origen y distribución geográfica</i>	14
1.7.2.2 <i>Descripción botánica y clasificación taxonómica</i>	14
<b>2. ANTECEDENTES</b>	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>4. HIPÓTESIS</b>	19
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	20
<b>5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	20
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	20
<b>6.1 Material biológico</b>	20
<b>6.2 Obtención de liofilizados de cáscaras</b>	20
6.2.1 <i>Obtención de extractos</i>	20
<b>6.3 Análisis fitoquímico</b>	21
6.3.1 <i>Análisis químico cualitativo</i>	21
6.3.1.1 <i>Determinación de alcaloides</i>	21
6.3.1.2 <i>Determinación de antraquinonas</i>	21
6.3.1.3 <i>Determinación de azúcares reductores</i>	21
6.3.1.4 <i>Determinación de cumarinas</i>	22
6.3.1.5 <i>Determinación de saponinas</i>	22
6.3.1.6 <i>Determinación de taninos</i>	22
6.3.1.7 <i>Determinación de triterpenoides</i>	23

6.3.2 <i>Análisis químico cuantitativo</i>	23
6.3.2.1 <i>Cuantificación de fenoles totales</i>	23
6.3.2.2 <i>Cuantificación de flavonoides</i>	24
6.3.2.3 <i>Cuantificación de azúcares</i>	24
6.3.2.4 <i>Cuantificación de ácidos orgánicos</i>	25
6.3.2.5 <i>Capacidad antioxidante</i>	25
<b>6.4 Actividad farmacológica</b>	26
6.4.1 <i>Evaluación del efecto antihiper glucemiante en ratas sanas en una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO)</i>	26
6.4.2 <i>Inducción de diabetes química en ratas</i>	27
6.4.3 <i>Evaluación del efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas</i>	28
<b>6.5 Análisis estadístico</b>	28
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	29
<b>7.1. Análisis fitoquímico cualitativo</b>	29
<b>7.2 Análisis fitoquímico cuantitativo</b>	31
7.2.1 <i>Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante</i>	31
7.2.2 <i>Contenido de azúcares</i>	35
7.2.3 <i>Contenido de ácidos orgánicos</i>	37
<b>7.3 Actividad farmacológica</b>	38
7.3.1 <i>Evaluación del efecto antihiper glucemiante en ratas sanas en una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO)</i>	38
7.3.2 <i>Inducción química de diabetes</i>	45
7.3.3 <i>Evaluación del efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas</i>	49
<b>8. CONCLUSIONES</b>	55
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	56
<b>10. REFERENCIAS</b>	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Descomposición de la estreptozotocina en isocianato y metildiazohidróxido	4
<b>Figura 2.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) de 3 dosis de liofilizado saramuyo	40
<b>Figura 3.</b>	Área bajo la curva de 3 dosis de liofilizado de saramuyo	41
<b>Figura 4.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) de 3 dosis de liofilizado de huaya	42
<b>Figura 5.</b>	Área bajo la curva de 3 dosis de liofilizado de huaya	43
<b>Figura 6.</b>	Curso temporal de 8 semanas	46
<b>Figura 7.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) y Prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) a la 4ta semana	47
<b>Figura 8.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) y Prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) a la 8va semana	48
<b>Figura 9.</b>	Glucosa basal y peso corporal de ratas DB después del tratamiento	50
<b>Figura 10.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) de ratas DB después del tratamiento	51
<b>Figura 11.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) de ratas DB después del tratamiento	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Modelos de nSTZ	6
<b>Tabla 2.</b>	Compuestos bioactivos en cáscaras de frutos tropicales y su uso terapéutico	10
<b>Tabla 3.</b>	Clasificación taxonómica de <i>Annona squamosa</i> L. (saramuyo)	13
<b>Tabla 4.</b>	Clasificación taxonómica de <i>Melicoccus bijugatus</i> Jacq. (huaya)	15
<b>Tabla 5.</b>	Análisis químico cualitativo de cáscaras de saramuyo y huaya	30
<b>Tabla 6.</b>	Evaluación del contenido de fenoles totales y flavonoides de extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y huaya	32
<b>Tabla 7.</b>	Capacidad antioxidante de cáscaras de saramuyo y huaya	35
<b>Tabla 8.</b>	Contenido de azúcares totales de cáscaras de saramuyo y huaya	36
<b>Tabla 9.</b>	Contenido de ácidos orgánicos de cáscaras de saramuyo y huaya	38
<b>Tabla 10.</b>	Contenido de compuestos fenólicos totales en cáscaras de saramuyo y huaya (Tomado y modificado de Can-Cauich <i>et al.</i> , 2017)	44

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Definición y clasificación de diabetes**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la diabetes como una enfermedad crónica y progresiva que afecta a las células del páncreas al reducir la producción de insulina, o su efectividad en metabolismo en el organismo (OMS, 2016). Se describe también, como un conjunto de desórdenes metabólicos caracterizado por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (OMS, 1999).

Tradicionalmente se clasifica la diabetes como tipo 1 y 2. La diabetes tipo 1 (DT1) afecta la producción de insulina debido a la destrucción autoinmune de células  $\beta$  pancreáticas, lo que en consecuencia provoca deficiencia de insulina. La diabetes tipo 2 (DT2) se caracteriza por el daño progresivo de células  $\beta$  pancreáticas, generando una resistencia a la insulina, es decir, el organismo es incapaz de usarla adecuadamente (OMS, 2016; ADA, 2018).

## **1.2 Prevalencia y repercusiones económicas**

En el 2019, la Federación Internacional de Diabetes (IFD, por sus siglas en inglés) reportó que la prevalencia de diabetes en adultos de 20 a 79 años era de 463 millones de casos, estimando que para 2045 este número aumentaría a 700 millones. En la región de Norteamérica y el Caribe se encuentran 47.6 millones de personas con diabetes. Dentro de esta región, Estados Unidos (más de 30 millones) y México (más de 12 millones) ocupan el primer y segundo lugar, respectivamente, de personas con diabetes (IDF, 2019). En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 reportó que la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico fue de 9.4% de los adultos

encuestados (ENSANUT MC, 2016). De acuerdo con la IFD, en el 2019, el gasto global para el tratamiento de diabetes fue de alrededor de 850 mil millones de dólares, y únicamente en Norteamérica se gastó alrededor de 324.5 mil millones de dólares, lo que representó un 42.7% del gasto global, del cual 294.6 millones correspondieron a EE. UU., lo que se traduce a un gasto de 9 506 USD por persona con diabetes (IDF, 2019). En México, el Proyecto de Presupuesto de Egresos para la Federación para el Ejercicio Fiscal 2018, indicó que el gasto destinado para salud fue del 19% (122, 557.3 mdp), del cual, el presupuesto programado para el programa de Prevención y Control de Sobrepeso, Obesidad y Diabetes correspondió al 0.4 %, es decir, 453.6 mdp (PEF, 2018).

### **1.3 Diagnóstico**

La DT2 puede ser diagnosticada mediante pruebas que indiquen los niveles de glucosa en sangre, por ejemplo, se considera como diabetes si la prueba de glucosa plasmática en ayunas (PGA) es  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L), o el valor de glucosa en plasma de 2 h (2-h PG) durante una prueba de tolerancia de glucosa oral de 75 g (PTGO) es  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L), en pacientes que presentan síntomas tradicionales de diabetes tales como la poliuria y polidipsia. Otra prueba es el criterio de hemoglobina glucosilada ( $HbA_{1c}$ )  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol). Sin embargo, la  $HbA_{1c}$  tiene mayores ventajas comparado con la PGA y PTGO, siempre y cuando se siga el método autorizado por el Programa Nacional de Estandarización de la glucohemoglobina y estandarizado al DCCT (Control de la diabetes y ensayo de complicaciones, por sus siglas en inglés) (ADA, 2018).

### **1.4 Modelos de estudio de DT2**

El estudio de la DT2 mediante modelos experimentales es fundamental para entender los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, así como para estudiar la eficiencia de nuevas estrategias farmacológicas. Un modelo animal ampliamente utilizado para generar DT2 involucra la administración de fármacos a ratas o ratones, dietas altas en grasas o combinaciones de estas.

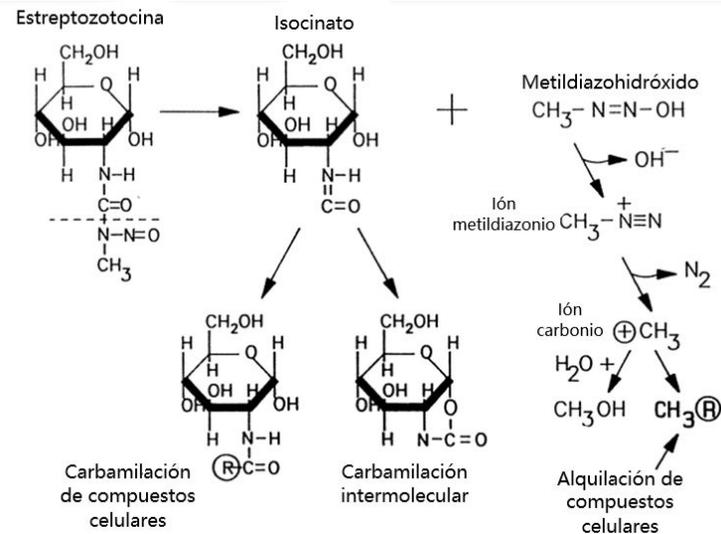
#### 1.4.1 Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ) (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-D-glucopiranos) (**Figura 1**) es un fármaco utilizado para la inducción experimental de diabetes en roedores y otros animales. Es un derivado nitrosourea monofuncional aislado de la fermentación de *Streptomyces achromogenes* (Lewis *et al.*, 1960; Vavra *et al.*, 1960). Estructuralmente, STZ es análogo a la glucosa y la N-acetilglucosamina (GlcNAc) por lo que puede ser reconocido por el transportador GLUT2 presente en las células  $\beta$ -pancreáticas (Tjälve *et al.*, 1976). STZ tiene acción diabetogénica al inducir selectivamente muerte celular a las células secretoras de insulina en los islotes pancreáticos, se han propuesto tres mecanismos que explican el daño citotóxico STZ: metilación de al ADN, producción de óxido nítrico (NO) y estrés oxidativo (Eleazu *et al.*, 2013).

##### Metilación del ADN

El resto metil nitrosourea presente en la STZ lo convierte en un agente altamente alquilante capaz de metilar directamente el ADN. Al entrar a las células STZ se descompone espontáneamente en dos moléculas: isocianato y metildiazohidróxido (**Figura 1**), el primero reacciona con el grupo amino primario o el grupo sulfhidrilo de proteínas en un proceso denominado como carbamilación, el segundo se descompone y

en una molécula altamente reactiva,  $^+\text{CH}^3$  (ion carbonio metilo) la cual sería la causante de los enlaces cruzados entre las cadenas de ADN (Wilson & Leiter, 1990).



**Figura 1.** Descomposición de la estreptozotocina en isocinato y metildiazohidróxido (Tomado y modificado de Wilson & Leiter, 1990).

El ion carbonio metilo ( $^+\text{CH}^3$ ) al reaccionar con el ADN forma aductos: 7-metilguanina, O-6-metilguanina, 3-metiladenina y 7-metiladenina en hígado, riñón, intestino y páncreas (Bennet & Pegg, 1981). Las modificaciones en la guanina producen desarreglo con la timina convirtiéndose en un punto de mutación. El daño causado conlleva a la continua activación de la enzima reparadora de ADN, poli-(ADP-Ribosa) sintetasa (PARP), la cual es dependiente de NAD, que en consecuencia agota los depósitos de NAD y posteriormente los de ATP. En este escenario, la actividad celular resulta afectada lo que eventualmente provoca la muerte celular de células  $\beta$ -pancreáticas (Pieper, 1999).

Producción de NO

Otro posible mecanismo de daño al ADN podría ser mediante la acción del óxido nitroso (NO). Se ha demostrado que la STZ puede generar NO debido a la presencia del resto metil nitroso urea (Kwon *et al.*, 1994). El NO puede dañar al ADN de dos formas: 1) mediante la nitrosación, es decir, convertir en derivados nitrosos a aminas primarias o secundarias y las bases de ácido nucleico (A, C, G, T); 2) al combinarse con superóxido formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual puede descomponerse en especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical hidroxilo (Pieper, 1999). Adicionalmente, NO activa enzimas como la guanilil ciclasa en los islotes y lo que permite la acumulación de cGMP, también inhibe otras enzimas como la aconitasa mitocondrial, impidiendo la isomerización del citrato. La liberación local de NO de STZ dentro de los islotes perjudican la secreción de insulina (Turk *et al.*, 1993).

#### Estrés oxidativo

Se ha propuesto que el estrés oxidativo podría ser responsable, en parte, de la acción diabetogénica de STZ. Se ha reportado que STZ altera la homeostasis de glutatión y el flujo de electrones de NADPH en la mitocondria (Raza *et al.*, 2004), además de promover la disfunción de complejos respiratorios en la mitocondria: disminuyendo la actividad de enzimas del complejo III (citocromo c oxidorreductasa) y complejo IV (citocromo c oxidasa) e incrementando moderadamente a las del complejo I (NADH: ubiquinol oxidorreductasa) y complejo II (succinato: ubiquinol oxidorreductasa). Adicionalmente, también resulta inhibida la actividad de la enzima aconitasa. Cambios en la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales podrían implicar cambios en la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (ERO) y generar estrés oxidativo (Raza *et al.*, 2011). Se ha reportado que STZ disminuye drásticamente la expresión de la proteína NRF2, la

cual regula la expresión de otras proteínas que protegen contra daño oxidativo, además que promueve el aumento de promueve el aumento de proteínas pro-apoptóticas como Bax y aumenta la escisión de caspasa-3. Adicionalmente, STZ estimula la fosforilación de Akt, lo que podría alterar la señalización de insulina (Arwa *et al.*, 2017).

#### 1.4.2 Administración neonatal de STZ en ratas

La principal característica de la DT1 es la destrucción autoinmune de células  $\beta$ -pancreáticas que se traduce en la pérdida de la producción de insulina. El protocolo frecuentemente usado para el desarrollo de DT1 en ratas implica la administración de una dosis única de STZ a una dosis de 40 a 70 mg/Kg a ratas de 8-10 semanas de edad (Brondum *et al.*, 2005). Sin embargo, el modelo que involucra la administración de STZ en ratas en etapa neonatal (n-STZ) es considerado como una útil y adecuada herramienta para desarrollar DT2 ya que se desarrolla hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hipoinsulinemia leve, características presentadas de forma natural en el transcurso de la patología en humanos. Estas características están relacionadas a la regeneración temprana y “agotamiento” funcional de células  $\beta$ -pancreáticas (Portha *et al.*, 1989). A continuación, se describen algunos modelos descritos de nSTZ (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Modelos de nSTZ

<b>Edad</b>	<b>Dosis</b>	<b>Descripción</b>
n0-STZ	100 $\mu$ g/g	Administración en la vena safena del neonato. Características diabetogénicas observables a partir de los 21.5 días. Disminuye un 20% la masa de células

---

		pancreáticas y el contenido de glucagón pancreático y peso corporal, incrementa la glucosa capilar (Portha <i>et al.</i> , 1974).
n2-STZ	90 mg/Kg	Administración intraperitoneal. Después de dos meses, el 70% de los animales desarrollan intolerancia a la glucosa (PD) y el 30% desarrolla hiperglucemia (Madhoosudan <i>et al.</i> , 2014).  Después de 6 meses, los animales presentan intolerancia a la glucosa, disminuyen los niveles plasmáticos de insulina, sin embargo, los niveles de ácidos grasos no son diferentes al control (Chang <i>et al.</i> , 2001).
n5-STZ	120 mg/Kg	Administración intraperitoneal. A la 12va semana, los animales presentan intolerancia a la glucosa, la capacidad sensorial resulta afectada, algunos desarrollan hiperglucemia (21.2 ±1.6 mmol/dL), los animales hiperglucémicos disminuyen la excitabilidad, amplitud y velocidad de conducción del potencial de acción del nervio ciático (Ferreira-da-Silva <i>et al.</i> , 2013).

## 1.5 Tratamiento

### 1.5.1 Tratamiento farmacológico

Para pacientes con DT2 la terapia farmacológica incluye agentes antidiabéticos orales (ADOs), cuya función principal es la disminución de glucosa mediante distintos

mecanismos de acción. Debido a la amplia variedad de ADOs, estos pueden ser clasificados en a) hipoglucemiantes, que actúan disminuyendo las concentraciones de glucosa y b) antihiperoglucemiantes, que impiden el aumento de las concentraciones de glucosa (Alejandre & López, 2001).

