



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**

**RELACIÓN FLAVONOIDES TOTALES-ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA (*IN VITRO* POR DIFUSIÓN DE GLUCOSA) EN EXTRACTOS DE *COLUBRINA ELLIPTICA***

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**JOSÉ ADRIÁN CRUZ GALLEGOS**

**DIRECTORE DE TESIS:**

**DR. RAÚL SALAS CORONADO**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO**

Huajuapán de León, Oaxaca, México, Mayo de 2012

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Para el desarrollo de este proyecto se percibió una beca PROMEP con referencia 0067/VAC/UTM/12.

Los resultados de este trabajo dieron lugar para ser presentados en el 5<sup>th</sup> International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes, en la ciudad de Barcelona, España, del 8-11 de febrero de 2012.

*Dedico este trabajo a Dios por brindarme la oportunidad de cumplir mis metas y cuidar siempre de mi, mi familia y amigos.*

*A mis abuelos Efrén y Esperanza que en paz descansen por el gran cariño que me dieron y los sabios consejos que me transmitieron me son de gran utilidad para cada reto que se presenta en la vida.*

*A mi abuelo Francisco por enseñarnos siempre con el ejemplo.*

*A mi mejor amiga y madre Efigenia contigo todo ha sido muy fácil muchas gracias por tu confianza incondicional y apoyarme en cada momento de mi vida.*

*A mi hermana Linda por ser siempre linda conmigo y comprenderme, sabes que te amo mucho.*

*A mi tía Juanita por estar siempre con nosotros y apoyarnos en los momentos más difíciles.*

*A cada uno de los integrantes de mi familia, estar con ustedes me da fuerza para afrontar los retos que se me presentan.*

*Por supuesto a mis amigos Vania, Mario, Hazel, Checa, Cobos, Gamaliel, Jazmín, Oscar y Juanito que hicieron de mi trabajo de tesis un momento muy agradable y divertido.*

*A todos ustedes, los quiero mucho*

*ADN*

## ***Agradecimientos***

*Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas*

*Los señores Gerardo Reyes Manuel y Sr. Julio César Manuel Ordaz pobladores de la comunidad de Nizanda, Oaxaca quienes nos guiaron en la exploración de Nizanda en busca de *C. elliptica*.*

*A la Sociedad Para el Estudio de los Recursos Bióticos de Oaxaca y a la M.C. Silvia Hortensia Salas Morales por ayudarnos en la identificación de *C. elliptica*.*

*A mis directores de tesis el Dr. Raúl Salas Coronado y Dr. Rogelio Valadez Blanco por los conocimientos y orientación transmitida durante el desarrollo de este proyecto.*

*A mis sinodales la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez y la M.C. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza quienes colaboraron en la revisión de este trabajo.*

## RESUMEN

La diabetes mellitus es un padecimiento que ha cobrado importancia a nivel mundial debido a su tasa alta de mortalidad. En México en el 2010 se reportaron más de 72 mil 499 muertes atribuidas a la diabetes mellitus. Esto representó el 14.7% del total de las muertes en el país (Secretaría de Salud, 2011). Debido a la problemática social que representa la diabetes mellitus en México y el mundo, en el presente trabajo se estudió el efecto antidiabético de corteza de *Colubrina elliptica* y hojas de *Persea americana*, esta última se utilizó como control positivo. Se determinó la concentración de flavonoides totales de las plantas y mediante un experimento *in vitro* de difusión de glucosa, se evaluó el efecto antidiabético de estos compuestos fenólicos. También se estudiaron tres métodos de extracción y dos métodos de cuantificación de flavonoides. La concentración de flavonoides totales para los extractos de corteza de *C. elliptica* obtenidos por decocción fue de  $247.26 \pm 7.83$  mg eq de catequina/100 g de muestra seca. Para los extractos de hoja de *P. americana*, obtenidos por ultrasonido, fue de  $3073.57 \pm 87.07$  mg eq de catequina/100 g de muestra seca. Las concentraciones anteriores fueron de los extractos con mayor contenido de flavonoides cuantificadas por el método del tricloruro de aluminio. Los experimentos de difusión de glucosa demostraron que los extractos obtenidos por ultrasonido (EAU) de *P. americana* presentaron el mejor efecto antidiabético. A una concentración de 130 g/L, el extracto inhibió el 55.3% de la difusión de glucosa a través de una membrana de diálisis.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	X
<b>LISTA DE TABLAS</b>	XII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 1 -</b>
1.2. Hipótesis	- 2 -
1.3. Objetivos	- 2 -
1.3.1. Objetivo general	- 2 -
1.3.2. Objetivos específicos	- 2 -
1.4. Importancia del estudio	- 3 -
1.5. Limitaciones del estudio	- 3 -
<b>2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS</b>	<b>- 4 -</b>
2.1. Diabetes mellitus	- 4 -
2.1.1. Diabetes tipo I	- 4 -
2.1.2. Diabetes tipo II	- 4 -
2.2. Función de la insulina en el organismo	- 5 -
2.3. Síntomas de la diabetes mellitus	- 5 -
2.4. Tratamiento para la diabetes mellitus	- 5 -
2.5. Tratamientos herbolarios para la diabetes mellitus	- 6 -
2.6. Métodos para la determinación de la actividad antidiabética	- 6 -
2.6.1. <i>In vivo</i>	- 6 -
2.6.2. <i>In vitro</i>	- 7 -
2.7. Biosensores para la medición de glucosa	- 8 -
2.8. Plantas con actividad antidiabética	- 10 -
2.9. Generalidades de la <i>Colubrina elliptica</i>	- 11 -
2.10. Los flavonoides	- 12 -

2.11. Los flavonoides y su relación con la actividad antidiabética	- 14 -
2.11. Métodos de extracción	- 15 -
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>- 17 -</b>
3.1. Equipos, reactivos y disolventes	- 17 -
3.2. Obtención de muestras	- 17 -
3.3. Procesamiento de la Muestra	- 18 -
3.4. Obtención de extractos	- 19 -
3.4.1. Extracción metanólica asistida por ultrasonido	- 19 -
3.4.2. Decocción	- 19 -
3.4.3. Infusión	- 19 -
3.5. Cuantificación de flavonoides totales	- 20 -
3.5.1. Método de tricloruro de aluminio	- 20 -
3.5.2. Método del 2-aminoetildifenilborínico	- 21 -
3.6. Evaluación de la difusión de la glucosa	- 21 -
3.7. Validación del medidor de glucosa Accu-Check® Active marca Roche	- 24 -
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>- 26 -</b>
4.1. Localización y obtención de muestras	- 26 -
4.2. Procesamiento de las muestras	- 28 -
4.3. Cuantificación de flavonoides	- 30 -
4.4. Evaluación de la difusión de glucosa	- 36 -
4.5. Correlación lineal de flavonoides totales <i>versus</i> % de inhibición de la difusión de glucosa	- 40 -
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>- 43 -</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>- 44 -</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>- 45 -</b>
APÉNDICE 1	- 48 -
APÉNDICE 2	- 49 -
Apéndice 2.A	- 49 -
Apéndice 2.B	- 50 -
Apéndice 2.C	- 51 -
APÉNDICE 3	- 52 -

Apéndice 3.A	- 52 -
Apéndice 3.B	- 53 -
Apéndice 3.C	- 54 -
APÉNDICE 4	- 55 -
APÉNDICE 5	- 56 -