Entre los fármacos hipoglucemiantes se encuentran las sulfonilureas y meglitinidas, aunque son estructuralmente diferentes, su mecanismo de acción es similar, se unen a canales de potasio dependientes de ATP en las células  $\beta$  pancreáticas, esto conduce a la inhibición de estos canales alterando el potencial de reposo de la membrana, provocando la entrada de calcio y estimulando la secreción de insulina. Con respecto a los fármacos antihiperoglucemiantes, se encuentra las biguanidas (metformina), estos no estimulan directamente la secreción de insulina, sino que aumenta su acción y la utilización de glucosa mediada por insulina en los tejidos periféricos (músculo e hígado). Aumenta la actividad de la proteína cinasa activada por AMP, reduciendo la gluconeogénesis y la lipogénesis hepática, los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa por su parte, inhiben competitivamente la  $\alpha$ -glucosidasa en el intestino, inhibiendo así la reabsorción de polisacáridos, así como el metabolismo de la sacarosa a glucosa y fructosa. (Lorenzati *et al.*, 2010).

### *1.5.2 Tratamientos alternativos*

De acuerdo con la información etnobotánica, se sugiere que hay al menos 800 plantas que tienen potencial antidiabético (Bailey & Day, 1989; Castro-Juárez 2014; Giovannini *et al*, 2016; Kumar *et al*, 2018). Entre las plantas que se han utilizado ampliamente están integrantes de las familias *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Liliace*, *Solanaceae*,

entre otras (Baharvand-Amandi; Giobvanni *et al.*, 2016). La primera planta que se describió el efecto antihiper glucemiante fue *Galega officinalis* L. (*Fabaceae*), debido a que contiene un derivado de guanidina (galegina), cuya estructura es muy similar a la metformina, fármaco cuya función es disminuir los niveles de glucosa en sangre (Fukunaga *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 2015).

Algunos autores atribuyen el efecto antidiabético a compuestos fenólicos, tales como flavonoides, tanino y fenoles ácidos (Vinayagam *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha descrito que el ácido oleanólico, ursólico y gálico de la granada (*Punica granatum* L.) pueden tener efecto sobre los receptores y activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) que desempeñan un papel importante en la homeostasis de la glucosa (regulando transportadores de glucosa, como GLUT4) (Katz *et al.*, 2007). Otros mecanismos descritos para estos metabolitos incluyen la inhibición de  $\alpha$ -amilasa, inhibición de la formación de productos finales de la glicación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés), eliminación de radicales libres, aumento de la secreción de la incretina GLP-1 (péptido parecido a glucagon-1), y el incremento, sobre-regulación y translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) (Nazarian-Samai *et al.*, 2018).

### **1.6 Cáscaras de frutos tropicales como fuentes de compuestos bioactivos**

En plantas superiores, el fruto se define como la estructura que resulta de la modificación de tejidos soportan los óvulos (ovarios) tras la fertilización del óvulo (Nitsch, 1952). Generalmente el fruto consiste en dos estructuras: la semilla y el pericarpio. El pericarpio, se define como el conjunto de capas de tejido derivadas del ovario y a menudo consiste en la parte comestible del fruto, puede diferenciarse en tres capas: *endocarpio*, que

constituye el tejido más cercano a la semilla, *mesocarpio*, la capa intermedia entre el endocarpio y exocarpio, y el *epicarpio* o *exocarpio*, la capa más externa (Dardick & Callahan, 2014; Carrillo-López, 2019). La cáscara del fruto corresponde a la capa exterior del fruto, cumple con varias funciones fisiológicas: impide la pérdida de agua, lixiviación de nutrientes y confiere protección contra el daño mecánico e invasión de patógenos (Caceres *et al.*, 2012). Las cáscaras constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos debido a la presencia de metabolitos primarios (azúcares solubles y fibras), metabolitos secundarios (compuestos fenólicos, alcaloides) y minerales (Parmar & Kar, 2010; Khairusy-Syakirah *et al.*, 2012). Los compuestos bioactivos presentes en las cáscaras le proporcionan varias propiedades medicinales que dependerán de la composición de dichos compuestos (Karawasa & Mohan, 2018). En la **Tabla 2** se resumen algunos de los compuestos bioactivos presentes en cuatro cáscaras de frutos tropicales representativos: naranja (*Citrus sinensis*), mango (*Magnifera indica*), plátano (*Musa paradisiaca*) y granada (*Punica granatum*), además de algunos de los efectos terapéuticos descritos.

**Tabla 2.** Compuestos bioactivos en cáscaras de frutos tropicales y su uso terapéutico.

Fruto	Compuestos bioactivos	Uso terapéutico
<b>Naranja</b> <b>(<i>Citrus sinensis</i>)</b>	Azúcares reductores, saponinas glucósidos cardiacos, taninos y flavonoides. Zn, Cu, Mg y Mn (Osarumwense <i>et al.</i> , 2013). Flavonas y compuestos	Capacidad citotóxica en líneas celulares de HepG2 y efecto citoprotector contra estrés oxidativo (Chen <i>et al.</i> , 2012). Disminuye los efectos

	fenólicos:	Narangina, adversos del hipotiroidismo hesperidina, neohesperidina, (anti-tiroidal) y capacidad diosmina, luteolina, sinensetina, antioxidante (Parmar & Kar, rutina, quercetina, kaempferol, 2008). Antimicrobiana (Suja <i>et al.</i> , 2017).
	ferúlico, sináptico, p-cumárico.	
	Carotenoides:	Luteína, zetaxantina, β-criptoxantina, β- carotenos (Wang <i>et al.</i> , 2008).
	Compuestos fenólicos:	Ácido Capacidad antioxidante y anti- gálico, siríngico, elágico, gentesil proliferativa en HepG2 (Kim <i>et al.</i> , 2010). Antiinflamatoria protocatecuico. Flavonoides: <i>al.</i> , 2010).
<b>Mango</b> <b>(<i>Magnifera</i></b> <b><i>indica</i>)</b>	mangiferina y quercitina. (Knödler <i>et al.</i> , 2008). Carotenos: β-Carotenos, Mejoramiento en disfunciones violaxantina y luteína (Ajila, de la tiroides (Parmar & Kar, 2010). 2009).	
<b>Plátano</b> <b>(<i>Musa</i></b> <b><i>paradisiaca</i>)</b>	Taninos, alcaloides, esteroides, Antibacterial contra <i>A.</i> saponinas, flavonoides y <i>tumefaciens</i> , Antifúngico carbohidratos (Okorundu <i>et al.</i> , contra <i>F. culmorum</i> y <i>R. solani</i> 2010). Minerales: Fe, Cu, Zn, ((Behiry <i>et al.</i> , 2019). Actividad Mg. Micronutrientes: K, Ca, Na, protectora en aterosclerosis y P. (Aboul-Enein <i>et al.</i> , 2016) disfunciones de la tiroides	

Compuestos fenólicos: ácido (Parmar & Kar, 2007).  
 elágico, gallico, ferúlico, *o*- Antioxidante (Aboul-Enein *et*  
 cumarico, salicílico, cinámico, *al.*, 2016). Incrementa la  
 catecol. Flavonoides: miricetina síntesis de melanina (Kim &  
 y naringenina (Behiry *et al.*, Kim, 2018).

2019).

<b>Granada</b> <b>(<i>Punica</i></b> <b><i>granatum</i>)</b>	Compuestos fenólicos: Pirogalol, punicalagina, catequina, catecol, ácido gálico, <i>p</i> -hidrobenzoico, ferúlico, elágico, cinámico, rosmarinico. Flavonoides: Kaemp-3-(2- <i>p</i> -comaroil) glucósido, quercetrina, hesoeridina, naringina (El- Hadary & Ramadan, 2019).	Efecto antidiabético, antihiperlipidémico y antioxidante (El-Hadary & Ramadan, 2019). Efecto protector en aterosclerosis e hipertiroidismo. Anti- hiperglucemiante (Parmar & Kar, 2007). Efecto hepatoprotector (Toklu <i>et al.</i> , 2007).
--	---	--

---

Con estos ejemplos es posible destacar la importancia de las cáscaras como una importante fuente de compuestos bioactivos, que además tienen efecto terapéutico.

## 1.7 Frutos tropicales

### 1.7.1 Saramuyo (*Annona squamosa* L.)

#### 1.7.1.1. Origen y distribución geográfica

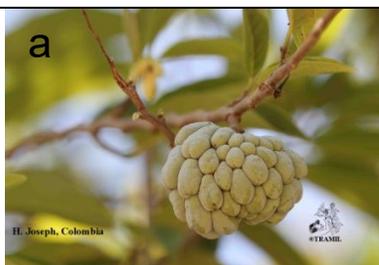
El origen es incierto, pero se cree es nativo de regiones del Caribe u otras regiones tropicales del sur de América, sin embargo, botánicos concluyen que su origen se encuentra en la India, debido a su larga distribución en dicho país (Pinto *et al.*, 2005). Se encuentra distribuida ampliamente en climas tropicales, en el centro y sur de América, Antillas Holandesas, sudeste asiático y Australia (Orwa *et al.*, 2009)

#### 1.7.1.2. Descripción botánica y clasificación taxonómica

El árbol de saramuyo es semicaducifolio, perteneciente a las dicotiledóneas, de poca altura, tipo arbustivo, de alrededor de 3-7 m, con corona amplia y ramas extendidas de forma irregular. El fruto es redondo, con forma de corazón, ovalado o cónico, de alrededor de 5 a 10 cm de diámetro, con un peso entre 120 y 330 g. La pulpa del fruto maduro es de color amarillo-verdoso, conteniendo aproximadamente 30-45 semillas negras brillantes. La cáscara tiene muchas protuberancias, su forma asemeja a una granada de mano (Pinto *et al.*, 2005; Orwa *et al.*, 2009). El fruto y su clasificación se muestran en la **tabla 3**.

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *Annona squamosa* L. (saramuyo)

<i>Annona squamosa</i> L.	Clasificación taxonómica	
	Reino	Plantae
	Subreino	Tracheobionta
	Superdivisión	Spermatophyta
	División	Magnoliophyta
	Clase	Magnoliopsida



Subclase	Magnoliidae
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i> L.



Especie	<i>Annona squamosa</i> L.
---------	---------------------------

a. Fruto de saramuyo; b. Pulpa de saramuyo y semillas. Fuentes: Imágenes tomadas de TRAMIL, 2017; USDA, 2019

### 1.7.2 Huaya (*Melicoccus bijugatus* Jacq.)

#### 1.7.2.1 Origen y distribución geográfica

También es conocido como mamoncillo y de acuerdo con Morton (1987), es originario de Colombia, Venezuela y las islas Guayanas. Mediante cultivos ha sido posible extender su distribución en India y las zonas tropicales y cálidas del continente americano (Morton, 1987).

#### 1.7.2.2 Descripción botánica y clasificación taxonómica

El árbol de huaya es alto (hasta 25-30 m) pero de lento crecimiento, tiene una corona amplia con ramas extendidas, el grueso del tronco es de alrededor de 1.7 m. El fruto es un tipo de drupa que forma racimos, es de forma ovoide cuyo pericarpo es fuerte y de color verde brillante, cuando el fruto está maduro, la pulpa adquiere un color amarillo

traslucido, es gelatinoso y muy jugoso, contiene dos semillas ovaladas de color blanco (Morton, 1987). El fruto y su clasificación se muestran en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica de *Melicoccus bijugatus* Jacq. (huaya)

<i>Melicoccus bijugatus</i> Jacq.	Clasificación taxonómica	
	Reino	Plantae
	Subreino	Tracheobionta
	Superdivisión	Spermatophyta
	División	Magnoliophyta
	Clase	Magnoliopsida
	Subclase	Rosidae
	Orden	Sapindales
	Familia	<i>Sapindaceae</i>
	Género	<i>Melicoccus</i> P. Br.
	Especie	<i>Melicoccus bijugatus</i> Jacq.

a. Racimo de huayas; b. Pulpa de huaya. Fuentes: Imágenes tomadas de PROTA; USDA, 2019

## 2. ANTECEDENTES

El estudio de los compuestos bioactivos de las cáscaras de *Annona squamosa* L. (saramuyo) y *Melicoccus bijugatus* Jacq. (huaya) son relativamente recientes. Can-Cauich y colaboradores determinaron el contenido de compuestos bioactivos de saramuyo y huaya, reportaron que el extracto metanólico de cáscara de saramuyo tiene altos contenidos de compuestos fenólicos (catequina, epicatequina, ácido clorogénico, *p*-hidroxibenzoico, elágico y cafeico) y flavonoides, así como una alta capacidad

antioxidante. Comparada con el saramuyo, el extracto metanólico de la cáscara de huaya presentó menor contenido de compuestos fenólicos, sin embargo, a diferencia del saramuyo presentó mayor contenido de ácido sinápico y cinámico (Can-Cauich *et al.*, 2017). Chel-Guerrero y colaboradores confirmaron dichos datos, adicionalmente determinaron la presencia cualitativa de varios metabolitos en las cáscaras de saramuyo y huaya. Reportaron que la presencia de antraquinonas, triterpenoides y azúcares reductores es alta en saramuyo, en la huaya, observaron moderada presencia de flavonoides, alcaloides y antraquinonas. Los autores también de evaluaron el efecto farmacológico del extracto metanólico de ambas cáscaras. El extracto de saramuyo mostró alta actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de colon humana HCT-116, además incrementó la susceptibilidad de vinblastina en una línea celular de cáncer de mama de MCF-7/Vin<sup>+</sup>. En el caso del extracto de huaya, mostró capacidad inhibitoria de la acetilcolinesterasa dependiente de la dosis (Chel-Guerrero *et al.*, 2018).

Con respecto al potencial antidiabético del saramuyo, en general, se ha estudiado en las hojas y raíces. Shirwaikar y colaboradores, evaluaron la actividad antidiabética de extractos acuosos y alcohólicos de hojas de saramuyo administrado a ratas sanas y ratas con DT2 inducidas con estreptozotocina (STZ) y nicotinamida. Ambos extractos disminuyeron la concentración de glucosa capilar durante una PTGO en las ratas sanas. Las ratas con DT2 recibieron un tratamiento de 12 días de cada extracto, ambos extractos disminuyeron considerablemente la concentración de glucosa en plasma en ayunas al final del tratamiento, encontrando mejor efecto en el extracto acuoso. Los autores proponen que ambos extractos potencian el efecto de insulina debido a que las células  $\beta$  pancreáticas existentes incrementaron la secreción de insulina. Además, la presencia de

fenoles y flavonoides presentes en las hojas podría ayudar a regular la concentración de glucosa capilar (Shirwaikar *et al.*, 2004; Shirwaikar *et al.*, 2008). Gupta y colaboradores reportaron que la administración de extractos etanólicos de hojas de saramuyo (350 mg/Kg) a ratas sanas reducía el nivel de glucosa en sangre en ayunas en un 6.0%, mientras que el nivel máximo de glucosa en sangre durante una PTGO se redujo en un 17.1%. En ratas con DT1 inducidas por la administración STZ se observó una disminución del 13.0% de la glucosa en ayunas y una mejora en la tolerancia a la glucosa de 37.2% durante la PTGO. En esta misma investigación, después de 10 días de tratamiento, en ratas con DT1 mostraron una disminución del 37.3% en el nivel de glucosa en ayunas (Gupta *et al.*, 2005).

Kaleem y colaboradores reportaron que el extracto acuoso de hojas de saramuyo administrado durante 30 días a ratas con DT1 inducida con STZ redujo significativamente los niveles de glucosa, proponen que este efecto se debe al aumento de la supervivencia de las células  $\beta$  pancreáticas lo que en consecuencia mejora la secreción de insulina. También reportaron que disminuye los niveles de HbA<sub>1C</sub> y lípidos en sangre, así como la lipoperoxidación. Además, incrementa la actividad de enzimas antioxidantes superóxido diamutasa (SOD) catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en hígado y riñón (Kaleem *et al.*, 2006). En un trabajo posterior, los autores comprobaron el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y proponen que puede deberse al aumento de la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas o al mejoramiento del transporte de glucosa en sangre hacia tejidos periféricos. También reportan que aumentan los niveles de péptido C e insulina, disminuyen los niveles de urea, ácido úrico y creatinina. Además, enzimas marcadoras de daño hepático como la fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y

alanina aminotransferasa (ALT) se restauran a niveles cercanos al control (Kaleem *et al.*, 2008).

Mohd y colaboradores reportan que la administración del extracto acuoso de raíz de saramuyo en ratas diabéticas inducidas por STZ reduce las concentraciones de glucosa en sangre significativamente en la dosis de 500 mg/Kg después de 6 h, los autores proponen que el extracto puede estimular la secreción de insulina (Mohd *et al.*, 2009).

Actualmente no existen estudios con respecto al efecto antidiabético de huaya, sin embargo, se ha reportado que tiene otras actividades biológicas. El fruto exhibe propiedades laxantes debido a la presencia de derivados de ácidos ferúlicos (Badary *et al.*, 2006; Mitra *et al.*, 2002). Compuestos fenólicos presentes en el fruto como el ácido *p*-cumárico y el cafeico son funcionales en el tratamiento de hipertensión, además el ácido *p*-cumárico proporciona actividad antiplaquetaria (Luceri *et al.*, 2007). También en el fruto se ha reportado la presencia de metilciclopropilglicina (MCPG) e hipoglicina A (HGA), aminoácidos hipoglucémicos encontrados igualmente en otros frutos de la familia *Sapindaceae*. Dichos aminoácidos han sido relacionados con la encefalopatía hipoglucémica aguda (Sanford *et al.*, 2019).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La diabetes es una enfermedad que afecta a gran parte de la población mundial, por lo que actualmente se considera como un problema de salud pública. Se sabe que varios países invierten parte de su presupuesto en salud (Cho *et al.*, 2017) para programas que ayuden a prevenir y ofrecer tratamientos eficaces.

Por otro lado, en la medicina tradicional ha sido posible utilizar productos naturales extraídos de las distintas estructuras de la planta que tienen efecto farmacológico, esto, debido que contienen distintos compuestos químicos que le confieren dicho efecto. En este contexto, se ha reportado que las cáscaras de saramuyo y huaya concentran varios compuestos fenólicos como catequina, epicatequina, ácidos *p*-hidroxibenzoico, elágico, cafeico, clorogénico, sinápico y cinámico (Can-Cauich *et al.*, 2017), algunos de estos compuestos contribuyen en el tratamiento de diabetes, por ejemplo, se ha observado que el ácido cafeico disminuye la producción de glucosa hepática, inhibiendo la sobreproducción de esta (Jung *et al.*, 2006), el ácido clorogénico reduce la glucemia debido a que atenúa la absorción intestinal de glucosa (Bassoli *et al.*, 2008) y mejora la sensibilidad de la insulina a través de una señalización mediada por el receptor de adiponectina (Jin *et al.*, 2015), el ácido sinápico mejora la hiperglucemia a través de señales de fosfolipasa C – proteína cinasa C para mejorar la utilización de glucosa (Cherng *et al.*, 2013). En el caso particular de las cáscaras de saramuyo y huaya, se ha reportado que tienen actividad farmacológica, por ejemplo, capacidad antiproliferativa y antioxidante en el saramuyo y efecto anticolonesterasa en huaya (Chel-Guerrero *et al.*, 2018). En conjunto, el contenido de compuestos químicos y los efectos farmacológicos descritos previamente, resulta de interés científico evaluar si las cáscaras de estos frutos poseen efecto modulador en los niveles de glucosa capilar.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los liofilizados de cáscaras de saramuyo y huaya reducirán la glucosa capilar en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto modulador de glucosa de liofilizados de cáscaras de saramuyo y huaya en ratas sanas y ratas diabéticas

### **5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar el perfil fitoquímico de cáscaras de saramuyo y huaya
2. Evaluar el efecto antihiper glucemiante de cáscaras de saramuyo y huaya en ratas sanas Wistar macho
3. Evaluar el efecto hipogluce miente de cáscaras de saramuyo saramuyo y huaya en un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar macho

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Material biológico**

Las muestras de fruto de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y huaya (*Melicoccus bijugatus* Jacq.) fueron adquiridos e identificados taxonómicamente en el Instituto Tecnológico de Mérida.

### **6.2 Obtención de liofilizados de cáscaras**

Las cáscaras de cada fruto se obtuvieron manualmente y se deshidrataron en una liofilizadora Labconco Modelo 6 (Labconco, MO, USA) a 0.04 mBar y 5° C durante 48 h. Posteriormente se trituraron de forma manual hasta obtener polvo que fue almacenado a -20° C hasta su análisis.

#### *6.2.1 Obtención de extractos*

La extracción de los compuestos se realizó mediante maceración metanólica, en donde 1.5 g de cáscara liofilizada se adicionaron 30 mL de metanol. Se mantuvo en maceración en una incubadora con agitación a 160 rpm durante 24 h a 25° C. El extracto metanólico (EM) se filtró y se almacenó en a -20° C hasta su análisis. Para la obtención del extracto metanólico seco (EMS), el macerado metanólico filtrado fue evaporado con ayuda de un rotavapor rotatorio (Buchi modelo R-3) a 40° C y 130 mBar.

## **6.3 Análisis fitoquímico**

### *6.3.1 Análisis químico cualitativo*

#### *6.3.1.1 Determinación de alcaloides*

La presencia de alcaloides en el EM se realizó mediante cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), una alícuota de cada extracto se aplicó en placas de sílica gel (60<sub>254</sub>, 5x1 cm, Merk), posteriormente se eluyeron con CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (95:5, v/v) y se revelaron con reactivo de Dragendorff. La formación de manchas rojo-marrón en las placas indican la presencia de alcaloides (Aarland *et al.*, 2015; Aarland *et al.*, 2016).

#### *6.3.1.2 Determinación de antraquinonas*

La presencia de antraquinonas en el EM se determinó mediante TLC, una alícuota de cada extracto se aplicó en placas de sílica gel (60<sub>254</sub>, 5x1 cm, Merk), enseguida, se eluyeron con CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (95:5, v/v) y finalmente se observaron bajo luz ultravioleta. La presencia de manchas fluorescentes amarillas o rojo-marrón en la placa bajo la luz ultravioleta indican la presencia de antraquinonas.

#### *6.3.1.3 Determinación de azúcares reductores*

La presencia de azúcares reductores en el EMS se determinó mediante la reacción de Fehling, brevemente, 25 mg de cada EMS de cáscara se disolvieron en 2 mL agua destilada, se utilizó glucosa y sacarosa como control positivo y negativo, respectivamente. A continuación, se adicionan 2 mL de la solución A (solución de cobre) y 2 mL de la solución B (solución alcalina). La mezcla se agitó ligeramente y se incubó a baño maría a 70° C durante 10 min. La presencia de precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores

#### *6.3.1.4 Determinación de cumarinas*

La presencia de cumarinas se determinó en el EMS. Dos mg de cada EMS de cáscara se disolvieron en 10 mL de agua destilada dentro de tubos de ensayo, cada tubo se cubrió con papel filtro saturado con una solución de NaOH, posteriormente, los tubos fueron calentados a 90° C durante 5 min. El papel filtro fue secado y expuesto a luz ultravioleta. La presencia de fluorescencia azul en el papel filtro indica la presencia de cumarinas volátiles (Aarland *et al.*, 2015; Aarland *et al.*, 2016).

#### *6.3.1.5 Determinación de saponinas*

La presencia de saponinas se determinó en el EMS. Dos mg de cada EMS de cáscara se disolvieron en 10 mL de agua destilada dentro de tubos de ensayo. A continuación, los tubos fueron calentados a 100°C durante 10 min. Se dejaron reposar hasta enfriar y finalmente se agitaron vigorosamente. La producción de espuma y su permanencia de al menos 20 min indica la presencia de saponinas (Aarland *et al.*, 2015; Aarland *et al.*, 2016).

#### *6.3.1.6 Determinación de taninos*

La presencia de taninos se determinó en el EMS. En tres tubos de ensayo se adicionó 2 mg EMS de cáscara. El primer tubo se agregó 10 mL de una solución de gelatina 1% (p/v), el segundo tubo se agregó 10 mL de una solución de gelatina 1% (p/v) y NaCl al 10% (p/v), por último, el tercer tubo se agregó 10 mL de una solución de NaCl al 10% (p/v). La formación de precipitado blanco en el primer y segundo tubo indican la presencia de taninos (Aarland *et al.*, 2015; Aarland *et al.*, 2016).

#### *6.3.1.7 Determinación de triterpenoides*

La presencia de triterpenoides se determinó mediante la prueba de Salkoswky. Dos mg de EMS de cáscara se mezcló con 1 mL de cloroformo, se agitó y enseguida se agregó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La formación de color rojo-marrón en la interfaz indica la presencia de triterpenoides (Nair & Roopalatha, 2013).

#### *6.3.2 Análisis químico cuantitativo*

##### *6.3.2.1 Cuantificación de fenoles totales*

El contenido de compuestos fenólicos en el EM se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con el método descrito por Singleton & Rossi (1965), brevemente, se diluyó 0.025 mL de EM de saramuyo con 0.975 mL de agua destilada y 0.25 mL de EM de huaya con 0.750 mL de agua destilada. A continuación, el extracto diluido fue transferido a un tubo de ensayo donde se adicionó 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% (v/v), se dejó incubar durante 1 min y enseguida se agregó 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5% (p/v). La mezcla se incubó durante 1 h en obscuridad y se cuantificó a una longitud de onda de 765 nm utilizando un espectrofotómetro (JENWAY 6705 UV/VIS). Se utilizó una curva estándar de ácido gálico como curva patrón. Cada ensayo

se realizó por triplicado y el contenido de fenoles totales se reportó como miligramos equivalentes de ácido gálico en 100 g de cáscara liofilizada (mg EAG/100 g CL).

#### *6.3.2.2 Cuantificación de flavonoides*

El contenido de flavonoides en el EM se determinó mediante el método descrito por Chang *et al.* (2002). Se adicionaron 0.5 mL de EM a un tubo de ensayo, a continuación se agregó 1.5 mL de metanol, 0.1 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10% (p/v), 0.1 mL de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 1M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se agitó e incubó en obscuridad durante 30 min. Los flavonoides totales se cuantificaron a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro (Thermo BIOMATE 3 UV/VIS). Se utilizó una curva estándar de quercitina para interpolar los resultados. Cada ensayo se realizó por triplicado y el contenido de flavonoides se reportó como miligramos equivalentes de quercitina en 100 g de cáscara liofilizada (mg EQ/100 g CL).

#### *6.3.2.3 Cuantificación de azúcares*

La cuantificación del contenido de glucosa, sacarosa y fructosa en el EMS se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés). 1 mg de EMS se disolvió en 1 mL de agua grado HPLC, posteriormente se condujeron a través de filtros de nylon de 0.45 µm. Las muestras diluidas de EMS y los estándares de glucosa, fructosa y sacarosa se inyectaron automáticamente en el sistema HPLC (marca Agilent Technology modelo 1260) con detector de índice de refracción. Se utilizó una columna Hi-Plex Ca Agilent (8% crosslinked, 7.7x300 mm, 8 µm, la fase móvil consistió en agua grado HPLC en modo isocrático con un flujo de 0.6 mL/min con una temperatura fija de 75° C. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de glucosa, fructosa y

sacarosa, el contenido de azúcares se expresó como miligramos del compuesto estándar en 100 g de cáscara liofilizada (mg/100 g CL) (Aarland *et al.*, 2015).

#### 6.3.2.4 *Cuantificación de ácidos orgánicos*

El contenido de ácido cítrico, málico, ascórbico y tartárico en el liofilizado se determinó mediante HPLC. En donde 2 mg de cáscara liofilizada se resuspendió en 2 mL de agua grado HPLC, se pasó a través de filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . La muestra y los estándares se inyectaron automáticamente en el sistema HPLC a través de una columna XTerra MS C18, 5  $\mu\text{m}$  (4.6x250 mm) y utilizando como fase móvil un amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 2.8) en modo isocrático con un flujo de 0.7 mL/min. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de ácido cítrico, málico, ascórbico y tartárico. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en miligramos del compuesto estándar en 100 g de cáscara liofilizada (mg/100 g CL).

#### 6.3.2.5 *Capacidad antioxidante*

La capacidad antioxidante del liofilizado se determinó utilizando el radical 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico, ABTS) descrito por Rivero-Pérez *et al.* (2007). Brevemente, se diluyó 5  $\mu\text{L}$  de EM de saramuyo en 995  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 75  $\mu\text{L}$  de EM de huaya en 925  $\mu\text{L}$  de agua destilada. A continuación, 0.1 mL de los extractos diluidos fueron transferidos a tubos de ensayo en donde enseguida se adicionó 1 mL de solución de ABTS, la mezcla se dejó en incubación durante 7 minutos en oscuridad y fue cuantificada en un espectrofotómetro (JENWAY 6705 UV/VIS) a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de ácido ascórbico.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los datos se expresaron como miligramo de equivalente de ácido ascórbico en 100 g de cáscara liofilizada (mg EAA/100 g de CL).

## **6.4 Actividad farmacológica**

### *6.4.1 Evaluación del efecto antihiper glucemiante en ratas sanas en una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO)*

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de alrededor 150-200 g y de 4 a 6 semanas de edad, las cuales estuvieron alojadas en una caja de acrílico con comida y agua *ad libitum* a una temperatura de 22° C en un ciclo de luz/obscuridad de 12/12. Todos los experimentos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Previo a la PTGO se llevó a cabo un ayuno de 14 h. Los animales fueron repartidos al azar y divididos en 8 grupos experimentales, con 6 individuos cada uno: Grupo 1: Control, CT (Glucosa 2g/Kg), Grupo 2: Metformina (300 mg/Kg), Grupos 3-5, liofilizados resuspendidos en agua potable de saramuyo en tres dosis (25 mg/Kg, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg) y Grupos 6-8, liofilizado resuspendidos en agua de huaya en tres dosis (25 mg/Kg, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg). Se midió el peso corporal y la glucosa basal (Tiempo 0) con ayuda de un glucómetro (Accu-chek® Roche), estas mediciones de glucosa capilar fueron obtenidas mediante una pequeña punción en la vena caudal. La metformina y liofilizados se administraron por vía oral usando una cánula intragástrica, 30 y 15 min, respectivamente, antes de la carga de glucosa anhidra. A continuación, las ratas recibieron una carga de glucosa (dextrosa anhidra, 2g/Kg) por vía oral con ayuda de una cánula intragástrica para rata. La glucosa se midió a los 30, 60, 90 y 120 minutos. La glucosa capilar se expresó como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EE) en mg/dL.

Con los resultados de glucemia durante la PTGO se calculó el área bajo la curva (ABC) utilizando el método del trapecio, el cual consiste en dividir el área total bajo la curva en pequeños segmentos individuales cuyas áreas se pueden determinar con precisión y posteriormente se suma el área de los segmentos individuales para obtener el área total bajo la curva la cual se encuentra expresado en mg/dL/min (Tai, 1994).

#### *6.4.2 Inducción de diabetes química en ratas*

Se utilizó el modelo de DT2 descrito por Oidor-Chan y colaboradores (2016). Brevemente, se utilizaron ratas Wistar macho neonatas (3-4 días de edad), las cuales se asignaron de manera aleatoria en 2 grupos: 1) Ratas sanas, a las cuales se les administró vía intraperitoneal una dosis única del vehículo (buffer citratos 0.1 M pH 4.5) y 2) Ratas diabéticas, a las cuales se les administró una dosis única de STZ (70 mg/Kg) utilizando como vehículo buffer citratos 0.1 M pH 4.5 por vía intraperitoneal. Una semana después de la administración de STZ se realizó un curso temporal de 8 semanas en donde se evaluó semanalmente el peso corporal y glucemia en condiciones de no ayuno utilizando un glucómetro (Accu-Chek Active, Glucotrend, Roche®), las muestras de sangre para la determinación de glucemia se obtuvieron de la vena caudal, mediante una punción en el extremo distal de la cola. La glucosa capilar sin ayuno y peso corporal durante el curso temporal se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EE) en mg/dL y gramos (g), respectivamente. En la semana 4 y 8 del curso temporal para ambos grupos se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa de 2 h (PTGO) utilizando glucosa anhidra (2 g/Kg) y una prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII), en donde previamente se llevó un ayuno de al menos 6 h, se midió el peso corporal y la glucosa

basal (Tiempo 0) y a continuación se administró insulina humana isofana (2 UI/Kg) (Aurax®), posteriormente se midió la glucosa capilar al minuto 30, 60, 90 y 120, la cual se encuentra expresada como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EE) en mg/dL.