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación gráfica del modelo propuesto por (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003). - 7 -
- Figura 2. Medidor de glucosa y tiras reactivas marca Roche modelo Accu-Chek® Active. - 10 -
- Figura 3. *C. elliptica*: A) Corteza, B) Hojas y C) Flor. - 12 -
- Figura 4. Estructura base y clasificación de los flavonoides (Martínez-Flórez, González-Gallegos, Culebras, & Tuñon, 2002). - 13 -
- Figura 5. Test de tolerancia a la glucosa después de 5 semanas de tratamiento con isoquercetina (Zhang, Yao, Wang, & Ren, 2011). - 14 -
- Figura 6. A) Corteza de *C. elliptica* B) Hoja de *P. americana*. - 18 -
- Figura 7. Sistema de difusión de glucosa. Modelo adaptado del experimento de Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003). - 23 -
- Figura 8. Localización de la región de Nizanda en Oaxaca. Fuente: Pérez-García, Meave, & Gallardo, (2001). - 26 -
- Figura 9. A) Fotografía de hojas, fruto y tallo de *C. elliptica*. B) Fotografía en microscopio de frutos de *C. elliptica*. Foto tomada de muestras de SERBO. - 27 -
- Figura 10. Vista aérea de los lugares donde se tomaron muestras de *C. elliptica*. Fuente: Google Earth. - 28 -
- Figura 11. Molino ciclónico FOSS Cyclotec™ 1093. - 29 -

Figura 12. A) Polvo tamizado de <i>C. elliptica</i> . B) Polvo tamizado de <i>P. americana</i> .	- 29 -
Figura 13. Mecanismo de acción del método del tricloruro de aluminio (Zhu, Wang, Liu, Xia, & Tang, 2010).	- 31 -
Figura 14. Mecanismo de reacción del éster 2-aminoetildifenilborónico.	- 34 -
Figura 15. Difusión de las muestras control con diferente composición de disolventes.	- 36 -
Figura 16. Cálculo del área bajo la curva de los experimentos de difusión de glucosa. Área y figura obtenida con el programa Advanced Grapher 2.2.	- 37 -
Figura 17. Concentración de glucosa en el tubo exterior vs tiempo del experimento de la difusión de glucosa para extractos de A) <i>P. americana</i> por EAU B) <i>C. elliptica</i> por EAU C) <i>P. americana</i> y <i>C. elliptica</i> por decocción D) <i>P. americana</i> y <i>C. elliptica</i> por infusión.	- 38 -
Figura 18. Correlación de Pearson entre mg de flavonoides presentes en los experimentos y el % de inhibición de la difusión de glucosa.	- 42 -

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Efectos de extractos acuosos (50 g/L) en la difusión de glucosa a través de un tubo de diálisis, después de un periodo de residencia de 26 h (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003). - 11 -
- Tabla 2. Cantidad de extracto agregado al tubo interior para obtener 2.5 mL de la disolución interior a la concentración deseada de extracto y 100 mg/dL de glucosa. - 22 -
- Tabla 3. Contenido de flavonoides totales en *C. elliptica* y *P. americana* de extractos metanólicos obtenidos por ultrasonido (EAU), decocciones e infusiones acuosas, utilizando el método del reactivo tricloruro de aluminio. - 33 -
- Tabla 4. Concentración de flavonoides totales en extractos metanólicos asistidos por ultrasonido, decocciones e infusiones acuosas de *C. elliptica* y *P. americana*. Método del 2-aminoetildifenilborínico. - 35 -
- Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la difusión de glucosa de extractos de *P. americana* y *C. elliptica* a las 6 y 24 h. - 39 -
- Tabla 6. Contenido de flavonoides calculados por el método del tricloruro de aluminio presentes en los experimentos de difusión de glucosa y su respectivo porcentaje de inhibición. - 41 -

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Nivel de significancia
v	Grados de libertad
2-APB	2-aminoetildifenilborónico
DMDI	Diabetes mellitus dependiente de insulina.
DMNDI	Diabetes mellitus no dependiente de insulina
EAM	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
SERBO	Sociedad para el Estudio de los Recursos Bióticos de Oaxaca

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la diabetes mellitus es un padecimiento que ha cobrado importancia debido a su tasa alta de mortalidad. Afecta aproximadamente a 200 millones de personas alrededor del mundo y 300 millones más están en riesgo de padecerla (McCune & Jhons, 2002). En México en el 2010 se presentaron más de 72 mil 499 muertes atribuidas a la diabetes mellitus, lo que representó el 14.7 % del total de las muertes en el país (Secretaría de Salud, 2011).

La diabetes mellitus es un síndrome en el cual los niveles de glucosa en sangre son inapropiadamente altos para el estado fisiológico del individuo (Sobel & Schneider, 2002). Está asociada con enfermedades cardiovasculares, nefropatía, retinopatía y neuropatía (Sobel & Schneider, 2002)

Existen diversos tratamientos para la diabetes mellitus, estos se pueden clasificar en: A) Alópatas, basados en el uso de fármacos para controlar los niveles de glucosa en sangre. B) Homeópatas, sistema terapéutico que consiste en administrar dosis infinitesimales de sustancias que a dosis altas en sujetos sanos provocaría síntomas semejantes a los del enfermo. Este tratamiento exige una “individualización” meticulosa del paciente (Ballester-Sanz, Sanz-Franco, & Galan-Grau, 1999). C) Herbolarios, se basan en el consumo de infusiones de plantas las cuales inhiben los efectos de la diabetes mellitus. Este último tratamiento es una buena opción cuando existe la certeza de que la planta tiene actividad antidiabética. En la mayoría de los casos los costos de infusiones de plantas son menores que los tratamientos alópatas y homeópatas.

Debido a la problemática que representa la diabetes mellitus para la sociedad, en el presente trabajo se realizó un estudio de la actividad antidiabética *in vitro* de la corteza de *Colubrina elliptica* y su posible relación con la presencia de flavonoides. Esta planta se utiliza en el norte de México para atenuar los efectos de la diabetes mellitus tipo II (Marroquín-Segura, Flores P, García B, Mora G, Sánchez R, & Aguilar C, 2005).

## **1.2. Hipótesis**

La actividad antidiabética de extractos de corteza de *C. elliptica* está asociada con la presencia de flavonoides. Esta actividad se debe a que los flavonoides retrasan la absorción de la glucosa en el intestino.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

Relacionar la actividad antidiabética, utilizando el método de la difusión de glucosa *in vitro*, con la presencia de flavonoides totales obtenidos de extractos de corteza de *C. elliptica* y hojas *P. americana*. Estos últimos, se utilizaron como control positivo de la inhibición de la difusión de glucosa.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Obtener muestras de corteza de árboles de *C. elliptica* localizados en Nizanda, Oaxaca, así como hojas de *P. americana*, en el mercado Zaragoza de la Cd. de Huajuapán de León, Oaxaca.
2. Obtener extractos de *C. elliptica* y *P. americana* mediante una extracción con metanol asistida por ultrasonido, decocción e infusión.
3. Cuantificar flavonoides totales presentes en los extractos de corteza de *C. elliptica* y hojas de *P. americana* por los métodos de (Lee, Kim, Lee, & Lee, 2003) y (Hariri, Sallé, & Andary, 1991)
4. Evaluar la difusión de glucosa utilizando el método propuesto por (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003)
5. Determinar los porcentajes de inhibición de la difusión de glucosa de los extractos de *C. elliptica* y *P. americana*.

#### **1.4. Importancia del estudio**

Existe una gran diversidad de plantas reportadas con actividad antidiabética, tal es el caso de *Colubrina elliptica*. A extractos de corteza de esta planta se les evaluó la actividad antidiabética *in vivo* (Marroquín-Segura, Flores P, García B, Mora G, Sánchez R, & Aguilar C, 2005). El estudio concluyó que los extractos tienen actividad antidiabética pero no se determinó su mecanismo de acción ni los compuestos fitoquímicos responsables. Consecuentemente, en este trabajo se realizó un estudio para evaluar un posible mecanismo de acción, la inhibición de la difusión de glucosa, y asociarlo con la presencia de flavonoides.

#### **1.5. Limitaciones del estudio**

Este trabajo se limitó a estudiar a los flavonoides, expresados como flavonoides totales, provenientes de la corteza de *C. elliptica* y hojas de *P. americana*. Se seleccionaron estas partes de las plantas debido a que existen estudios *in vivo* que demuestran su actividad antidiabética. La actividad antidiabética se limitó a ser determinada con el experimento *in vitro* de difusión de glucosa propuesto por Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003).