#### *6.4.3 Evaluación del efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas*

Al término del curso temporal, ambos grupos: ratas sanas y ratas diabéticas, recibieron un tratamiento subcrónico de 14 d de los siguientes tratamientos: 1): Vehículo (agua potable), 2) Metformina (300 mg/Kg), 3) Saramuyo (100 mg/Kg), 4) Saramuyo (200 mg/Kg) y 5) Huaya (100 mg/Kg), con 12 animales cada uno (6 ratas sanas y 6 ratas diabéticas). Cada tratamiento subcrónico se administró durante la mañana por vía oral utilizando una cánula intragástrica para rata. Al finalizar cada tratamiento se evaluó el peso corporal y los niveles de glucosa capilar en condiciones de no ayuno utilizando un glucómetro (Accu-Chek Active, Glucotrend, Roche®). Posteriormente se realizó una PTGO y una PTII. Durante el tratamiento los animales se mantuvieron alojados en cajas de acrílico con comida y agua *ad libitum* a una temperatura de 22° C en un ciclo de luz/obscuridad de 12/12. Todos los experimentos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

#### **6.5 Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (EE), en el caso de los resultados de la caracterización fitoquímica cualitativa. Para analizar las diferencias estadísticas en las PTGO, ABC y PTII se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba *pos hoc* de Tukey. Para analizar las diferencias estadísticas de ratas sanas y ratas diabéticas durante el curso temporal se realizó una

prueba de *t de student*. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos. Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 24.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Análisis fitoquímico cualitativo

El análisis cualitativo ayuda en la identificación de analitos blanco, según sus características químicas, es decir, nos permite conocer el espectro que estos poseen. Actualmente, ha crecido el interés en examinar la composición química de las distintas plantas, especialmente en aquellas que poseen un uso terapéutico. Se ha nombrado como “huellas químicas” al perfil característico que refleja la composición química compleja de la muestra analizada, estas señales químicas que se logran identificar en las muestras se pueden obtener mediante espectrofotometría, cromatografía y técnicas electroquímicas (Parastar, 2015).

En la primera fase de este trabajo se realizó un análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico (EM) o el extracto metanólico seco (EMS) de las cáscaras de saramuyo y huaya (**Tabla 5**), los resultados fueron expresados de acuerdo con una escala hedónica, donde se comparó visualmente lo observado en las muestras con un estándar cuya presencia de estos compuestos es conocida, se clasificó como “abundante”, “moderada”, “poca” o “ausente” la presencia de cada compuesto.

La presencia de compuestos analizados en las cáscaras de ambas especies es heterogénea, en la cáscara de saramuyo se determinó la presencia de más compuestos comparado con la cáscara de huaya. La presencia de antraquinonas fue abundante en ambas cáscaras. Además de antraquinonas, en saramuyo se observó de forma

abundante la presencia de taninos, moderada de azúcares reductores y triterpenoides, y pocas saponinas. En la cáscara de huaya, por su parte, se determinó presencia abundante de azúcares reductores, no se detectó cumarinas, saponinas y taninos. En ambas cáscaras no se encontraron alcaloides. En resultados publicados por Chel-Guerrero *et al.* (2018), en donde evaluó el potencial farmacológico de extractos de 4 cáscaras de frutos tropicales, entre ellos saramuyo y huaya, coinciden los compuestos encontrados en saramuyo, a excepción de la presencia de taninos, ya que en este estudio se encontró abundante la presencia de taninos. Con respecto a la huaya, los mismos autores reportaron la presencia moderada de taninos, sin embargo, no se encontró presencia de dichos compuestos en las muestras procesadas en este trabajo.

**Tabla 5.** Análisis químico cualitativo de cáscaras de saramuyo y huaya.

Tipo de compuesto	<i>Material biológico</i>	
	Saramuyo	Huaya
Alcaloides <sup>A</sup>	-	-
Antraquinonas <sup>A</sup>	+++	+++
Azúcares reductores <sup>B</sup>	++	+++
Cumarinas <sup>A</sup>	-	-
Saponinas <sup>B</sup>	+	-
Taninos <sup>B</sup>	+++	-
Triterpenoides <sup>B</sup>	++	+

<sup>A</sup>Extractos metanólicos y <sup>B</sup>extractos metanólicos secos de cáscara de saramuyo y huaya. Parámetros cualitativos: (-) No detectado; (+) Poco presente; (++) Moderadamente presente; (+++) Presente de manera abundante

La diferencia en la presencia de algunos compuestos en estos resultados y en los obtenidos por Chel-Guerrero *et al.* (2018) a pesar de ser las mismas especies podría deberse a que la distribución de metabolitos presentes en una planta no solo está dado a la diversidad de compuestos contenidos, sino que también involucra la diversidad de patrones de acumulación de metabolitos debido a factores genéticos y ambientales (Wang *et al.*, 2019).

Varios de los compuestos encontrados se ha reportado que tienen uso terapéutico en diabetes, por ejemplo, en *Cassia obtusifolia* se ha encontrado que la alaternina y emodina, dos antraquinonas ampliamente estudiadas, incrementan la entrada de glucosa en líneas celulares HepG2 humanas, esto, mediante la inhibición competitiva de PTP1B (un regulador negativo de la transducción de la señal de insulina) (Jung *et al.*, 2016). Sólo en la cáscara de saramuyo se encontró abundante presencia de taninos, en el cual ha sido descrito ampliamente el potencial terapéutico en el tratamiento de las complicaciones generadas por diabetes (retinopatía, nefropatía, neuropatías) (Laddha & Kulkarni, 2018). Es en este contexto en donde resalta la importancia del estudio de la composición química de las cáscaras debido a que podrían presentar un importante potencial para encontrar blancos terapéuticos en el tratamiento de diabetes.

## **7.2 Análisis fitoquímico cuantitativo**

### *7.2.1 Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante*

Las frutas son una importante fuente de polifenoles para la dieta, por lo que es fundamental una adecuada cuantificación de estos compuestos. Los compuestos fenólicos totales (CFT) en el extracto metanólico de cáscaras de saramuyo y huaya se

obtuvieron mediante el método colorimétrico del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual es ampliamente utilizado para la determinación de dichos compuestos (**Tabla 6**). Se observó que el extracto metanólico de saramuyo contiene mayor nivel de CFT siendo de  $499.51 \pm 3.04$  mg EAG/100 g de CL, comparado con huaya de  $23.34 \pm 0.11$  mg EAG/100 g de CL, es decir, casi 22 veces más compuestos fenólicos en saramuyo que en huaya. Can-Cauich *et al.* (2017) y Chel-Guerrero *et al.* (2018), ambos trabajos evaluaron el contenido de compuestos bioactivos de cáscaras de frutos tropicales provenientes de sureste de México, dichos autores coinciden en que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encuentra las cáscaras de saramuyo.

**Tabla 6.** Evaluación del contenido de fenoles totales y flavonoides de extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y huaya.

<b>Compuestos polifenólicos</b>	<i>Material biológico</i>		
	<b>total<sup>A</sup></b>	<b>Saramuyo</b>	<b>Huaya</b>
Fenoles totales <sup>a</sup>		$499.51 \pm 3.04$	$23.34 \pm 0.11$
Flavonoides <sup>b</sup>		$8.19 \pm 0.11$	$11.13 \pm 0.18$

<sup>A</sup>Extractos metanólicos de cáscara de saramuyo, huaya. <sup>a</sup>Compuestos fenólicos totales en mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de cáscara liofilizada (mg EAG/100 g de CL). <sup>b</sup>Flavonoides totales en mg equivalentes de quercetina en 100 g de cáscara liofilizada (mg EQ/100 g de CL), media  $\pm$  EE (n= 6-9).

Los CFT en la cáscara de saramuyo reportados por Can-Cauich *et al.* (2017) y Chel-Guerrero *et al.* (2018) fueron de  $7.03 \pm 0.32$  g EAG/100 g peso seco y  $2,110.6 \pm 181.88$  mg EAG/100 g de extracto metanólico seco, respectivamente.

Por otro lado, en huaya, el contenido de CFT fue de  $23.34 \pm 0.11$  mg EAG/100 g CL, siendo menor a lo obtenido en la cáscara de saramuyo. Can-Cauich *et al.* (2017) y Chel-Guerrero *et al.* (2018) reportaron que el contenido de CFT de la cáscara de huaya fue de:

0.37 ± 0.03 g EAG/100 g peso seco y 513.37 ± 72.83 mg EAG/100 g de extracto metanólico seco, respectivamente. Estas diferencias, podrían deberse al tipo de extracto utilizado, es decir, la evaporación al vacío subsecuente a la obtención del extracto metanólico utilizado por los autores mencionados mejora la concentración de compuestos bioactivos (Mahour, 2016). Comparando el CFT reportado en hojas, corteza, raíz y embriones de saramuyo, Mariod *et al.* (2012) reporta que el extracto metanólico de raíz contiene mayor CTP siendo de 171.5 mg EAG/g de extracto vegetal, seguido por la corteza, hoja y finalmente el embrión (167.9, 93.6 y 75.6 mg AG/g de extracto vegetal, respectivamente). Por su parte, Bystrom *et al.* (2009) reportan que la testa de huaya contiene mayor CTP comparado con la pulpa y embrión, siendo de: 183.1 ± 3.6, 21.8 ± 0.5 y 24.8 ± 0.2 mg EAG/g extracto, respectivamente.

Con respecto al contenido total de flavonoides (**Tabla 6**), se encontraron 8.19 ± 0.11 y 11.13 ± 0.18 mg EQ/100 g de CL, en cáscaras de saramuyo y huaya, respectivamente, siendo ésta última en donde se encontró mayor contenido de flavonoides. Dichos resultados difieren a lo reportado por Can-Cauich *et al.* (2017) en donde el contenido de flavonoides fue de 5.04 ± 0.26 y 0.43 ± 0.0 g de EQ/100 g de peso seco.

Al igual que el contenido de compuestos fenólicos, las diferencias en el contenido de flavonoides podrían deberse al proceso de evaporación al vacío o también al grado de madurez del fruto al momento de cosecha, a diferencias genéticas y/o condiciones ambientales durante el desarrollo del fruto. Comparando el contenido de flavonoides en otras estructuras, Mariod *et al.* (2012) reportan que el contenido de flavonoides es mayor en extractos metanólicos de hojas de saramuyo (226.6 mg ER/ g extracto vegetal) seguido la raíz, corteza y embrión (106.6, 102.5 y 27.6 mg R/ g extracto vegetal). Con

respecto huaya, no existen estudios acerca del contenido de flavonoides en otras estructuras anatómicas, sin embargo, Bystrom *et al.* (2008) estudiaron el contenido de flavonoides mediante LC-MS/MS (HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem), reportando que el embrión contiene principalmente flavonoides incluyendo epicatequina, catequina, epigallocatequina, procianidinas de tipo B (dímeros), naringenina, derivados de naringenina, floretina, floridina, quercetina, miricetina y resveratrol, mientras que los flavonoides presentes en la testa fueron procianidinas, especialmente trímeros y dímeros.

El contenido de compuestos polifenólicos está relacionado con la actividad antioxidante. Los antioxidantes son moléculas capaces de inactivar diferentes radicales y la acción de éstos, por lo que juegan un papel importante como un sistema de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (Haminiuk *et al.*, 2012).

La capacidad antioxidante de extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y huaya se determinó mediante el ensayo de ABTS (**Tabla 7**), en donde se encontró que la cáscara de saramuyo posee mayor capacidad antioxidante comparada con la de huaya ( $354.27 \pm 3.89$  y  $26.25 \pm 0.49$  mg EAA/100 mg de CL, respectivamente). La capacidad antioxidante reportada por Can-Cauich *et al.* (2017) en las cáscaras de saramuyo y huaya se encuentran expresada en equivalentes de trolox:  $39.1 \pm 1.87$  y  $1.49$  mM trolox/100 g peso seco, respectivamente, cabe mencionar que se ha observado que el uso de trolox como estándar antioxidante tiene menor impacto en el número de electrones intercambiados, lo que lo confirma como el estándar más adecuado (Abramovič *et al.*, 2018).

En este contexto resulta importante destacar que una dieta la ingesta de una dieta rica en antioxidantes puede reducir el estrés oxidante y, por lo tanto, disminuir el riesgo de sufrir las complicaciones relacionadas con DT2 (van der Schaft *et al.*, 2019).

**Tabla 7.** Capacidad antioxidante de cáscaras de saramuyo y huaya.

Capacidad antioxidante <sup>A</sup>	Material biológico	
	Saramuyo	Huaya
ABTS <sup>a</sup>	354.27 ± 3.89	26.25 ± 0.49

<sup>A</sup>Extractos metanólicos de cáscara de saramuyo y huaya. <sup>a</sup>Capacidad antioxidante en mg equivalentes de ácido ascórbico en 100 g de cáscara liofilizado (mg EAA/100 mg de L), media ± EE (n= 9).

### 7.2.2 Contenido de azúcares

La capacidad de síntesis de azúcares solubles representa una de las características principales de la fisiología de las plantas. Los azúcares cumplen un gran número de funciones esenciales: son fuente general de energía metabólica, sirven como precursores para la síntesis de almidón y celulosa, y son un punto de partida metabólico para la síntesis de carboxilato y aminoácidos (Flügge & Schroeder, 2007). Normalmente, en los frutos, los azúcares encontrados son principalmente fructosa, glucosa y sacarosa, esta última es almacenada en vacuolas. Sin embargo, estos azúcares pueden difundir fácilmente a través del citosol debido al espacio libre generado por el ablandamiento de paredes durante la maduración del fruto. El contenido de azúcares en la cáscara de saramuyo y huaya (**Tabla 8**) se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés). El monosacárido predominante en saramuyo fue la fructosa (732.13 ± 93.20 mg/100 mg CL) seguido por la glucosa (404.24 ± 41.96 mg/100 mg CL) y no se detectó presencia de sacarosa. De forma similar, en la cáscara de huaya,

predomina la fructosa ( $1697.18 \pm 202.33$  mg/100 mg CL) y en menor proporción la glucosa y sacarosa ( $341.19 \pm 71.69$  y  $214.93 \pm 58.28$  g/100 mg CL, respectivamente) siendo la sacarosa el azúcar de menor proporción. La cáscara de saramuyo parece tener mayor contenido de azúcares totales, comparado con la cáscara de huaya. Chel-Guerrero *et al.* (2018) reportaron el contenido de azúcares de cáscaras de saramuyo y huaya, sus resultados coinciden en la ausencia de sacarosa y el mayor contenido de azúcares en saramuyo comparado con huaya, sin embargo, es contrario a lo encontrada en huaya, ya que refiere que el azúcar predominante es la fructosa. La cantidad de azúcares en este estudio difieren (saramuyo: glucosa y fructosa  $0.09 \pm 0.00$  y  $0.10 \pm 0.00$  g/100 g extracto seco, respectivamente y huaya: sacarosa, glucosa y fructosa  $0.04 \pm 0.00$ ,  $0.08 \pm 0.00$  y  $0.15 \pm 0.00$  g/100 g extracto seco, respectivamente).

**Tabla 8.** Contenido de azúcares totales de cáscaras de saramuyo y huaya.

Azúcares totales <sup>A</sup>	Material biológico	
	Saramuyo	Huaya
Sacarosa	Nd	$214.93 \pm 58.28$
Glucosa	$404.24 \pm 41.96$	$341.19 \pm 71.69$
Fructosa	$732.13 \pm 93.20$	$1697.84 \pm 202.33$
Total	1136.37	2253.96

<sup>A</sup>Extracto metanólico seco de cáscara de saramuyo y huaya. <sup>a</sup>Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en mg de compuesto en 100 g de cáscara liofilizada (mg/100 g CL), media  $\pm$  EE (n=3), Nd= no detectado.

Pal & Kumar (1995) reportan que el fruto de saramuyo durante la fase de madurez comercial contiene un 15% de azúcares totales. En contraste, Bystrom *et al.* (2008) reporta que en la pulpa de huaya, el contenido de sacarosa es mayor con respecto a

glucosa y fructosa, estas dos, en valores muy similares ( $7.72 \pm 0.11$ ,  $1.71 \pm 0.08$  y  $1.72 \pm 0.06$  g/100 g de tejido fresco), de manera similar, en embrión, el azúcar predominante es la sacarosa, seguido por fructosa y finalmente glucosa ( $2.26 \pm 0.12$ ,  $0.32 \pm 0.01$  y  $0.04 \pm 0.00$  g/100 g de tejido fresco, respectivamente).

### *7.2.3 Contenido de ácidos orgánicos*

El contenido de ácidos orgánicos y sus derivados en frutos carnosos tienen importantes consideraciones en la dieta, debido a que afectan junto con los azúcares el sabor del fruto y en algunos casos su conveniencia para el procesamiento de varios productos a base de frutos. Un ácido orgánico es una molécula que se disocia en una solución acuosa para liberar uno o más protones. El grado de disociación depende del ácido y el pH de la solución en que fue disuelto, en el citoplasma (pH alto) muchos ácidos orgánicos están presentes principalmente como anión mientras que en vacuola (pH bajo) se encuentra una mayor proporción de ácidos sin disociar (Walker & Famiani, 2018). El contenido de ácidos orgánicos (**Tabla 9**) se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés). Los tiempos de retención para los ácidos encontrados fueron: 3.8 min para ácido tartárico, 4.6 min para ácido málico, 5.2 min para ácido ascórbico y 6.4 min para ácido cítrico. El contenido de ácidos es muy heterogéneo entre ambas cáscaras, los ácidos orgánicos predominantes en saramuyo fueron el málico y cítrico ( $16548.55 \pm 203.76$  y  $13919.07 \pm 492.11$  mg/100 g CL), mientras que en huaya fue el tartárico ( $21878.59 \pm 366.36$  mg/100 g CL), y el ácido ascórbico fue el de menor concentración para ambas cáscaras ( $3023.07 \pm 73.83$  y  $1744.14 \pm 36.80$  mg/100 g CL, en saramuyo y huaya, respectivamente). Coincide parcialmente a lo encontrado por Chel-

Guerrero *et al.* (2018), ya que reportan que el ácido predominante en las cáscaras es el ácido cítrico ( $19.84 \pm 0.13$  y  $91.68 \pm 0.7$  mg/100 de extracto seco, saramuyo y huaya, respectivamente), sin embargo, reportan la presencia de ácido oxálico en saramuyo ( $2.63 \pm 0.02$  mg/100 g extracto seco) y es ausente el ácido tartárico en ambas cáscaras.

**Tabla 9.** Contenido de ácidos orgánicos de cáscaras de saramuyo y huaya.

Ácidos orgánicos <sup>A</sup>	Material biológico	
	Saramuyo	Huaya
Ascórbico <sup>a</sup>	$3023.07 \pm 75.83$	$1744.14 \pm 36.80$
Cítrico <sup>a</sup>	$13919.07 \pm 492.11$	$9144.31 \pm 591.58$
Málico <sup>a</sup>	$16548.55 \pm 203.76$	$10431.05 \pm 659.52$
Tartárico <sup>a</sup>	$5261.92 \pm 34.58$	$21878.59 \pm 366.36$

<sup>A</sup>Liofilizado de cáscara de saramuyo y huaya. <sup>a</sup>Contenido de ácido ascórbico, cítrico, málico y tartárico en mg de compuesto en 100 g de cáscara liofilizada (mg/100 g de CL), media  $\pm$  EE (n= 4)

Lee *et al.* (2013) reporta que en el fruto de saramuyo el ácido predominante es el málico, seguido por el cítrico y succínico ( $0.768 \pm 0.012$ ,  $0.706 \pm 0.004$  y  $0.411 \pm 0.004$  g/100 mL de fruto, respectivamente).

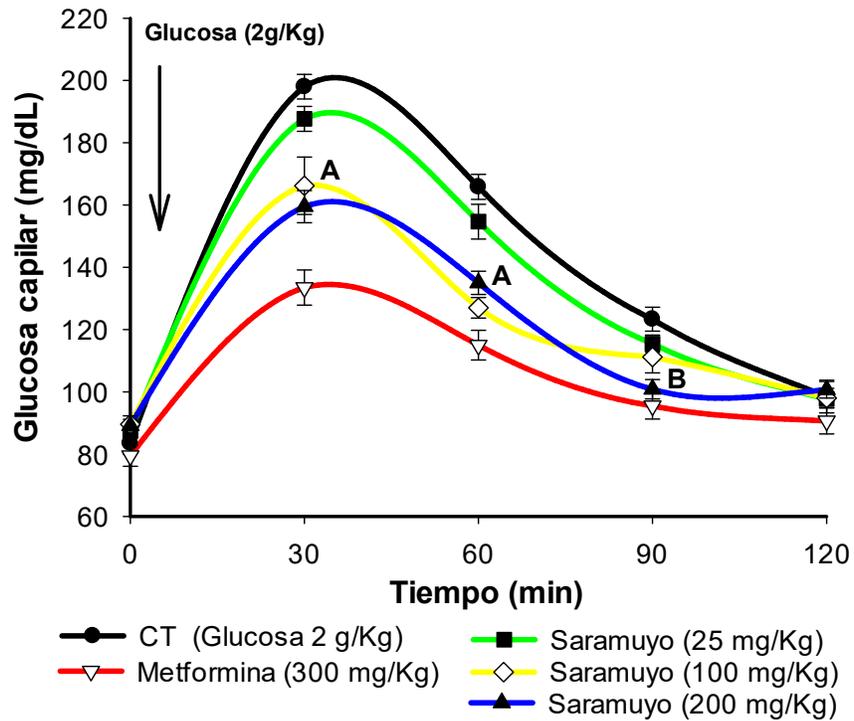
## 7.3 Actividad farmacológica

### 7.3.1 Evaluación del efecto antihiper glucemiante en ratas sanas en una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO)

Una prueba de tolerancia a la glucosa sirve para determinar la capacidad de una persona/animal para manejar una carga de glucosa. Este tipo de prueba permite saber si la persona/animal puede metabolizar una cantidad estandarizada de glucosa al medir las concentraciones de glucosa capilar (Eyth *et al.*, 2020). Este tipo de prueba es

ampliamente utilizada para el diagnóstico de prediabetes, DT2 y diabetes gestacional. Mediante una PTGO se determinó el efecto antihiper glucemiante en ratas sanas de liofilizados de cáscaras de saramuyo y huaya, se utilizó como control positivo una biguanida con efecto antihiper glucémico (metformina, 300 mg/Kg) y como control al grupo que fue administrado únicamente con la carga de glucosa (2 g/Kg).

Se evaluaron 3 dosis de liofilizado de saramuyo, 25, 100 y 200 mg/Kg (**Figura 2**) las dosis de 100 y 200 mg/kg mostraron efectos antihiper glucemiantes siendo estadísticamente significativas en los tiempos 30 y 60 min con respecto al grupo CT (Glucosa 2 g/Kg), sin embargo, ambas dosis también fueron diferentes con respecto al control positivo (Metformina 300 mg/Kg) a los mismos tiempos. Esta diferencia desaparece en la dosis de 100 mg/kg a los 90 min y solo la dosis de 200 mg/Kg continúa siendo diferente con respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que la dosis de 200 mg/Kg de liofilizado tiene mejor efecto antihiper glucemiante. Shirwaikar *et al.* (2004) evaluaron el efecto anti-hiper glucemiante en ratas sanas de extractos alcohólicos de hojas de saramuyo en dos dosis (250 y 500 mg/Kg), encontraron que la dosis de 500 mg/Kg tiene mejor efecto antihiper glucemiante en una PTGO observándose niveles de glucosa de  $86.1 \pm 1.22$  y  $66.33 \pm 2.33$  mg/gL al minuto 60 y 120, respectivamente. Los niveles de glucemia encontrados en la cáscara liofilizada de saramuyo difieren a lo encontrado en los extractos alcohólicos de hojas,

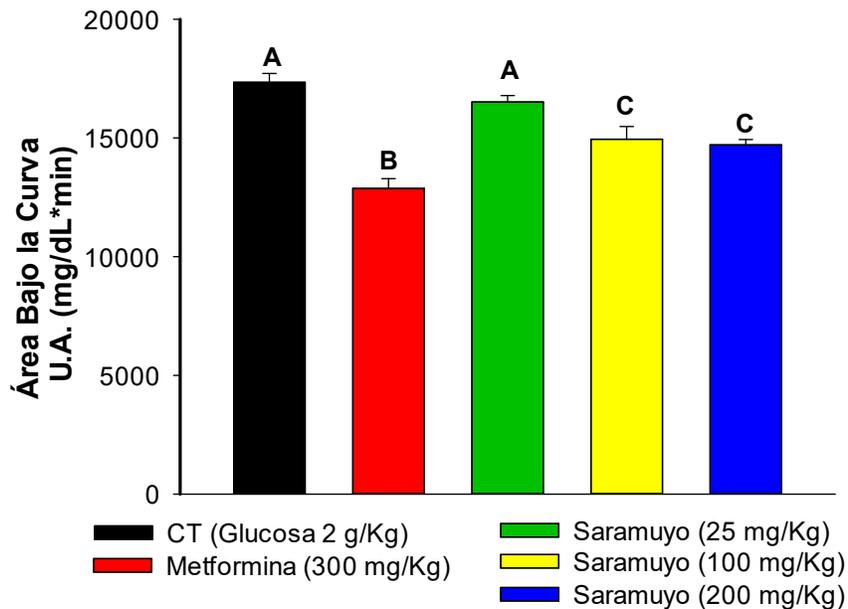


**Figura 2. Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) de 3 dosis de liofilizado saramuyo.**

**A=** Indican diferencias significativas de CT (Glucosa 2g/Kg) vs Saramuyo 100 y 200 mg/Kg en 30 y 60 min;

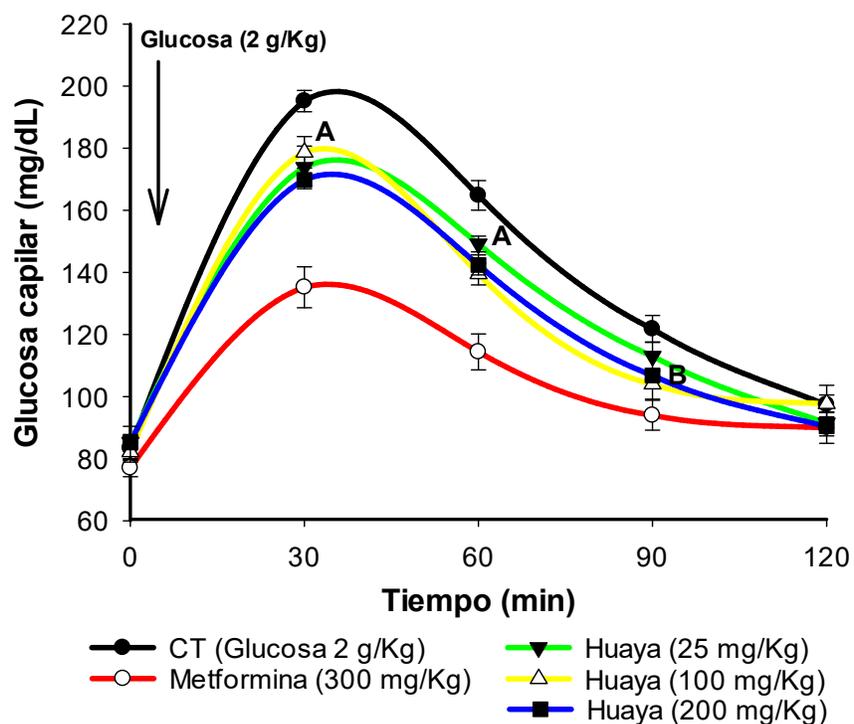
**B=** Indica diferencia significativa CT (Glucosa 2g/Kg) vs Saramuyo 200mg/Kg en 90 min. ANOVA de una vía seguido de una prueba *pos hoc* de Tukey. media  $\pm$  EE (n= 5-6,  $p < 0.05$ ).

La PTGO representada como el área bajo la curva (ABC) (**Figura 3**) se observa que metformina tiene la menor ABC y es significativamente diferente con respecto a las 3 dosis de liofilizado de cáscara de saramuyo. De la misma forma, el grupo control es estadísticamente diferente a las 3 dosis de liofilizado y el grupo CT (Glucosa 2 g/Kg). Existen diferencias significativas entre la dosis de 25 mg/Kg con respecto a las dosis de 100 y 200 mg/Kg.



**Figura 3. Área bajo la curva de 3 dosis de liofilizado de saramuyo.** Letras diferentes indican diferencias significativas. ANOVA de una vía seguido de una prueba *pos hoc* de Tukey, media  $\pm$  EE (n=5-6, p<0.05).

Con respecto a la administración de las 3 dosis de liofilizado de huaya (**Figura 4**) las tres dosis, 25, 100 y 200 mg/Kg mostraron efecto antihyperglucemiante, siendo significativamente diferente a los 30 y 60 min de la PTGO con respecto al grupo CT (Glucosa 2 g/Kg). Al minuto 90, solo las dosis de 100 y 200 mg/Kg son estadísticamente significativas con respecto al grupo CT (Glucosa 2 g/Kg). Estos resultados sugieren que las dosis de 100 y 200 mg/Kg de liofilizado de cáscara de huaya tienen mejor efecto antihyperglucemiante.

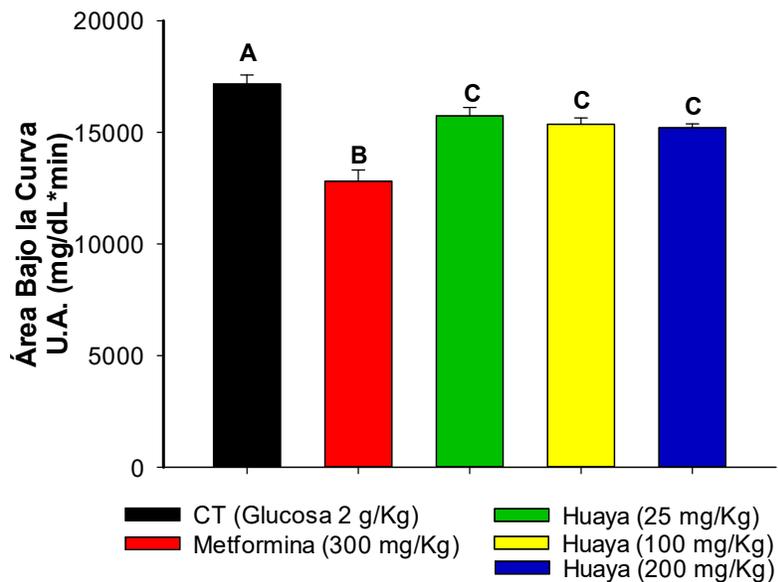


**Figura 4. Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) de 3 dosis de liofilizado de huaya.**

**A=** Indica diferencias significativas de CT (Glucosa 2 g/Kg) vs Huaya 25, 100 y 200 mg/Kg en 30 y 60 min;

**B=** Indica diferencias significativas CT (Glucosa 2 g/Kg) vs Huaya 100 y 200 mg/Kg. ANOVA de una vía seguido de una prueba *pos hoc* de Tukey. media  $\pm$  EE (n=5-6,  $p < 0.05$ ).

En el ABC de la PTGO de las dosis de liofilizado de cáscara de huaya (**Figura 5**) que las 3 dosis tienen un ABC similar, la cual es significativamente diferente con respecto al grupo CT (Glucosa 2 g/Kg) y metformina.



**Figura 5. Área bajo la curva de 3 dosis de liofilizado de huaya.** Letras diferentes implican diferencias significativas. ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey, media  $\pm$  EE (n=5-6, p<0.05).

Las cáscaras de saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 y 200 mg/Kg) obtuvieron el mejor efecto antihiper glucemiante, en otras palabras, disminuyeron la hiperglucemia posprandial generada por una carga alta de glucosa (2 g/Kg).

Los compuestos fenólicos son metabolitos que han recibido mucha atención no solo por su efecto antioxidante, si no por su potencial para disminuir la hiperglucemia posprandial, ya que pueden inhibir a la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, enzimas encargadas de la digestión de carbohidratos (como el almidón y amilopectina), por lo que se evita el aumento de glucosa, al retrasar su tasa de absorción a nivel intestinal (Ali-Asgar, 2013).

En la **tabla 10** se encuentra el contenido de compuestos fenólicos de la cáscara de saramuyo y huaya reportados por Can-Cauch *et al.* (2017). Saramuyo presenta alto

contenido de catequina, ácido clorogénico y epicatequina, mientras que, en huaya, es el ácido sináptico.