La planta de interés en este trabajo fue *C. elliptica*, la cual solo ha sido estudiada en un modelo *in vivo*. También se estudió *P. americana* como control positivo para validar el sistema de difusión de glucosa. En la literatura se reporta que esta planta presenta 65.7% de inhibición en la difusión de glucosa en un experimento *in vitro* análogo al que se propone es este trabajo (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003).

## **2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS**

En esta sección se abordaron generalidades de la diabetes mellitus y los tratamientos para minimizar los daños que ocasiona esta enfermedad. También se reportaron los métodos para evaluar la actividad antidiabética y finalmente se realizó una descripción general de *C. elliptica*.

### **2.1. Diabetes mellitus**

Como se definió anteriormente la diabetes mellitus es un síndrome en el cual los niveles de glucosa en sangre son inapropiadamente altos para el estado fisiológico del individuo (Sobel & Schneider, 2002). Las dos formas clínicas en la que se manifiesta son la diabetes tipo I y la diabetes tipo II (Lehninger & Cox, 2005).

#### **2.1.1. Diabetes tipo I**

La diabetes tipo I o diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) (Sobel & Schneider, 2002), es una enfermedad que aparece a edades tempranas y se agrava rápidamente. Procede de un defecto metabólico en el cual existe un déficit de células  $\beta$  pancreáticas y por consiguiente una incapacidad de producir suficiente insulina. La DMDI requiere un tratamiento basado en la administración de por vida de insulina y un cuidadoso control del equilibrio entre la ingesta de glucosa y la dosis de insulina administrada (Lehninger & Cox, 2005).

#### **2.1.2. Diabetes tipo II**

La diabetes tipo II o diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI) es una enfermedad de desarrollo lento, los síntomas son menos graves y a menudo pasan desapercibidos al inicio de la enfermedad. Existe una producción de insulina pero el sistema

de respuesta a ella es defectuoso. Lo cual ocasiona una mala regulación de los niveles de glucosa en sangre (Lehninger & Cox, 2005).

## **2.2. Función de la insulina en el organismo**

Cuando se presenta un aumento de los niveles de glucosa en sangre debido a la ingesta de alimentos ricos en glúcidos, el páncreas activa la segregación de insulina. Consecuentemente aumenta la captación de glucosa por tejidos musculares y adiposos. Una vez en los tejidos, la glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato para dar lugar a la obtención de energía mediante la ruta metabólica de la glucólisis. La glucosa también puede utilizarse para la síntesis de ácidos grasos en el hígado. Los cuales son exportados como triacilglicéridos desde las lipoproteínas plasmáticas al tejido adiposo.

## **2.3. Síntomas de la diabetes mellitus**

Los síntomas característicos de la diabetes tipo I y II son la sed excesiva y la micción frecuente que conduce a la ingesta de grandes cantidades de agua. Estos síntomas son ocasionados por el exceso de glucosa en el organismo, el cual trata de eliminarla vía urinaria. Esta situación es conocida como glucosuria (Lehninger & Cox, 2005).

Otro síntoma característico de la diabetes mellitus es la sobreproducción de cuerpos cetónicos. Los cuerpos cetónicos son moléculas que se ionizan liberando protones. En la diabetes mellitus no controlada, la sobreproducción de estas sustancias acidifica la sangre rebasando la capacidad amortiguadora del bicarbonato. Situación conocida como acidosis que en combinación con la cetosis pone en riesgo potencial al paciente (Lehninger & Cox, 2005).

## **2.4. Tratamiento para la diabetes mellitus**

Los tratamientos para la diabetes mellitus se basan en cuatro aspectos fundamentales: Educación, dieta, ejercicio y fármacos (Marroquín-Segura, Flores P, García B, Mora G, Sánchez R, & Aguilar C, 2005).

Los fármacos para reducir los niveles de glucosa en sangre se clasifican en tres categorías, según su principio de acción.

- a) Sintetizadores de insulina (Ejemplos: Metformina, Rosiglitazona).
- b) Promotores de la secreción de insulina (Ejemplos: Glibenclamida, Tolbutamina).
- c) Agentes que retrasan la absorción de glucosa en el tracto intestinal (Ejemplo: Goma guar).

Los tres tratamientos requieren de una capacidad residual de segregación de insulina en el paciente para ser beneficiado (Sobel & Schneider, 2002).

## **2.5. Tratamientos herbolarios para la diabetes mellitus**

Es evidente el éxito de los agentes farmacéuticos para el tratamiento de la diabetes, sin embargo históricamente las personas han recurrido a tratamientos herbolarios. La información etnobotánica mundial reporta más de 800 plantas para el control de la diabetes mellitus, de las cuales 150 existen en México (Marroquín-Segura, Flores P, García B, Mora G, Sánchez R, & Aguilar C, 2005). La actividad anti-hiperglicemiante de las plantas se puede atribuir a la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino, al incremento en el transporte y metabolismo de glucosa en el músculo al estímulo de la secreción de insulina (Büyükbalci & El, 2008).

## **2.6. Métodos para la determinación de la actividad antidiabética**

Existen dos métodos generales para evaluar la actividad antidiabética de plantas: *In vivo* e *in vitro*.

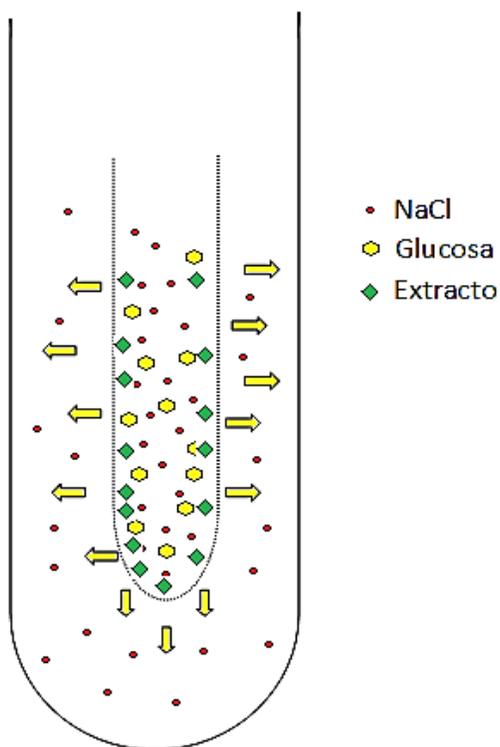
### **2.6.1. *In vivo***

Este modelo se basa en la inducción farmacológica de la diabetes en animales sanos. Luego son expuestos a extractos de plantas medicinales ya sea vía oral o subcutánea, para posteriormente monitorear los niveles de glucosa en sangre.

### 2.6.2. *In vitro*

Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003) propusieron un modelo simple, el cual consiste en medir los efectos que causan los extractos de plantas en la difusión de glucosa a través de una membrana de diálisis. Este modelo simula la absorción de glucosa en el intestino delgado.

El sistema está formado por un tubo de diálisis (6 cm x 15 mm) que contiene 2 mL de una disolución de NaCl 0.15 M, D-(+)-Glucosa al 0.22 mM y el extracto a evaluar, Figura 1. El tubo de diálisis se introduce en un tubo de centrifugación de 50 mL que contiene 45 mL de una disolución de NaCl 0.15 M. Una vez montado el sistema se monitorea la concentración de glucosa en la solución externa. Si los extractos inhiben la difusión normal de la glucosa a través de la membrana se puede decir que tienen un efecto antidiabético (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003).



**Figura 1.** Representación gráfica del modelo propuesto por (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003).

## 2.7. Biosensores para la medición de glucosa

Para la medición de glucosa existen diferentes tipos de métodos, los clásicos se basan en la actividad óptica (polarimetría) o en la reducción de una disolución alcalina de cobre. Estos métodos no son selectivos y únicamente proporcionan la concentración total de azúcares. Consecuentemente es necesario recurrir a la separación de cada uno de los azúcares por cromatografía de gases o líquidos, o utilizar métodos enzimáticos (Hart & Fisher, 1991). En los últimos años se han desarrollado biosensores para la detección y cuantificación de glucosa de manera continua, rápida y sencilla.