**Tabla 10.** Contenido de compuestos fenólicos en cáscaras de saramuyo y huaya (Tomado y modificado de Can-Cauich *et al.*, 2017)

<b>Compuesto fenólico (mg/100 g peso seco)</b>	<b>Saramuyo</b>	<b>Huaya</b>
Ácido gálico	16.09 ± 0.098	Nd
Ácido clorogénico	319. ± 0.938	Nd
Catequina	1379.41 ± 48.44	7.91 ± 0.70
Epicatequina	215.70 ± 16.16	78.00 ± 21.62
Ácido p-hidrobenczoico	85.57 ± 2.998	9.67 ± 0.83
Ácido cafeíco	9.53 ± 1.36	Nd
Ácido elágico	42.40 ± 0.75	Nd
Ácido sináptico	2.83 ± 0.006	160.69 ± 3.01
Miricetina	1.21 ± 0.001	Nd
Quercitina	1.04 ± 0.002	Nd
Ácido trans-cinámico	Nd	7.27 ± 0.13
Crisina	3.56 ± 0.42	Nd

Nd = No detectado

Ambas cáscaras presentan catequina, epicatequina, ácido p-hidrobenczoico y ácido sináptico. Yilmaser- Musa *et al.* (2012) las catequinas (catequina (C), epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galocatequina galato (GCg), epicatequina galato (ECg) presentes en la semilla de uva inhiben a la  $\alpha$ -amilasa ( $IC_{50} = 8.7 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ ) y a la  $\alpha$ -glucosidasa

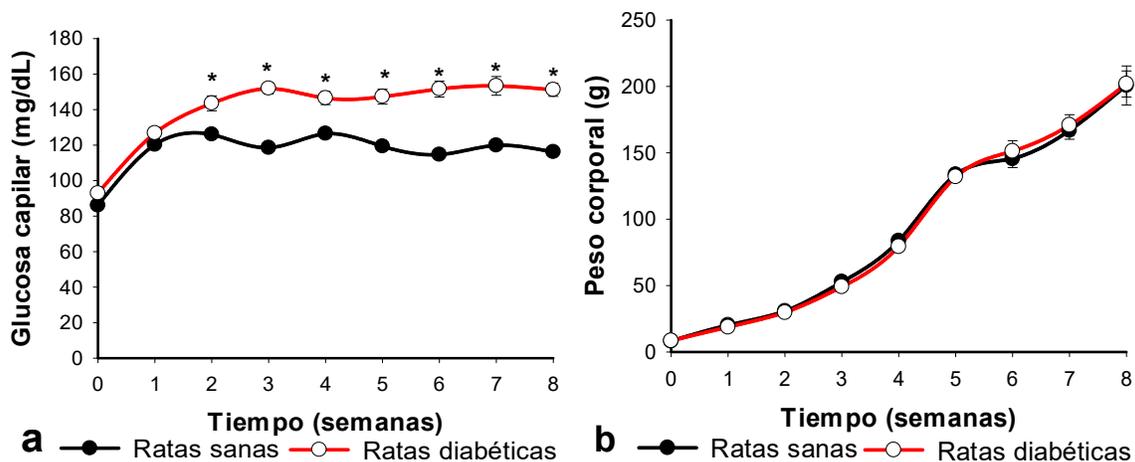
(IC<sub>50</sub>= 1.2 ± 0.2 µg/mL). Se ha propuesto que el resto galol presente catequinas podría jugar un papel importante en la inhibición de a la α-amilasa y α-glucosidasa, ya que sirve como anclaje a proteínas al interactuar con los grupos hidroxilo (Nakano *et al.*, 2018).

Adicionalmente, se ha reportado el efecto de las catequinas del té verde en la traslocación del transportador de glucosa GLUT4. Ueda *et al.* (2010) reportaron que C, EC, GC, EGC y EGCg incrementaron la entrada de glucosa (2.2, 3.5, 3.1, 3.5 y 2.2 veces, respectivamente) en células 3T3-L1 en ausencia de insulina. Asimismo, EC y EGC incrementaron la cantidad de GLUT4 en membrana plasmática. Los autores proponen que la traslocación de GLUT4 se lleva a cabo a través de PI3-K pero sin la activación del receptor a insulina (IR<sub>β</sub>) (Ueda *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha descrito que la epicatequina tiene efecto insulinogenico promoviendo la incorporación de glucosa en glucógeno (Ahmad *et al.*, 1989).

### 7.3.2 Inducción química de diabetes

STZ ha sido utilizado en la investigación por varios años para inducir experimentalmente diabetes en ratas y ratones, debido a que produce intolerancia a la glucosa e hiperglucemia leve, moderada y severa. Durante el curso temporal de 8 semanas se observó el aumento significativo de la glucemia sin ayuno en las ratas diabéticas administradas con STZ (70 mg/Kg) con respecto a las ratas sanas a partir de la segunda semana (**Figura 6a**). Los niveles de glucosa fueron mayores de 150 mg/dL durante las 8 semanas en las ratas inducidas con STZ comparados con las ratas administradas con el vehículo (≥100 mg/dL). Estos resultados indican que la STZ induce alteraciones en los niveles de glucemia. Barragán-Iglesias *et al.* (2018) reportaron que ratas administradas

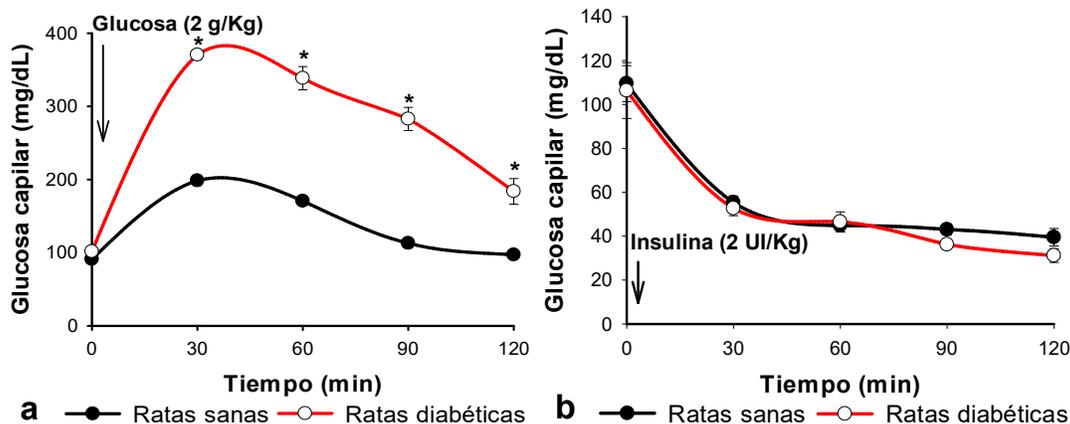
con STZ (70 mg/Kg) generan hiperglucemia en condiciones de no ayuno a partir de la 4ta semana de edad. Con respecto al peso, estos autores reportaron que la STZ induce pérdida de peso a partir de la semana 12 de edad (Barragán-Iglesias *et al.*, 2018), sin embargo, no se observa cambios en la ganancia de peso en las ratas diabéticas comparadas con las ratas sanas (**Figura 6b**). Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Barragán-Bonilla *et al.* (2019) en donde la administración de STZ (70 mg/Kg) solo genera hiperglucemia sin afectar la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento (Barragán-Bonilla *et al.*, 2019).



**Figura 6. Curso temporal de 8 semanas. a)** Glucosa capilar y **b)** peso corporal sin ayuno de ratas sanas (Buffer citratos, 0.1 M pH 4.5) y ratas diabéticas (STZ 70 mg/Kg). \* Indican diferencias significativas entre Ratas sanas vs Ratas diabéticas. Prueba *t de student*. media  $\pm$  EE (n=9-17,  $p < 0.05$ ).

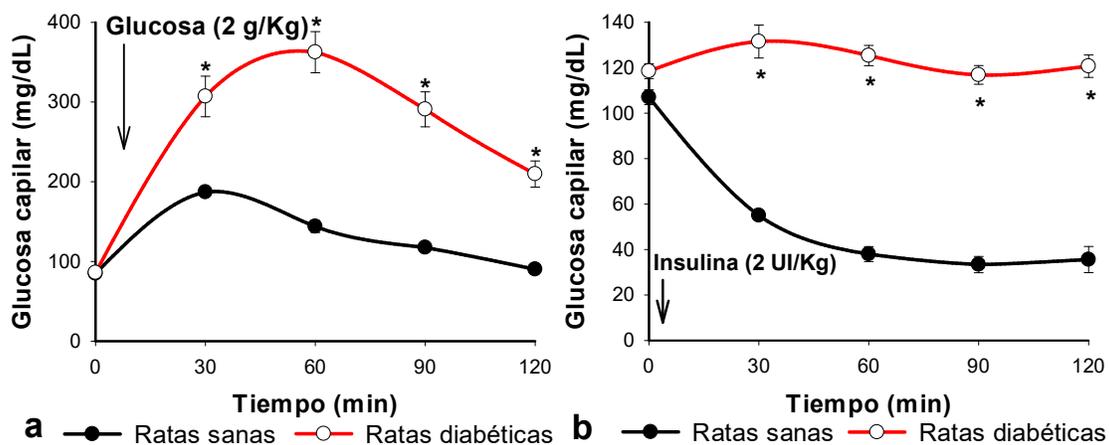
Para confirmar la hiperglucemia en las ratas inducidas con STZ a las 4 semanas de edad se procedió a evaluar la intolerancia a la glucosa mediante una PTGO, dicha prueba permite saber si una persona y/o animal puede metabolizar una cantidad estandarizada de glucosa al medir las concentraciones de glucosa capilar. Se observó que las ratas

administradas con STZ mantienen altos niveles de glucosa capilar después de una carga de glucosa (2 g/Kg) siendo mayores comparados con las ratas sanas (**Figura 7a**). Estos resultados indican que las ratas administradas con STZ generan intolerancia a la glucosa a partir de la 4ta semana de edad. Los datos concuerdan con lo reportado por Barragán-Iglesias *et al.* (2018). Posteriormente, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) para determinar si la administración de STZ puede afectar la eficiencia del cuerpo en respuesta a la insulina exógena. Sin embargo, no se observaron cambios en el metabolismo de glucosa mediado por insulina en las ratas administradas con STZ ya que los niveles de glucosa durante la PTII fueron similares a las ratas sanas (**Figura 7b**). Estos datos indican que a esta edad las ratas aún no desarrollan resistencia a la insulina.



**Figura 7. a) Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) y b) Prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) de ratas sanas (Buffer citratos, 0.1 M pH 4.5) y ratas diabéticas (STZ 70 mg/Kg) de 4 semanas de edad. \* Indican diferencias significativas entre ratas sanas vs ratas diabéticas. Prueba *t de student*. media  $\pm$  EE (n=5-6,  $p < 0.05$ ).**

Al final de curso temporal (8 semanas) se evaluó nuevamente la intolerancia a la glucosa (**Figura 8a**), confirmándose lo observado en la semana 4. Sin embargo, con respecto a la PTII, las ratas administradas con STZ a las 8 semanas disminuyeron la respuesta a la insulina desde el minuto 30, continuando hasta los 120 min comparado con las ratas sanas (**Figura 8b**). Dichos datos indican que las ratas administradas con STZ después de 8 semanas presentan resistencia a la insulina. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Barragán-Bonilla *et al.* (2019), en donde los niveles de glucosa de las ratas administradas con STZ (90 mg/Kg) son 8, 19 y 50% más altos que el control al minuto 30, 60 y 120 min, respectivamente (Barragán-Bonilla *et al.*, 2019).



**Figura 8. a) Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO) y b) Prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) de ratas sanas (buffer citratos, 0.1 M pH 4.5) y ratas diabéticas (STZ 70 mg/Kg) de 8 semanas de edad. \* Indican diferencias significativas entre ratas sanas vs ratas diabéticas. Prueba *t de student*. media  $\pm$  EE (n= 5-6, p<0.05).**

En resumen, con estos resultados se confirma la generación de un modelo de diabetes inducido con STZ (70 mg/Kg) en ratas Wistar neonatas que muestran hiperglucemia,

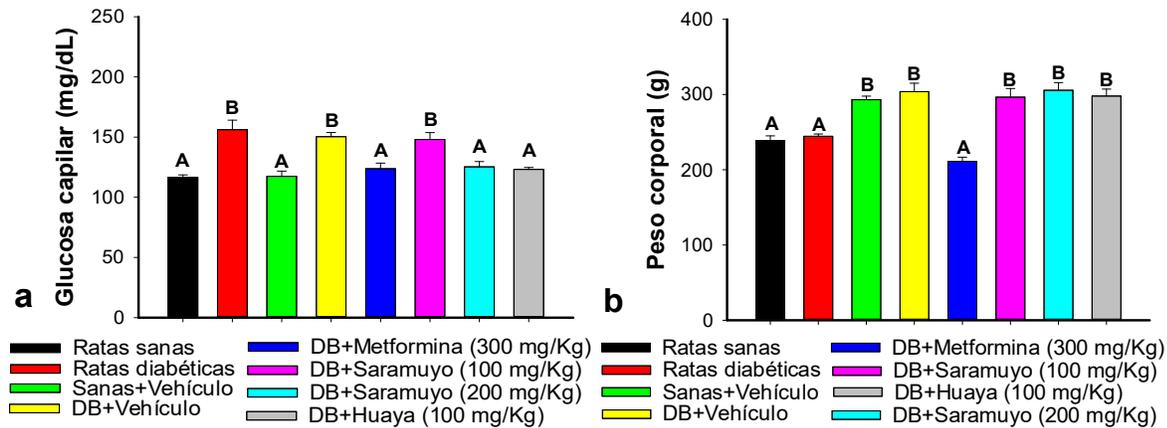
intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Estos modelos tienen la ventaja de ser económicos debido al hecho de que la STZ se administra en la edad neonatal, por lo que la cantidad del fármaco utilizado es mínima comparado con el empleado en ratas adultas.

### *7.3.3 Evaluación del efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas*

Los agentes hipoglucemiantes actúan disminuyendo las concentraciones de glucosa capilar. Se evaluó el efecto hipoglucemiante de liofilizados de cáscaras de saramuyo en dos dosis (100 y 200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) en ratas diabéticas inducidas con STZ (70 mg/Kg). La administración de 14 días del liofilizado de saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) en ratas diabéticas disminuyeron significativamente los niveles de glucosa capilar sin ayuno comparado a los niveles de las ratas diabéticas y ratas diabéticas administradas con el vehículo (DB+Vehículo). Además, el efecto de estos dos tratamientos (saramuyo 200 mg/Kg y huaya 100 mg/Kg) fueron similares al de ratas diabéticas administradas con metformina (300 mg/Kg), fármaco hipoglucemiante utilizado ampliamente para el tratamiento de DT2 (**Figura 9a**). El tratamiento de saramuyo (100 mg/Kg) no disminuyó los niveles de glucosa capilar sin ayuno.

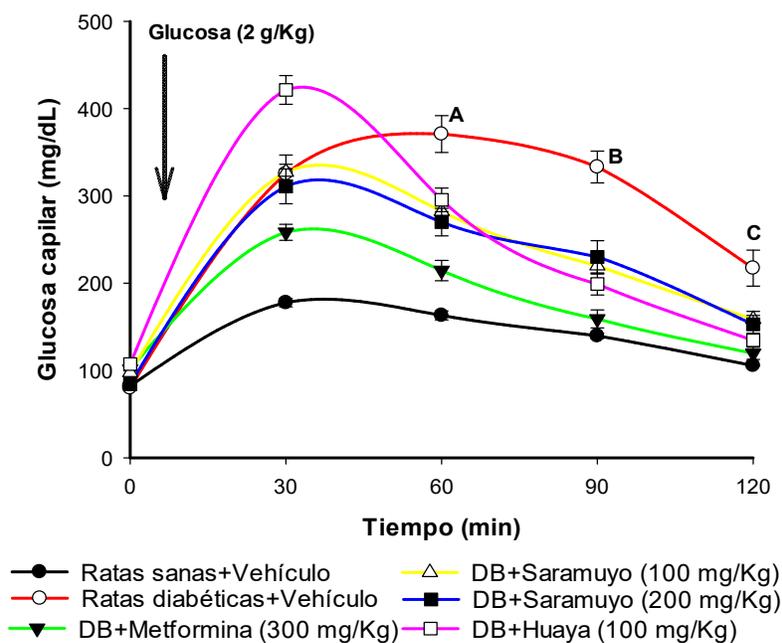
Con respecto al peso corporal (**Figura 9b**), no se observan diferencias en la ganancia de peso entre los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con metformina (300 mg/Kg) disminuye significativamente el peso corporal de las ratas diabéticas. Ya que no solo disminuye la producción de glucosa hepática, también inhibe la gluconeogénesis y disminuye la absorción de glucosa intestinal desde el tracto gastrointestinal. Estos

mecanismos contribuyen a la disminución del almacenamiento de energía en el tejido adiposo (Seifarth *et al.*, 2012).