Un biosensor está conformado por dos partes: (1) un biorreceptor que consiste de una biomolécula que comúnmente es una enzima capaz de reconocer una molécula específica y (2) un transductor que se encarga de convertir el evento reconocido en una señal que es proporcional al compuesto o grupo de compuestos que se quiere determinar. Si se clasifica a los biosensores en función al tipo de transductor se tienen los siguientes grupos (Peña-García, 2003).

- a) Electroquímicos, que se dividen en potenciométricos, amperométricos y conductimétricos.
- b) Ópticos que pueden ser espectroscópicos de absorción, fluorimétricos.
- c) Térmicos.
- d) De masa.

La utilización de un biosensor otorga ventajas que los métodos colorimétricos y analíticos no poseen. Por ejemplo, son sensibles y estables a concentraciones muy bajas, la lectura se realiza en alrededor de 5 s, no requiere cantidades grandes de muestra, aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ , y además son fáciles de operar. Los métodos analíticos como el HPLC son buenos y ofrecen una confiabilidad alta pero requieren de muestreos periódicos. Además los costos y tiempos de operación son altos.

A lo largo de la historia se han desarrollado dispositivos para cuantificar de forma inmediata la glucosa en sangre. El primer equipo salió a la venta en 1970, consistía de una prueba de tiras reactivas diseñado para evaluar visualmente la concentración de glucosa. Lo innovador de este sistema fue que la lectura de glucosa era inmediata y además la realizaba el paciente mediante una inspección visual, sin embargo carecía de precisión. Fue hasta 1987 cuando sale a la venta el primer medidor de glucosa ExacTech<sup>®</sup> que utilizaba un biosensor electroquímico para la detección de glucosa en sangre. Este equipo contaba con precisión alta, requería poca muestra y por supuesto la evaluación visual ya no era necesaria (Hönes, Müller, & SurrIDGE, 2008). Las investigaciones continuaron, se detectaron posibles interferencias que pudieran dar malas lecturas en la concentración de glucosa. Interferencias como la presencia de medicamentos en la sangre. En la actualidad esta tecnología se ha desarrollado al grado de tener equipos muy sofisticados con un grado alto de selectividad y mínimas interferencias. Sin perder de vista la usabilidad de estos.

Entre los equipos de última generación se encuentra el medidor de glucosa Accu-Chek<sup>®</sup> Active marca Roche. Utiliza un biosensor óptico para la cuantificación de glucosa. La medición se realiza con luz emitida por un diodo a una longitud de onda específica. La luz se irradia sobre una tira reactiva la cual contiene la enzima que reacciona de manera selectiva con la glucosa generando un complejo colorido. Parte de la luz emitida es reflejada y llega a un fotodetector donde se convierte en una corriente eléctrica que expresa la concentración de glucosa. Este dispositivo tiene la ventaja de no interferir en la cuantificación de glucosa por el mismo hecho de cuantificarla. Normalmente los métodos amperométricos se basan en una reacción química para poder generar una corriente eléctrica y de ahí expresar la concentración de glucosa. Sin embargo la cinética de reacción suele alterar los resultados. En cambio con el sensor óptico no existe esta variable ya que la cuantificación se realiza por un método físico (Hönes, Müller, & SurrIDGE, 2008).

Por las cualidades mencionadas anteriormente y su usabilidad en este trabajo se utilizó el medidor de glucosa Accu-Chek<sup>®</sup> Active marca Roche, Figura 2.



**Figura 2.** Medidor de glucosa y tiras reactivas marca Roche modelo Accu-Chek® Active.

## **2.8. Plantas con actividad antidiabética**

Hasta hace algunos años los conocimientos acerca de las propiedades antidiabéticas de las plantas eran adquiridas empíricamente y fueron heredadas a través de los años por nuestros ancestros. Hoy en día existen varios métodos *in vivo* para analizar la actividad antidiabética de plantas. Sin embargo, los estudios *in vitro* son escasos, uno de los más importantes fue publicado por Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003) quienes evaluaron la actividad antidiabética de 10 plantas, Tabla 1. En este estudio los autores reportaron que la agrimonia y el aguacate presentan una disminución en la difusión de glucosa de 71% y 60%, respectivamente.

**Tabla 1.** Efectos de extractos acuosos (50 g/L) en la difusión de glucosa a través de un tubo de diálisis, después de un periodo de residencia de 26 h (Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, 2003).

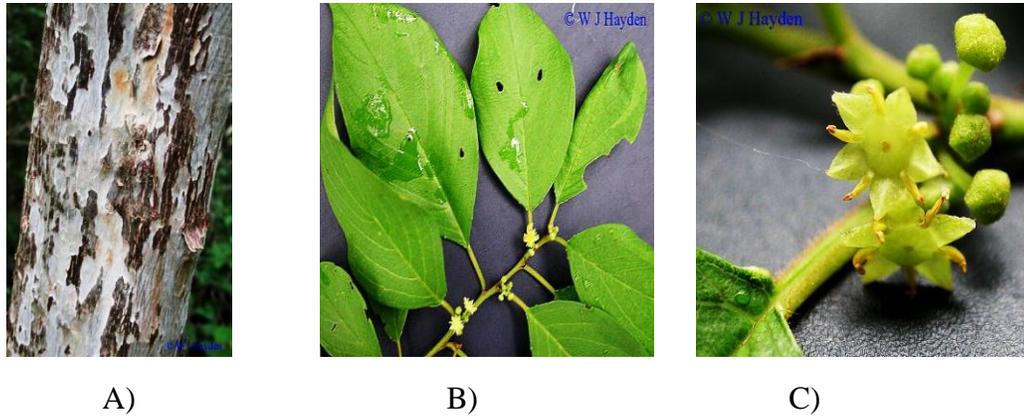
<b>Glucosa en la solución externa</b>		
<b>Prueba</b>	Concentración (mM )	Disminución de la difusión de glucosa (%)
Control:		
En Ausencia de extracto	164.8 ±0.61	---
Extractos de Plantas (50g/L):		
Agrimonia	47.3 ±6.63	71% <sup>***</sup>
Aguacate	65.7 ±2.18	60% <sup>***</sup>
Cilantro	91.4 ±3.48	45% <sup>***</sup>
Saúco	163.4 ±0.81	---
Eucalipto	85.4 ±11.35	48% <sup>***</sup>
Enebro	155.5 ±1.03	6% <sup>**</sup>
Alfalfa	123.6 ±2.82	25% <sup>***</sup>
Muérdago	112.4 ±1.73	32% <sup>***</sup>
Hongos	120.0 ±6.79	27% <sup>***</sup>
Ortiga	158.1 ±5.37	---

Los valores son reportados como la media de un grupo de 3 observaciones

<sup>\*\*</sup>p<0.01 y <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 ambos comparados con el control

## 2.9. Generalidades de la *Colubrina elliptica*

En este trabajo se evaluó la actividad antidiabética de extractos de *Colubrina elliptica*, también conocida como palo de amole, palo de arco o sacna-ché (Marroquín-Segura, Flores P, García B, Mora G, Sánchez R, & Aguilar C, 2005). Este árbol pertenece a la familia *Rhamnacea*, puede alcanzar una altura de 20 m y crece en zonas donde la altitud varía entre 0 y 2,458 metros. Es nativo del norte del Caribe y el sur de Florida, pero también se localiza en México. Es un árbol con corteza moteada, hojas alternadas, simples, elípticas, de base aguda, su flor es de color amarillo verdoso en forma de estambres opuestos a los pétalos pequeños, Figura 3.



**Figura 3.** *C. elliptica*: A) Corteza, B) Hojas y C) Flor.

La corteza de *C. elliptica* se utiliza en el Caribe para elaborar una bebida fermentada que se comercializa con el nombre de MAUBY en Estados Unidos y Canadá (Abdul, 2007).

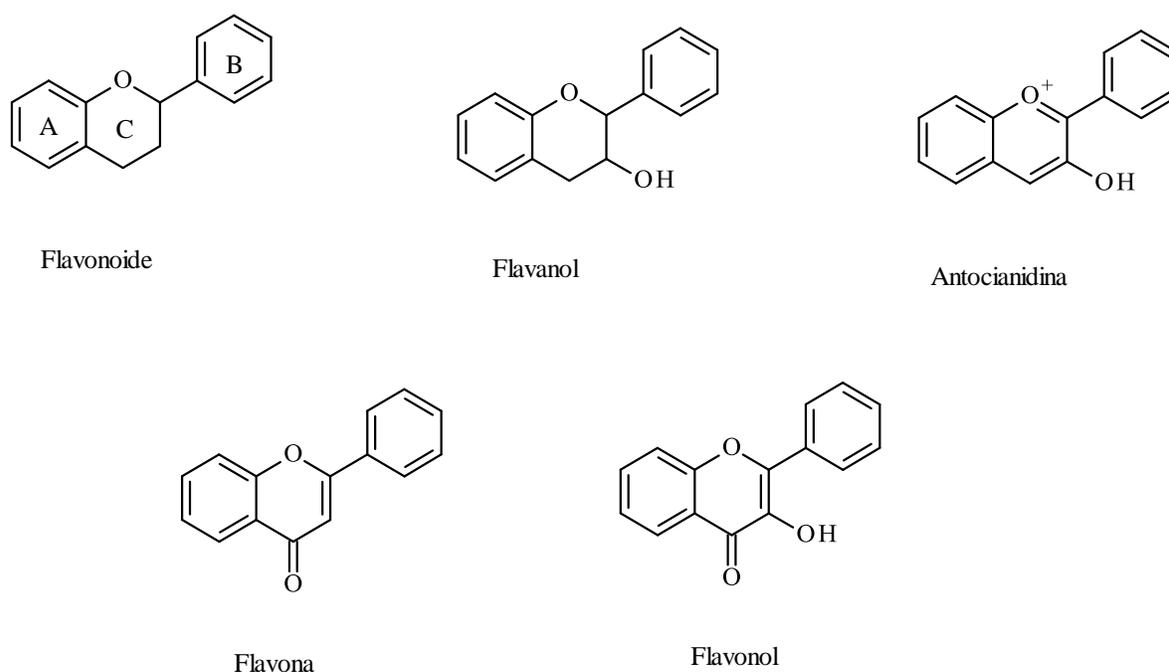
México también es consumidor de *C. elliptica*, principalmente porque se le atribuyen propiedades curativas contra enfermedades como la diabetes mellitus. Sin embargo actualmente existen escasos estudios científicos acerca de las propiedades curativas de esta planta. Se cree que la presencia de flavonoides es el motivo por el cual tiene dicha propiedad. Esta hipótesis se plantea a raíz de un estudio realizado por Mat-Ali (2008) quien estudió la *Colubrina asiática*. En este estudio se reporta que hay una cantidad significativa de compuestos fenólicos, entre los cuales destacan principalmente algunos tipos de glicosil-flavonoides derivados de quercetina y kaempferol.

## **2.10. Los flavonoides**

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en todas las partes de las plantas, y cumplen una función protectora de ella y sus frutos. Por ejemplo, los flavonoides se encargan de proteger a los vegetales de la incidencia de rayos ultravioletas y visibles, protegen a la planta de los insectos, hongos, virus y bacterias. También ejercen un efecto antioxidante, controlan la acción de hormonas vegetales y agentes alelopáticos, son inhibidores de enzimas y además son atractivos de insectos polinizadores. Así como estos compuestos tienen una función relevante en la planta, también cobran importancia farmacéutica. En el ser humano los

flavonoides funcionan como agentes antiinflamatorios, antialérgicos, antiulcerosos, antivirales y anticarcinogénicos. También se han utilizado para tratamientos capilares, de la diabetes mellitus y afecciones cardiacas (Lock, Cabello, & Doroteo, 2006).

Los flavonoides son compuestos de peso molecular bajo, comparten un esqueleto común de fenil-benzopirano, compuesto por dos anillos aromáticos (A y B) y un anillo C de pirano (heterocíclico). Esta estructura base permite una variedad de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: flavanoles, antocianidinas, flavonas y flavonoles, Figura 4 (Martínez-Flórez, González-Gallegos, Culebras, & Tuñon, 2002).

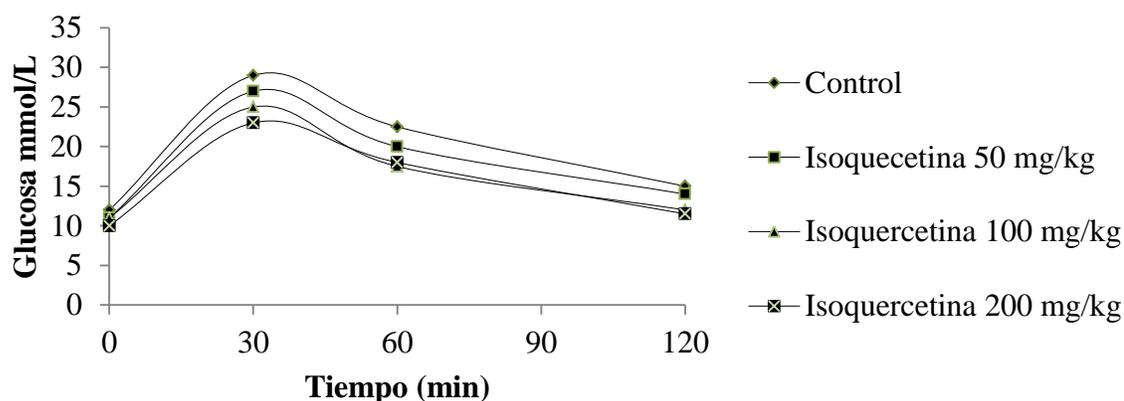


**Figura 4.** Estructura base y clasificación de los flavonoides (Martínez-Flórez, González-Gallegos, Culebras, & Tuñon, 2002).

Los flavonoides son susceptibles de disolverse en agua y disolventes orgánicos polares, esto favorece su extracción de manera fácil y eficiente.

## 2.11. Los flavonoides y su relación con la actividad antidiabética

La relación que existe entre los flavonoides y la actividad antidiabética ha sido estudiada en modelos *in vivo*. Zhag, Yang, Yingping, & Guixing, (2011) estudiaron el efecto del flavonoide isoquercetina en ratones con diabetes mellitus inducida. Los autores plantearon que la isoquercetina inhibe la acción de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa localizada en el epitelio del intestino delgado. La inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa retrasa la absorción de carbohidratos en el intestino delgado y consecuentemente disminuye la hiperglucemia. Los experimentos consistieron en suministrar diferentes dosis de isoquercetina (50, 100 y 200 mg de isoquercetina/kg) a grupos de ratones con diabetes mellitus inducida y comparar el efecto de estos con un grupo de ratones control al cual no se le suministró isoquercetina. La dieta y agua proporcionadas durante el desarrollo del experimento fue la misma para todos los casos. La glucosa fue monitoreada en la sangre de los ratones durante 5 semanas después de haber sido sometidos al tratamiento de isoquercetina, utilizando un medidor de glucosa Accu-Check<sup>®</sup> marca roche en intervalos de tiempo de 30, 60 y 120 min. Los resultados muestran que todos los ratones sometidos a los diferentes tratamientos de isoquercetina presentan una menor concentración de glucosa en sangre respecto al control. Además, los autores observaron una fuerte dependencia entre la concentración de isoquercetina suministrada y los niveles de glucosa en sangre, Figura 5. El mejor tratamiento consistió en el suministro de 200 mg de isoquercetina/kg y el de menor efecto el de 50 mg de isoquercetina/kg.



**Figura 5.** Test de tolerancia a la glucosa después de 5 semanas de tratamiento con isoquercetina (Zhang, Yao, Wang, & Ren, 2011).