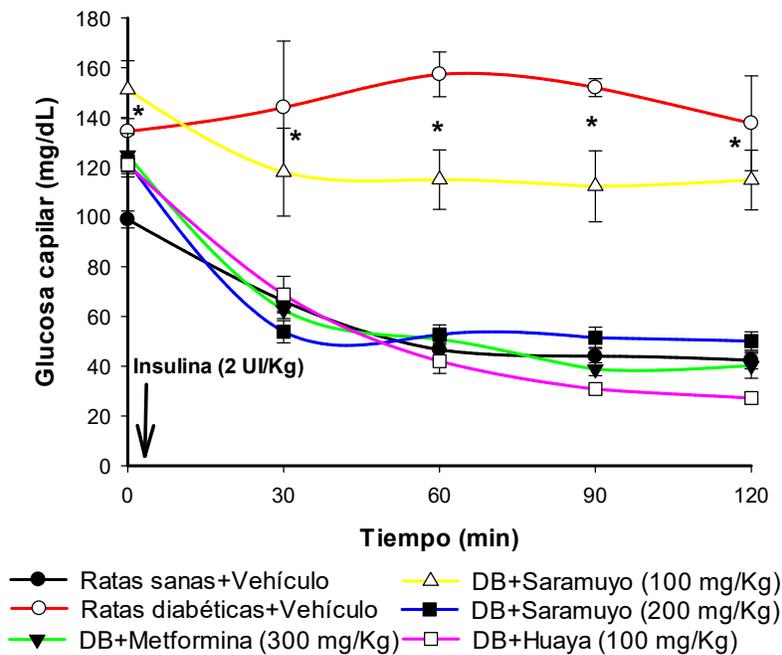
**Figura 9. a) Glucosa capilar sin ayuno y b) peso corporal** de ratas diabéticas después del tratamiento subcrónico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. ANOVA de una vía seguido por una prueba *pos hoc* de Tukey, media  $\pm$  EE (n=6-11, p<0.05).

Se realizó una PTGO para evaluar el efecto de los tratamientos en la intolerancia a la glucosa. Se observó que después de una carga de glucosa (2 g/Kg) la glucemia disminuyó en ratas diabéticas tratadas con liofilizados de saramuyo (100 y 200 mg/Kg) desde el minuto 60 (**Figura 10**). A pesar de que la glucosa capilar aumenta en el minuto 30 en el tratamiento de huaya (100 mg/Kg), la glucemia disminuye significativamente con respecto a las ratas diabéticas administradas con vehículo al minuto 60. Durante 90 y 120 min, la glucemia de los tres tratamientos (saramuyo 100 y 200 mg/Kg y huaya 100 mg/Kg) son significativamente menores con respecto a las ratas diabéticas administradas con vehículo.



**Figura 10. Prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (PTGO)** de ratas diabéticas después del tratamiento subcrónico. **A, B, C** = diferencias significativas de ratas diabéticas+Vehículo vs Saramuyo 100 y 200 mg/Kg y Huaya 100 mg/Kg a 60, 90 y 120 min, respectivamente. ANOVA de una vía seguido por una prueba *pos hoc* de Tukey. media  $\pm$  EE (n=6-7,  $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) para determinar si los tratamientos tenían efecto en la resistencia a la insulina (**Figura 11**). El tratamiento de 14 días del liofilizado de saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) en ratas diabéticas mostraron un aumento en la respuesta a la insulina, observándose gráficamente en la disminución de glucemia, siendo similar a los niveles observados en el tratamiento de metformina. Resulta interesante que, la dosis de 100 mg/Kg de saramuyo no mejora la respuesta a insulina, indicando un mejor efecto al aumentar la dosis. Estos resultados indican que el tratamiento de liofilizados de saramuyo y huaya promueven la disminución de la resistencia a la insulina.



**Figura 11. Prueba de tolerancia a la insulina por vía intraperitoneal (PTII) de ratas diabéticas después del tratamiento subcrónico. \*** Indican diferencias significativas de ratas diabéticas+Vehículo vs Saramuyo 200 mg/Kg y Huaya 100 mg/Kg. ANOVA de una vía seguido por una prueba *pos hoc* de Tukey. media  $\pm$  EE (n=6-7,  $p < 0.05$ ).

Kumar-Gupta *et al.* (2005) han reportado previamente el efecto hipoglucémico del tratamiento de 15 días de extractos etanólicos de hojas de saramuyo (350 mg/Kg), dicho extracto reduce los niveles de glucosa en ayuno y reduce la intolerancia a la glucosa después de una 1 h en una PTGO en ratas diabéticas inducidas con STZ (50 mg/Kg). Los autores atribuyen que los ingredientes activos del extracto toman alrededor de 1 h para entrar a la circulación para llevar a cabo el efecto hipoglucémico en los tejidos blanco (Kumar-Gupta *et al.*, 2005). De manera similar a lo observado en la PTGO de los liofilizados de saramuyo y huaya, en donde el efecto hipoglucémico se observa después

de 1 h y se mantiene hasta las 2 h. Kaleem *et al.* (2008) evaluaron el efecto hipoglucemiante del tratamiento de 30 días del extracto acuoso de hojas de saramuyo (300 mg/Kg) disminuye la glucosa capilar en ratas diabéticas inducidas con STZ (55 mg/Kg) con un simultaneo aumento de insulina plasmática. Los autores atribuyen que el efecto hipoglucémico de saramuyo podría deberse al aumento de la secreción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas o al mejoramiento del transporte de glucosa desde la sangre hacia tejidos periféricos (Kaleem *et al.*, 2008).

Los liofilizados de saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) mostraron un efecto positivo en la respuesta a la insulina, indicando una probable disminución en la resistencia a la insulina en las ratas diabéticas. Se ha reportado que las cáscaras de saramuyo y huaya presentan varios compuestos fenólicos (**Tabla 10**) (Can-Cauich *et al.*, 2017). La presencia de compuestos fenólicos podría favorecer la secreción de insulina. Se ha reportado que la epigallocatequina (EGCG) tiene efectos benéficos sobre el mecanismo de señalización de insulina. Se ha revelado que EGCC puede mimetizar la acción de insulina e inducir la fosforilación de FOXO1 (Forkhead box protein O1) un factor de transcripción que juega un papel importante en la regulación de genes de gluconeogénesis y glucogenólisis (Anton *et al.*, 2007). Lin & Lin (2008) reportan que la exposición a concentraciones altas de glucosa resulta en el aumento de la fosforilación del residuos de Ser307 del sustrato del receptor de insulina (IRS-1), lo que en consecuencia conduce al bloqueo de la señalización de insulina al inhibir la fosforilación del residuo Tyr de IRS-1, se ha revelado que el aumento en la fosforilación en los residuos de Ser/Thr en el receptor a insulina (IR) y en el IRS-1 es un mecanismo clave para el desarrollo de la resistencia a la insulina, ya que se altera la asociación de IR y el IRS-1 a

otras proteínas (como PI3-K) (Liu *et al.*, 2004). Lin & Lin (2008) han reportado que el tratamiento con ECGC reduce significativamente la fosforilación del residuo Ser307 de IRS-1 en células HepG2, al inhibir parcialmente la actividad cinasa de PKC y JNK, enzimas que se activan en presencia de altas concentraciones de glucosa y fosforilan a Ser307 (Nakatani *et al.*, 2004).

Como se discutió anteriormente, los compuestos fenólicos podrían jugar un papel importante en el efecto antidiabético, al inhibir la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa, disminuyendo la glucosa posprandial al retrasar la tasa de absorción de glucosa intestinal. Sin embargo, ácidos orgánicos, como el ácido málico ha generado interés como posible inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa. Las cáscaras de saramuyo y huaya presentan alto contenido de ácido málico ( $16548.55 \pm 203.76$  y  $10431.05 \pm 659.52$  mg AM/100 g de CL). Simamora *et al.* (2019) reportan la capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa del jugo fermentado de *M. citrifolia*s, en donde algunos de los compuestos identificados fueron el ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y el ácido málico. Guo *et al.* (2014) reportaron que la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa dependiente de la dosis de ácido málico, el  $IC_{50}$  fue de  $10.68 \pm 0.41$  mM y la concentración en donde la actividad de la enzima fue inactivada totalmente fue 25 mM. Adicionalmente, Guo *et al.* (2014) ejecutan una simulación computacional para determinar el mecanismo de inhibición del ácido málico sobre la  $\alpha$ -glucosidasa. Los autores concluyen que el ácido málico se puede unir en el paso de entrada de glucosa y de esta forma bloquear la reacción de la enzima.

Particularmente, la cáscara de saramuyo presentó mayor contenido de ácido cítrico ( $13919.07 \pm 492.11$  mg AC/100 g de CL). Existe evidencia sobre el efecto hipoglucemiante del ácido cítrico, Mohamed *et al.* (2018) reportaron que la administración

de ácido cítrico en ratas diabéticas inducidas con alloxan (100 mg/Kg) disminuyó significativamente el peso corporal y los niveles de glucosa y triglicéridos (sin disminuir los niveles de HDL) después de 4 semanas de tratamiento. En el caso de la cáscara de huaya, presentó mayor contenido de ácido tartárico ( $21878.59 \pm 366.36$  mg AT/100 g de CL), este ácido orgánico es frecuentemente encontrado en frutos como uvas y plátanos, tiene un sabor astringente, y comúnmente se utiliza como aditivo en algunas bebidas y dulces (Izawa *et al.*, 2010). También es utilizado como excipiente, ya que podría incrementar la absorción intestinal de sustancias mediante algunos mecanismos propuestos: interacción intramolecular, inhibición de la glucoproteína P y/o potenciando el transporte a través epitelio hacia las células cruzando por el espacio intracelular (Hayashi *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha reportado la presencia natural de metilene ciclopropilglicina (MCPG) e hipoglicina A (HGA) en la semilla y fruto de integrantes de la familia *Sapindaceae* como ackee (*Blighia sapida*), litchi (*Litchi chinensis*), longan (*Dimocarpus longan*) y huaya. MGCP y HGA son aminoácidos que causan hipoglucemia y encefalopatía (Sanford *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos indican que los liofilizados de saramuyo y huaya podrían ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de DT2, sin embargo, primero es necesario elucidar el mecanismo de acción para descartar efectos secundarios.

## **8. CONCLUSIONES**

Mediante un análisis cualitativo se determinó la presencia de ciertos grupos de metabolitos para posteriormente cuantificar su concentración. En el análisis cuantitativo, se encontró que la cáscara de saramuyo mostró mayor contenido de CFT y mayor

capacidad antioxidante, mientras que la cascara de huaya presento alto contenido de acidos orgánicos (málico, y tartárico).

Mediante una prueba de tolerancia a la glucosa (PTGO) se encontro efecto anti-hiperglucemiante en ambas cáscaras. La cascara de saramuyo mostró mejor efecto en las dosis de 200 mg/Kg, mientras que, en la cascara de huaya, el mejor efecto se encontro en las dosis de 100 y 200 mg/Kg.

Para evaluar el efecto hipoglucemiante se desarrolló y estandarizó un modelo químico de DT2 en ratas neonatas Wistar macho utilizando STZ (70 mg/Kg). Las ratas presentaron hiperglucemia a partir de la 2da semana, intolerancia a la glucosa a partir de la 4ta semana y resistencia a la insulina en la 8va semana de edad.

Después de un tratamiento de 14 días, las cáscaras de saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) disminuyeron la glucosa capilar sin ayuno de ratas diabéticas. Los 3 tratamientos (saramuyo 100 y 200 mg/Kg y huaya 100 mg/Kg) disminuyeron la intolerancia a la glucosa en ratas diabéticas a partir del minuto 60 en una PTGO, sin embargo, solo saramuyo (200 mg/Kg) y huaya (100 mg/Kg) disminuyeron la resistencia a la insulina en una PTII.

## **9. PERSPECTIVAS**

Determinar la presencia y contenido de compuestos fenólicos con efecto antidiabético (catequina, epicatequina, ácido clorogénico, etc.) en liofilizados de cáscaras de saramuyo y huaya.

Determinar la presencia de metilenecloropropilglicina (MCPG) e hipoglicina A (HGA) en la cascara de huaya.

Estudiar el perfil metabólico de muestras de tejido de ratas diabeticas después de los tratamientos de saramuyo y huaya para evaluar su efecto y elucidar un posible mecanismo de acción sobre las concentraciones de glucosa.

## 10. REFERENCIAS

Aarland R.C., Bañuelos-Hernández A.E., Fragoso-Serrano M., Sierra-Palacios E.C., Díaz de León-Sánchez F., Pérez-Flores L.J., Rivera-Cabrera F., Mendoza-Espinoza J.A. (2016) Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharm Biol*, 55(1): 649-656.

Aarland R.C., Peralta-Gómez S., Sánchez-Morales C., Parra-Bustamante F., Villa-Hernández J.M., Díaz de León-Sánchez F., Pérez-Flores L.J., Rivera-Cabrera F., Mendoza-Espinoza J.A. (2015) A pharmacological and phytochemical study of medicinal plants used in Mexican folk medicine. *Indian J Tradit Know*, 14(4): 550-557.

Aboul-Enein A.M., Salama Z.A., Gaafar A.A., Aly H.F., A-bou-Ellella F., Ahmed H.A. (2016) Identification of phenolic compounds from banana peel (*Musa paradaisica* L.) as antioxidant and antimicrobial agents. *J Chem Pharm Res*, 8(4): 46-55.

Abramovič H., Grobin B., Ulrih N.P., Cigić B. (2018) Relevance and standardization of *in vitro* antioxidant assays: ABTS, DPPH, and Folin–Ciocalteu, *Journal of Chemistry*, 2018: 1-9.

ADA: American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standars of Medical Care in Diabetes – 2018. *Diabetes Care* 2018, (Supp. 1): S13-S27.

Ahmad F., Khalid P., Khan M.M., Rastogi A.K., Kidwai J.R. (1989) Insulin like activity in (-) epicatechin. *Acta diabetologia Latina*, 26(4): 291-300.

Alejandre G. & López J. (2001) Antidiabeticos. *Insalud*; 11(1): 1-8

Ali Asgar, M.D., 2013. Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16(1): 91-103.

Anton S., Melville L., Rena G. (2007) Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. *Cell Signal*, 19(2): 378-83.

Arulmozhi D.K., Veeranjanyulu A., Bodhankar S.L. (2004) Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian J Pharmacol*, 36(4): 217-221.

Arwa M.T., Al-Nahdi A.J., Raza H. (2017) Elucidation of molecular mechanisms of streptozotocin-induced oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in Rin-5F pancreatic  $\beta$ -cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1-15.

Bailey C.J. & Day C. (1989) Traditional Plant Medicines as Treatment for Diabetes, *Diabetes Care*, 12(8): 553-564.

Badary O.A., Awad A.S., Sherief M.A., Hamada F.M. (2006) *In vitro* and *in vivo* effects of ferulic acid on gastrointestinal motility: inhibition of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats. *World J Gastroenterol*, 12(33): 5363-5367.

Barragán-Bonilla M.I., Mendoza-Bello J.M., Aguilera P., Parra-Rojas I., Illades-Aguilar B., Ramírez M., Espinoza-Rojo M. (2019) Combined Administration of streptozotocin and sucrose accelerates the appearance of type 2 diabetes symptoms in rats. *Hindawi*, 2019:

1-12

Barragán-Islas P., Oídor-Chan V.H., Loeza-Alcocer E., Pineda-Farias J.B., Velazquez-Lagunas I., Salinas-Abarca A.B., Hong E., Sánchez-Mendoza A., Delgado-Lezama R., Price T.J., Granados-Soto V. (2018) Evaluation of the neonatal streptozotocin model of diabetes in rats: Evidence for a model of neurophatic pain. *Pharmacol Rep*, 70: 294-303.

Behiry, S.I., Okla, M.K., Alamri, S.A., El-Hefny, M., Salem, M.Z., Alaraidh, I.A., Ali, H.M., Al-Ghtani, S.M., Monroy, J.C., Salem, A.Z., (2019) Antifungal and antibacterial activities of *Musa paradisiaca* L. peel extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid contents. *Processes*, 7(4): 1-11.

Bennett, R.A. & Pegg, A.E. (1981) Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer research*, 41(7): 2786-2790.

Brøndum E., Nilsson H., Aalkjaer C. (2005) Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models. *Horm Metab Res*, 37(1): 56-60.

Bystrom, L.M., Lewis, B.A., Brown, D.L., Rodriguez, E., & Obendorf, R.L. (2009). Phenolics, sugars, antimicrobial and free-radical-scavenging activities of *Melicoccus bijugatus* Jacq. fruits from the Dominican Republic and Florida. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2): 160-166.

Bystrom L.M., Lewis B.A., Brown D.L., Rodriguez E., Obendorf R.L. (2008) Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chem*, 111: 1017–1024.

Caceres G.L., Andrade S.J., Silva Filho F.D. Effects of peeling methods on the quality of cubiu fruits. *Ciênc Tecnol Aliment*, 32(2): 255-260.