En el trabajo anterior se observa un efecto evidente de la isoquercetina en la disminución de la glucosa en sangre de ratones con diabetes mellitus inducida. Sin embargo, no se ha demostrado si el mecanismo de acción es la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Con la información de este trabajo se puede plantear que si la isoquercetina tiene efecto antidiabético es posible que otros flavonoides también presenten ese efecto. Por consiguiente en este trabajo se estudió la actividad antidiabética de extractos con flavonoides obtenidos por ultrasonido, infusión y decocción de corteza de *C. elliptica* y hojas de *P. americana* (control) utilizando un modelo *in vitro* de difusión de glucosa.

## **2.11. Métodos de extracción**

Los métodos de extracción consisten en manipular las propiedades físicas de los disolventes para reducir la tensión superficial, aumentar la solubilidad y promover una mayor tasa de difusión. Estos métodos se pueden clasificar en: a) simples, como la decocción, infusión y extracción sólido-líquido y b) complejos, como la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU) (Meireles, 2009).

Para elegir un método de extracción es necesario tener en cuenta el tipo de muestra que se va a procesar y el producto que se quiere extraer. Los flavonoides se encuentran en el interior de las células vegetales. Son sintetizados en el citoplasma y luego son transportados a su destino final en las vacuolas. (Winkel-Shirley, 2001). Debido a esto, es necesario aplicar métodos complejos de extracción para extraer flavonoides de muestras de origen vegetal.

En este trabajo se extrajeron flavonoides utilizando la EAU. Este método promueve la *lisis* de las células vegetales liberando las sustancias presentes en el interior. Además este método no incrementa la temperatura del medio evitando la degradación de los flavonoides (Meireles, 2009).

La extracción asistida por ultrasonido funciona con ondas sonoras, generando ciclos de expansión y compresión en la materia. Este fenómeno produce burbujas en el líquido ocasionando una presión negativa hasta de 50 MPa por unos microsegundos. El colapso de las burbujas causa cavitación originando la ruptura de la pared celular; como resultado, existe una

mayor penetración de los disolventes en las células y una intensificación de la transferencia de masa (Meireles, 2009).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Equipos, reactivos y disolventes

Balanza analítica SARTORIUS BL210S, Congelador GENERAL ELECTRIC FUM 17DRBRWH, rotavapor HEIDOLPH Laborota 4000, sonicador-degasificador BRANSON 8510, centrífuga IEC HN-SII, vortex IKA vortex3, lector de microplacas BIOTEC LX-808, microplaca de 96 pozos de poliestireno de fondo plano, molino de tornillo sin fin ESTRELLA # 10, molino ciclónico FOSS Cyclotec 1093, medidor de glucosa ROCHE Accu-Chek<sup>®</sup> Active, tiras reactivas ROCHE Accu-Chek<sup>®</sup>, membrana de diálisis Spectra/Por, MWCO: 2000. D-(+)-Glucosa 99.5% Sigma Aldrich, Cloruro de Aluminio 97.8% J. T. Baker, Nitrito de Sodio 97.0% Monterrey, Hidróxido de Sodio 99% Merk, Cloruro de Sodio 99.5% Merk, Metanol 99.9% Química Meyer, hexanos Mallinckrodt 100%, H<sub>2</sub>O desionizada y destilada.

#### 3.2. Obtención de muestras

La corteza de *C. elliptica* se obtuvo de la comunidad de Nizanda, ubicada en el municipio de Asunción Ixtepec, Oaxaca el día 29 de julio de 2011. Se identificaron árboles de *C. elliptica* a 119 m de altitud, 95°01'19.559''W 16°40'07.32''N y a 130 m de altitud 95°01'15.6''W 16°40'00.12''N. Se tomaron muestras de corteza de dos árboles en estado saludable, Figura 6A.

Las muestras de *Persea americana* (control) se obtuvieron del mercado Ignacio Zaragoza en Huajuapán de León, Oaxaca el día 10 de agosto de 2011, Figura 6B.



**Figura 6.** A) Corteza de *C. elliptica* B) Hoja de *P. americana*.

Las muestras se transportaron a los laboratorios de la Universidad Tecnología de la Mixteca (UTM) en bolsas abiertas con circulación de aire. El tiempo entre la colecta y el procesamiento de la muestra no excedió los tres días.

### **3.3. Procesamiento de la Muestra**

Las muestras fueron pesadas y se les determinó la humedad. Obteniendo para 1.215 kg de corteza de *C. elliptica* una humedad de  $37.3 \pm 3.4\%$  y para 230 g de hojas de *Persea americana*  $40.6 \pm 0.8\%$ . Después se redujo la humedad en un secador de charolas rotatorio a  $40^{\circ}\text{C}$  y una velocidad de aire de 1.2 m/s. La humedad final fue de  $3.6 \pm 0.8\%$  para *C. elliptica* y  $9.3 \pm 0.3\%$  para *P. americana*. Luego se redujo el tamaño de partícula en un molino de tornillo sin fin y después en un molino ciclónico. Los polvos se tamizaron con una malla número 20 para *C. elliptica* y 40 para *P. americana*. Finalmente los polvos tamizados se almacenaron en frascos ámbar en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Obtención de extractos**

#### **3.4.1. Extracción metanólica asistida por ultrasonido**

Se pesaron 9 g de polvo de *C. elliptica* o *P. americana* en un tubo para centrífuga de 45 mL con tapa y se agregaron 5 mL de Et<sub>2</sub>O, para remover los pigmentos no polares. El tubo se cerró y sometió a un baño ultrasónico por 15 min a 35°C. Después se centrifugó por 15 min a 4000 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se decantó y desechó. La extracción con Et<sub>2</sub>O, centrifugación y decantación se realizó dos veces. A los sólidos obtenidos se aplicó la misma serie de pasos anteriormente descritos, sustituyendo el Et<sub>2</sub>O por MeOH. En esta ocasión el sobrenadante se decantó y filtró en un papel whatman No. 1. Después, el MeOH se removió en un rotavapor a 40°C a vacío. Finalmente, los extractos libres de disolvente se almacenaron a -20°C.

#### **3.4.2. Decocción**

En un matraz Erlenmeyer se pesaron 6 g de polvos de *C. elliptica* o *P. americana* y se le adicionaron 40 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Esta mezcla se calentó en una parrilla eléctrica con agitación magnética. Una vez alcanzado el punto de ebullición se retiró de la fuente de calor y se dejó enfriar por 15 min, manteniendo la agitación. Después se filtró a vacío con un papel filtro whatman No. 1. El líquido filtrado se ajustó a un volumen de 40 mL con H<sub>2</sub>O y se almacenó en frascos ámbar a -20°C hasta su análisis.

#### **3.4.3. Infusión**

En un matraz Erlenmeyer se pesaron 6 g de polvos de *C. elliptica* o *P. americana* y se adicionaron 40 mL de H<sub>2</sub>O destilada en ebullición. Se agitó hasta homogenizar y se dejó reposar por 15 min. Después se filtró utilizando vacío con un papel filtro whatman No. 1. El líquido filtrado se ajustó a un volumen de 40 mL y se almacenó en frascos ámbar a -20°C hasta su análisis.

### 3.5. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó mediante los métodos espectrofotométricos del tricloruro de aluminio y el 2-aminoetildifenilborínico (2-APB). Los disolventes utilizados en ambos métodos fueron previamente destilados y desgasificados para evitar interferencias en la medición y la degradación de los flavonoides. Los extractos de *C. elliptica* y *P. americana* libres de disolvente obtenidos en la sección 3.4.1 se disolvieron con H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen de 18 mL para alcanzar una concentración de 500 g de polvos/L. En el caso de la decocción e infusión solo fueron descongelados respetando la concentración que ya tenían, 150 g de polvos/L.

#### 3.5.1. Método de tricloruro de aluminio

Este método consiste en formar un complejo de aluminio-flavonoide en medio básico que presenta una coloración rosa salmón que absorbe a 490 nm. A continuación se describe la preparación de disoluciones y cuantificación de flavonoides.

*Preparación de disoluciones.* Disolución de AlCl<sub>3</sub> al 3% (p/v): Se pesaron 0.3 g de AlCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O y se mezclaron con H<sub>2</sub>O desionizada y desgasificada hasta un volumen final de 10 mL. Disolución de NaNO<sub>2</sub> al 1.5% (p/v): Se pesaron 0.15 g de NaNO<sub>2</sub> y se mezcló con H<sub>2</sub>O desionizada y desgasificada hasta un volumen final de 10 mL. Disolución de NaOH 1.0 M: Se pesaron 0.4 g de NaOH y se mezcló con H<sub>2</sub>O desionizada y desgasificada hasta un volumen final de 10 mL. Disolución stock de catequina a 1000 ppm: Se pesaron 10 mg de catequina y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con MeOH. Disoluciones estándares: Se diluyeron alícuotas de 100, 200, 250, 300, y 400 µL del stock con MeOH para obtener 5 mL de estándares a 20, 40, 50, 60 y 80 ppm respectivamente.

*Cuantificación de flavonoides.* De acuerdo a la metodología propuesta por Lee, Kim, Lee, & Lee, (2003) se mezcló 1 mL de extracto con 1 mL de NaNO<sub>2</sub> al 1.5% y se agitó durante 1 min en un vortex. Después, 50 µL de la mezcla se adicionaron en un pozo de una microplaca y se agregaron 50 µL de AlCl<sub>3</sub> al 3%. La mezcla se agitó con intensidad media por un minuto en el lector de microplacas. Posteriormente, se agregaron 50 µL de NaOH 1 M y nuevamente se agitó la placa por un min. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas a

490 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para los extractos metanólicos obtenidos por ultrasonido, decocciones e infusiones acuosas de *C. elliptica* y *P. americana* y para la obtención de la curva de calibración con catequina. Para realizar la cuantificación se construyó una curva de calibración con catequina, Apéndice 1. El contenido de flavonoides en las muestras se expresó como mg equivalentes de catequina/100 g de material vegetal seco.

### **3.5.2. Método del 2-aminoetildifenilborínico**

Este método consiste en formar un complejo colorido que absorbe a 405 nm. A continuación se describe la preparación de disoluciones y cuantificación de flavonoides.

*Preparación de disoluciones.* Disolución de 2-aminoetildifenilborínico al 1% (p/v): Se pesaron 0.1 g de 2-aminoetildifenilborínico y se mezclaron con 10 mL de MeOH hasta un volumen final de 10 mL. Disolución stock de rutina a 1000 ppm: Se pesaron 10 mg de catequina y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforaron con MeOH; Disoluciones estándares: Se diluyeron alícuotas de 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu$ L del stock con MeOH para obtener 5 mL de estándares a 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, respectivamente.

*Cuantificación de flavonoides.* De acuerdo a la metodología propuesta por Hariri, Sallé, & Andary, (1991) Se adicionaron 100  $\mu$ L del extracto en un pozo de una microplaca. Después se adicionaron 50  $\mu$ L de 2-aminoetildifenilborínico 1%, y la placa se agitó con intensidad media por un min en el lector de microplacas. La mezcla se dejó reposar por 30 min. Después se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 405 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para los extractos metanólicos obtenidos por ultrasonido, decocciones e infusiones acuosas de *C. elliptica* y *P. americana* y para la obtención de la curva de calibración con rutina. Para realizar la cuantificación se construyó una curva de calibración con rutina, Apéndice 2. El contenido de flavonoides en las muestras se expresó como mg equivalentes de rutina/100 g de material vegetal seco.

### **3.6. Evaluación de la difusión de la glucosa**

*Preparación de disoluciones.* Disolución de D-(+)-glucosa 800 mg/dL: se pesaron 4 g de D-(+)-glucosa y se mezclaron con H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen de 500 mL. Disolución de

NaCl 0.15 M: se pesaron 4.38 g de NaCl y se mezclaron con H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen de 500 mL.

*Procedimiento para evaluar la difusión de glucosa.* De acuerdo con el experimento de Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003). Se construyó un sistema de difusión de glucosa con un tubo de ensaye de plástico de 5 x 1.6 cm y una membrana de diálisis de 5 x 1.1 cm. Se selló la parte inferior de la membrana y se agregaron 312.5 µL de D-(+)-glucosa 800 mg/dL, 22 mg de NaCl y el volumen de extracto de *C. elliptica* o *P. americana* a 500 g/L para obtener las concentraciones deseadas de extracto en el tubo interior, Tabla 2.

**Tabla 2.** Cantidad de extracto agregado al tubo interior para obtener 2.5 mL de la disolución interior a la concentración deseada de extracto y 100 mg/dL de glucosa.

Extractos (g de polvos/L)	Volmen de extracto (mL)	Disolventes	Contración final en 2.5 mL del tubo interior (g/L)
<i>C. elliptica</i> metanólico (500 g/L)	0.65	Hasta 1.5 mL con H <sub>2</sub> O + 1 mL de EtOH	130
<i>C. elliptica</i> decocción (300 g/L)*	2.16	H <sub>2</sub> O	260
<i>C. elliptica</i> Infusión (150 g/L)	2.16	H <sub>2</sub> O	260
<i>P. americana</i> metanolico (500 g/L)	0.050	Hasta 1.5 mL con H <sub>2</sub> O + 1 mL de EtOH	10
<i>P. americana</i> metanolico (500 g/L)	0.65	Hasta 1.5 mL con H <sub>2</sub> O + 1 mL de EtOH	130
<i>P. americana</i> decocción (150 g/L)	2.16	H <sub>2</sub> O	130
<i>P. americana</i> infusión (300 g/L)*	2.16	H <sub>2</sub> O	130

Los extractos metanólicos, decocciones e infusiones se prepararon utilizando la metodología 3.4.1, 3.4.2 y 3.4.3 respectivamente. \*En este caso se aplicó la metodología pesando 12 g de muestra.

Debido a la poca solubilidad de los extractos metanólicos en H<sub>2</sub>O, los extractos se diluyeron hasta 1.5 mL con H<sub>2</sub>O y posteriormente se adicionó 1 mL de EtOH. Para las decocciones e infusiones solo se utilizó H<sub>2</sub>O como disolvente. En el exterior de la membrana se adicionaron 2.5 mL de una disolución de NaCl 0.15 M, con la misma composición de disolvente que el tubo interior correspondiente para cada experimento, Figura 7.



**Figura 7.** Sistema de difusión de glucosa. Modelo adaptado del experimento de Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003).

La concentración de glucosa se monitoreó en el tubo externo en intervalos de 2 h durante 6 h y medición final a las 24 h. Antes de cada medición se agitó el sistema para homogenizar la disolución. Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L y se colocó en una tira reactiva montada en el medidor de glucosa Accu-Chek<sup>®</sup> Actice, el cual iniciaba automáticamente la rutina de cuantificación al momento de colocar la tira reactiva. Una vez colocados los 20  $\mu$ L el equipo realizaba la cuantificación de forma inmediata.

Durante las pruebas preliminares se detectó que los extractos y los disolventes interfieren en la lectura de glucosa. Por lo tanto, para medir la concentración real de glucosa en el exterior se aplicó la fórmula siguiente.

$$G_e = G_a - G_b \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

$G_e$  = Concentración real de glucosa en el exterior de la membrana del experimento de Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003).

$G_a$  = Concentración de glucosa en el exterior de la membrana del experimento de Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003) en presencia de glucosa.

$G_b$  = Concentración de glucosa en el exterior de la membrana del experimento del Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003) en ausencia de glucosa.

De esta forma se obtuvieron las concentraciones reales de glucosa en el exterior. Este paso se realizó para los extractos metanólicos, decocciones e infusiones.

### **3.7. Validación del medidor de glucosa Accu-Check® Active marca Roche**

Para tener la seguridad de que se realizó una lectura correcta de las concentraciones de glucosa. Se validó el medidor de glucosa Accu-Check® Active marca Roche. A continuación se describe la preparación de disoluciones y el método de validación.