Can-Cauich C.A., Sauri-Duch E., Betancur-Ancona D., Chel-Guerrero L., González-Aguilar G.A., Cuevas-Glory L., Pérez-Pacheco E., Moo-Huchin V.M. (2017) Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity. *J Funct Foods*, 37: 501-506.

Castro-Juárez C.J., Villa-Ruano N., Ramírez-García S.A., Mosso-González C. (2014) Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1): 101-120.

Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. (2002) Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 10: 176-182.

Chang, S. A., Cha, B. Y., Yoo, S. J., Ahn, Y. B., Song, K. H., Han, J. H., Lee, J. M., Son, H. S., Yoon, K. H., Kang, M. I., Lee, K. W., Son, H. Y., & Kang, S. K. (2001). The effect of cilostazol on glucose tolerance and insulin resistance in a rat model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *The Korean journal of internal medicine*, 16(2): 87–92.

Carrillo-López, A., & Yahia, E. M. (2019). Morphology and Anatomy. En E. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 113–130). Elsevier.

Chen, Z.-T., Chu, H.-L., Chyau, C.-C., Chu, C.-C., & Duh, P.-D. (2012). Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food Chemistry*, 135(4), 2119–2127.

Chel-Guerrero L.D., Sauri-Duch E., Fragoso-Serrano M.C., Pérez-Flores L.J., Gómez-Olivares J.L., Salinas-Arreortua N., Sierra-Palacios E.D.C., Mendoza-Espinoza J.A. (2018) Phytochemical Profile, Toxicity, and Pharmacological Potential of Peels from Four Species of Tropical. Fruits. *J Med Food*, 21(7): 734-743.

Daradick C. & Callahan A.M. (2014) Evolution of the fruit endocarp: molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal strategies. *Front Plant Sci*, 5(284): 1-10.

Eleazu C.O., Eleazu K.C., Chukwuma S., Essien U.N. (2013) Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*, 12(1): 1-7.

El-Hadary A.E. & Ramadan M.F. (2019) Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. *J Food Biochem*, 43(4): 1-9.

Ferreira-da-Silva F.W., da Silva-Alves K.S., Lemos-Dos-Santos M., de Oliveira K.A., Joca H.C., do Vale O.C., Coelho-de-Souza A.N., Leal-Cardoso J.H. (2013) n5-STZ diabetic model develops alterations in sciatic nerve and dorsal root ganglia neurons of wistar rats. *ISRN Endocrinol*, 2013: 1-13

Fukunaga T., Nishiya K., Takeya K., Itokawa H. (1987) Studies on the Constituents of Goat's Rue (*Galega officinalis* L.). *Chem Pharm Bull*, 35(4): 1610-1614.

Giovannini P., Howes M.J.R., Edwards S. (2016) Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: a review. *J Ethnopharmacol*, 184: 58-71.

Guo, L., Zhan, Y., Lee, J., Li, X., Lü, Z.-R., Zhou, H.-M., Yang, J.M. (2014). Effects of L-Malic acid on alpha-glucosidase: inhibition kinetics and computational molecular dynamics simulations. *Appl Biochem and Biotechnol*, 175(4): 2232–2245.

Gupta R.K., Kesari A.N., Murthy P.S., Chandra R., Tandon V., Watal G., J. (2005) Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. *Ethnopharmacol*, 99(1): 75-81.

Haminiuk C.W.I., Maciel G.M., Plata-Oviedo M.S.V., Peralta R.M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *Inter J Food Sci & Techn*, 47(10): 2023–2044.

Hayashi M., Sakai T., Hasegawa Y., Nishikawahara T., Tomioka H., Iida A., Shimizu N., Tomita M., Awazu S. (1999) Physiological mechanism for enhancement of paracellular drug transport. *Journal of controlled release*, 62(1-2): 141-148.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019.  
Disponibile en: <https://www.diabetesatlas.org>

Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., & Kuroda, M. (2010) Human–Environment Interactions – Taste. En Hung-Wen Liu (Ed.), *Comprehensive Natural Products II*, (pp. 631–671). Elsevier.

Jung H.A., Ali M.Y., Choi J.S. (2016) Promising Inhibitory effects of anthraquinones, naphthopyrone, and naphthalene glycosides, from *Cassia obtusifolia* on  $\alpha$ -glucosidase and human protein tyrosine phosphatases 1B. *Molecules*, 22(28): 1-15.

Kaleem M. Asif M., Ahmed Q.U., Bano B. (2006) Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J*, 47(8): 670-675.

Kaleem M., Medha P., Ahmed Q.U., Asif M., Bano B. (2008) Beneficial effects of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J*, 49(10): 800-804.

Karasawa, M.M.G. & Mohan, C. (2018) Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Nat Prod.Bioprospect*, 8(5): 335–346.

Khairusy S.K. Abdulla N., Abdullah A., Aziman N., Syuda W.S., Kamarudin W. (2012) Phytochemical screening and activities of hydrophilic and lipophilic antioxidant of some fruit peels. *Malasyan J Anal Sci*, 16(3): 309-317.

Kim H., Moon J.Y., Kim H., Lee D.S., Cho M., Choi H.K., Kim S., Mosaddik A., Cho, S.K. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry*, 121(2): 429–436.

Kim, J. & Kim, M.M., (2018) Positive effect of *Musa paradisiaca* peel ethanolic extract on antioxidant activity and melanin synthesis. *Journal of Life Science*, 28(7): 802-810.

Knödler M., Conrad J., Wenzig E.M., Bauer R., Lacorn M., Beifuss U., Carle R., Schieber A. (2008) Anti-inflammatory 5-(11'Z-heptadecenyl)- and 5-(8'Z,11'Z-heptadecadienyl)-resorcinols from mango (*Mangifera indica* L.) peels. *Phytochemistry*, 69(4): 988-993.

Kumar A., Kumar V., Tomer V. (2018) Traditional medicinal systems for treatment of diabetes mellitus: a review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 10(5): 7-17.

Kwon, N.S., Lee, S.H., Choi, C.S., Kho, T., Lee, H.S. (1994) Nitric oxide generation from streptozotocin 1. *The FASEB journal*, 8(8): 529-533.

Laddha A. P., & Kulkarni, Y. A. (2018). Tannins and vascular complications of diabetes: An update. *Phytomedicine*, 15(56): 229-245.

Lee P., Tan R., Yu B., Curran P., & Liu S. (2013). Sugars, organic acids, and phenolic acids of exotic seasonable tropical fruits. *Nutrition & Food Science*, 43(3), 267–276.

Lewis C. & Barbiere A.R. (1958). Streptozotocin, a new antibiotic. *In vitro* and *in vivo* evaluation, *Antibiot Ann*, 7: 247–254.

Lin C.L. & Lin J.K. (2008). Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(8): 930–939.

Lorenzati B., Zucco C., Miglietta S., Lamberti F., Bruno G. (2010) Oral hypoglycemic drugs: pathophysiological basis of their mechanism of action. *Pharmaceuticals*, 3(9): 3005-3020.

Luceri C., Giannini L., Lodovici M., Antonucci E., Abbate R., Masini E., Dolaro P. (2007) *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity *in vitro* and *in vivo*. *Br J Nutr*, 97(3): 458-463.

Madhoosudan A.P., Suryanarayana P., Kumar U. P., Srinivas M., Bhanuprakash R.G., (2014) Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014: 1-10.

Mahour K. (2016) Effect of solvent evaporation methods on biological activity of crude extract of *Feronia elephantum Correa* leaves. *AJMAP*, 2(2): 111-116.

Mariod A.A., Abdelwahab S.I., Elkheir S., Ahmed Y.M., Fauzi P.N., Chuen C.S. (2012) Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 11(3): 249-58.

Mustafa A.T.M., Ashikeen M.N., Aiman A.G.A. (2018) Effect of acid load (citric acid) on diabetes-induced rats, *Int J Med Tox & Legal Med*, 21(34): 212-215.

Mohd M., Alam K.S., Mohd A., Abhishek M., Aftab A. (2009) Antidiabetic activity of the aqueous extract of *Annona Squamosa* in streptozotocin induced hyperglycemic rats; *Pharm Research*, 2: 59-63.

Moo-Huchin V.M., Estrada-Mota I., Estrada-León R., Cuevas-Glory L., Ortíz-Vázquez E., Vargas y Vargas M.L., Betancur-Ancona D., Sauri-Duch E. (2014) Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem*, 152: 508-515.

Morton J. (1987) Mamoncillo. En: J. F. Morton (Ed.), *Fruits of warm climates* (pp. 267–269). Miami FL.

Nair V.M., Roopalatha U.C. (2013) Phytochemical analysis of successive extracts of the leaves of *Moringa oleifera* Lam. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(3): 629-634.

Nakano S., Megro S. I., Hase T., Suzuki T., Isemura M., Nakamura Y., Ito S. (2018). Computational molecular docking and x-ray crystallographic studies of catechins in new drug design strategies. *Molecules*, 23(8): 1-28.

Nazarian-Samani Z., Sewell R.D.E., Lorigooini Z., Rafieian-Kopaei M. (2018) Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: a systematic review. *Curr Diab Rep*, 18(72): 1-13.

Nitsch, J. P. (1952). Plant Hormones in the Development of Fruits. *The Quarterly Review of Biology*, 27(1): 33–57.

Okorundu S.I., Mepba H.D., Okorundu M.M.O., Aririatu L.E. (2010) Antibacterial properties of *Musa paradisiaca* peel extract. *Curr. Trends Microbiol*, 6: 21–26.

Oídor-Chan V.H., Hong E., Pérez-Severiano F., Montes S., Torres-Narváez, del Valle-Mondragón L., Pastelín-Hernández G., Sánchez-Mendoza A. (2016) Fenofibrate plus Metformin Produces Cardioprotection in a Type 2 Diabetes and Acute Myocardial Infarction Model. *PPAR Res*, 2016: 8237264.

OMS: Organización Mundial de la Salud, “Definición, diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus y sus complicaciones”. 1999.

OMS: Organización Mundial de la Salud, “Informe mundial sobre la diabetes”. 2016

Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Simons A. (2009) Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>).

Osarumwense P.O. Okunrobo L., Uwumarongie-Ilori E.G. (2013) Phytochemical screening, proximate and elemental analysis of *Citrus sinensis* peels (L.) Osbeck. *J App Sci Environ Manage*, 17(1): 47-50.

Pal D.K. & Sampath-Kumar P. (1995). Changes in the physico-chemical and biochemical compositions of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits during growth, development and ripening. *J Horticultural Sci*, 70(4), 569–572.

Parastar H. (2015). Multivariate curve resolution methods for qualitative and quantitative analysis in analytical chemistry. fundamentals and analytical applications of multiway calibration. En A.C. Oliveri (Ed.), Fundamentals and analytical applications of multiway calibration. (pp. 293–345). Elsevier.

Parmar H.S. & Kar A. (2007). Protective role of *Citrus sinensis*, *Musa paradisiaca*, and *Punica granatum* peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunctions in rats. *Nutrition Research*, 27(11), 710–718.

Parmar H.S., & Kar A. (2008). Antiperoxidative, antithyroidal, antihyperglycemic and cardioprotective role of *Citrus sinensis* peel extract in male mice. *Phytotherapy Research*, 22(6), 791–795.

Parmar H.S. & Kar A. (2009). Protective role of *Mangifera indica*, *Cucumis melo* and *Citrullus vulgaris* peel extracts in chemically induced hypothyroidism. *Chemico-Biological Interactions*, 177(3), 254–258.

Parmar H.S, Dixit Y., Kar A. (2010). Fruit and vegetable peels: Paving the way towards the development of new generation therapeutics. *Drugs Discoveries & Therapeutics*, 4(5): 314-325.

Pieper A. (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(4): 171–181.

Pinto A.C. (2005) Taxonomy and botany. En J.T. Williams (Ed.), *Annona species*. (pp. 3-7). International Centre for Underutilised Crops.

Portha B., Levacher C., Picon L., Rosselin G. (1974) Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes*, 23: 889–95.

Portha B., Blondel O., Serradas P., McEvoy R., Giroix M.H., Kergoat M., Bailbe D. (1989) The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete Metab*, 15(2): 61-75.

Presupuesto de Egresos de la Federación. “Recursos destinados al Sector Salud en el Presupuesto de Egresos de la Federación”. 2018.

PROTA: Plant Resources of Tropical Africa (s.f.) *Melicoccus bijugatus* Jacq. (<https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=psk&p=Melicoccus+bijugatus+Jacq.>)

Consultado en Mar 2019

Raza H., Prabu S.K., Robin M.A., Avadhani N.G. (2004) Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced

diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes*, 53(1): 185-194.

Raza H., Prabu S.K., John A., Avadhani N.G. (2011) Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of molecular sciences*, 12(5): 3133-3147.

Rivero-Pérez M.D., Muñoz P., González-San José M.L. (2007) Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J Agric Food Chem*, 55: 5476-5483.

Sanford A.A., Isenberg S.L., Carter M.D., Mojica M.A., Mathews T.P., Harden L.A., Takeoka G.R., Thomas J.D., Pirkle J.L., Johnson R.C. (2018) Quantitative HPLC-MS/MS analysis of toxins in soapberry seeds: Methylene cyclopropylglycine and hypoglycin A. *Food Chem*, 30; 264: 449-454.

Seifarth, C., Schehler, B., & Schneider, H. (2012). Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 121(01): 27–31.

Shirwaikar A., Rajendran K., Dinesh Kumar C., Bodla R., J. (2004) Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin–nicotinamide type 2 diabetic rats. *Ethnopharmacol*, 91(1): 171-175.

Shirwaikar A., Rajendran K., Dinesh Kumar C., Bodla R., J. (2008) Oral antidiabetic activity of *Annona squamosa* leaf alcohol extract in NIDDM rats. *Pharm Biol*, 42(1): 30-35.

Simamora A., Santoso A.W., Timotius K. (2019)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* L and combination effect with acarbose. *Curr Res Nutr Food Sci*, 7(1): 218-226.

Singleton V.L. & Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16(3): 144-158.

Suja D., Bupesh G., Nivya R., Mohan V., Ramasamy P., Muthiah N.S., Arul-Amutha E., Meenakumari K., Prabu K. (2017) Phytochemical screening, antioxidant, antibacterial activities of *Citrus limon* and *Citrus Sinensis* peel extracts. *Int J Pharmacogn Chinese Med*, 1(2): 1-7.

Tai, M. M. (1994). A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care*, 17(2), 152–154.

Toklu H.Z., Sehirlı O., Sener G., Dumlu M.U., Ercan F., Gedik N., Gökmen V. (2007). Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(9): 1287-1295.

Tjälve H., Wilander E., Johansson E.B. (1976) Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*, 69(3): 455–456.

TRAMIL: Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe. (s.f.) *Annona Squamosa* (<http://www.tramil.net/es/plant/annona-squamosa>) Consultado en Mar 2019.

Turk J., Corbett J.A., Ramanadham S., Bohrer A., McDaniel, M.L. (1993) Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochemical and biophysical research communications*, 197(3): 1458-1464.

Ueda M., Furuyashiki T., Yamada K., Aoki Y., Sakane I., Fukuda I., Yoshida K.I., Ashida H. (2010). Tea catechins modulate the glucose transport system in 3T3-L1 adipocytes. *Food & function*, 1(2): 167-173.

USDA: United States Department of Agriculture. (s.f.) *Annona squamosa* L. (<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ansq>) Consultado en Mar 2019

USDA: United States Department of Agriculture. (s.f.) *Melicoccus bijugatus* Jacq. (<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=MEBI>) Consultado en Mar 2019

van der Schaft N., Schoufour J.D., Nano J., Kieffe-de Jong J.C., Muka T., Sijbrands E.J., Ikram M.A., Franco O.H., Voortman T. (2019) Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes mellitus, prediabetes and insulin resistance: the Rotterdam Study. *European J Epidemiology*, 34(9): 853-861.

Vavra J.J., Deboer C., Dietz A., Hanka L.J., Sokolski W.T. (1960) Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot. Ann*, 7: 230–235.

Wang Y.-C., Chuang Y.-C., Hsu, H.-W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106(1): 277–284.

Wang S., Alseekh S., Fernie A.R., Luo J. (2019) The structure function of major plant metabolite modifications. *Molecular Plant*, 12(7): 899-919.

Wilson G. L. & Leiter, E. H. (1990). Streptozotocin Interactions with pancreatic  $\beta$  cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *The Role of Viruses and the Immune System in Diabetes Mellitus*, 156: 27–54.

Yilmazer-Musa M., Griffith A.M., Michels A.J., Schneider E., Frei B. (2012) Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity. *J Agric Food Chem*, 60(36): 8924-9.