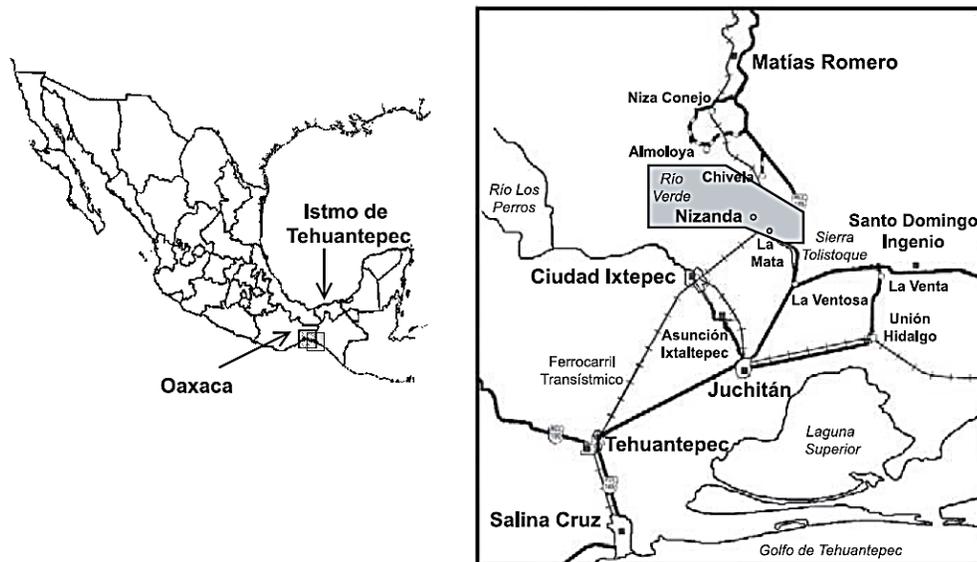
*Preparación de disoluciones.* Disolución stock de D-(+)-glucosa 800 mg/dL: se pesaron 4 g de D-(+)-glucosa y se mezclaron con H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen de 500 mL; disoluciones estándares: Alícuotas de 0.25, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5, 3.125 mL de la disolución stock se diluyeron con H<sub>2</sub>O para obtener 10 mL de estándares a 20, 50, 100, 150, 200, 250 mg/dL respectivamente.

*Método de validación.* Se colocó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  del estándar en una tira reactiva montada en el medidor de glucosa. El equipo cuantificó la glucosa de la muestra en los primeros 5 s, de lo contrario indicaba error y era necesario repetir el procedimiento. Finalmente, con los datos obtenidos se llevó a cabo una correlación lineal y se obtuvo la ecuación de calibración  $y = 1.0556x - 4.1363$ , con una  $R^2 = 0.998$ , Apéndice 1.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Localización y obtención de muestras

Para localizar plantas de *C. elliptica* se realizó una revisión bibliográfica. Como resultado de esa revisión se encontró que Pérez-García & Meave, (2004) identificaron esta planta en la localidad de Nizanda, Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, Figura 8.



**Figura 8.** Localización de la región de Nizanda en Oaxaca. Fuente: Pérez-García, Meave, & Gallardo, (2001).

Para identificar de manera adecuada a la planta se visitó el herbario SERBO. Lugar donde se encuentran almacenadas muestras de hojas y frutos deshidratados de especímenes de *C. elliptica* que crecen en el estado de Oaxaca, Figura 9. De manera adicional, cuentan con información de la localización geográfica de las fuentes de estas muestras. Esta información

fue de utilidad para ubicar árboles en regiones específicas del estado. Particularmente fue de interés para el estudio, localizar árboles de *C. elliptica* en la región del Istmo, Apéndice 4. Posteriormente, con esta información se visitó la comunidad de Nizanda. Se tramitaron los permisos necesarios con las autoridades correspondientes<sup>1</sup> y el día 29 de julio de 2011 se procedió a la búsqueda y toma de muestras. Para identificar a *C. elliptica* a partir de las diversas plantas existentes en Nizanda se compararon las hojas de las plantas con las imágenes obtenidas del herbario. Además se contaba con las características morfológicas descritas en la literatura lo cual facilitó descartar de manera inmediata plantas que no cumplieran con estas características.



**Figura 9.** A) Fotografía de hojas, fruto y tallo de *C. elliptica*. B) Fotografía en microscopio de frutos de *C. elliptica*. Foto tomada de muestras de SERBO.

Se localizaron plantas de *C. elliptica* en las proximidades de las vías del tren transístmico a 119 m de altitud  $95^{\circ}01'19.559''W$   $16^{\circ}40'07.32''N$  y a 130 m de altitud  $95^{\circ}01'15.6''W$   $16^{\circ}40'00.12''N$ , Figura 10. El acceso desde Nizanda a estos lugares fue complicado, debido a que sólo se puede llegar atravesando senderos estrechos y en ocasiones por las vías del tren. Fue necesario auxiliarnos de dos pobladores<sup>2</sup> de Nizanda los cuales conocen esta zona. Se tomaron muestras de corteza de dos árboles en estado saludable y el mismo día de la colecta las muestras se transportaron en bolsas de plástico color negro a las instalaciones de la UTM.

<sup>1</sup> Comisario Ejidatario de Nizanda, Bartolomino Reyes Manuel

<sup>2</sup> Gerardo Reyes Manuel y Julio César Manuel Ordaz



**Figura 10.** Vista aérea de los lugares donde se tomaron muestras de *C. elliptica*. Fuente: Google Earth.

## 4.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron en cuatro etapas: 1) Secado a 50°C y a una velocidad de aire de 1.2 m/s, 2) Molienda en un molino ciclónico, 3) Tamizado y 4) Extracción.

1. *Secado*. El secado se realizó para prolongar el tiempo de vida de las muestras, además ayuda a la obtención de polvos evitando la formación de aglomerados en la molienda.

2. *Molienda en molino ciclónico*. Esta molienda permitió reducir el tamaño de partícula de las muestras con el correspondiente aumento en el área de contacto con el disolvente. Los beneficios que ofrece este tipo de molienda son un rendimiento alto (88.1 % para *C. elliptica* y 75.2 % para *P. americana*) y poco calentamiento de la muestra por fricción, los polvos no superaron los 40°C, Figura 11.



**Figura 11.** Molino ciclónico FOSS Cyclotec™ 1093.

3. *Tamizado*. La muestra molida se tamizó para remover partículas que pudieran generar heterogeneidad en la muestra y afectar la reproducibilidad de los experimentos de cuantificación de flavonoides totales y difusión de glucosa. En el caso de *C. elliptica* se retuvieron sólidos color negro, correspondientes al deterioro ambiental de partes aisladas de la corteza. Estos sólidos retenidos corresponden a < 1% de los sólidos totales. En *P. americana* no se retuvieron sólidos y prácticamente toda la muestra se tamizó, Figura 12.



A)



B)

**Figura 12.** A) Polvo tamizado de *C. elliptica*. B) Polvo tamizado de *P. americana*.

4. *Extracción*. Para obtener extractos ricos en flavonoides se realizó una extracción asistida por ultrasonido. En relación a los extractos de *Persea americana*, estos presentaron una coloración verde intensa debido a la presencia de clorofilas. Los extractos coloridos, generalmente presentan interferencias en las cuantificaciones espectrofotométricas. Por lo que se llevó a cabo una extracción preliminar con Et<sub>2</sub>O a los polvos de *P. americana* y *C. elliptica* para remover las clorofilas y otros pigmentos no polares. El uso de Et<sub>2</sub>O no afectó la concentración de flavonoides en los polvos debido a que éstos prácticamente son insolubles en Et<sub>2</sub>O.

Una vez obtenidos los extractos metanólicos se removió el disolvente con un rotavapor cuidando que este proceso se llevara a cabo a temperaturas inferiores a los 40°C. En el caso de los extractos acuosos se removió H<sub>2</sub>O utilizando un liofilizador ya que una evaporación en rotavapor requeriría del uso de baños a temperaturas superiores a los 40°C, y esto podría degradar a los flavonoides. Los extractos libres de disolvente favorecen la conservación de los flavonoides.

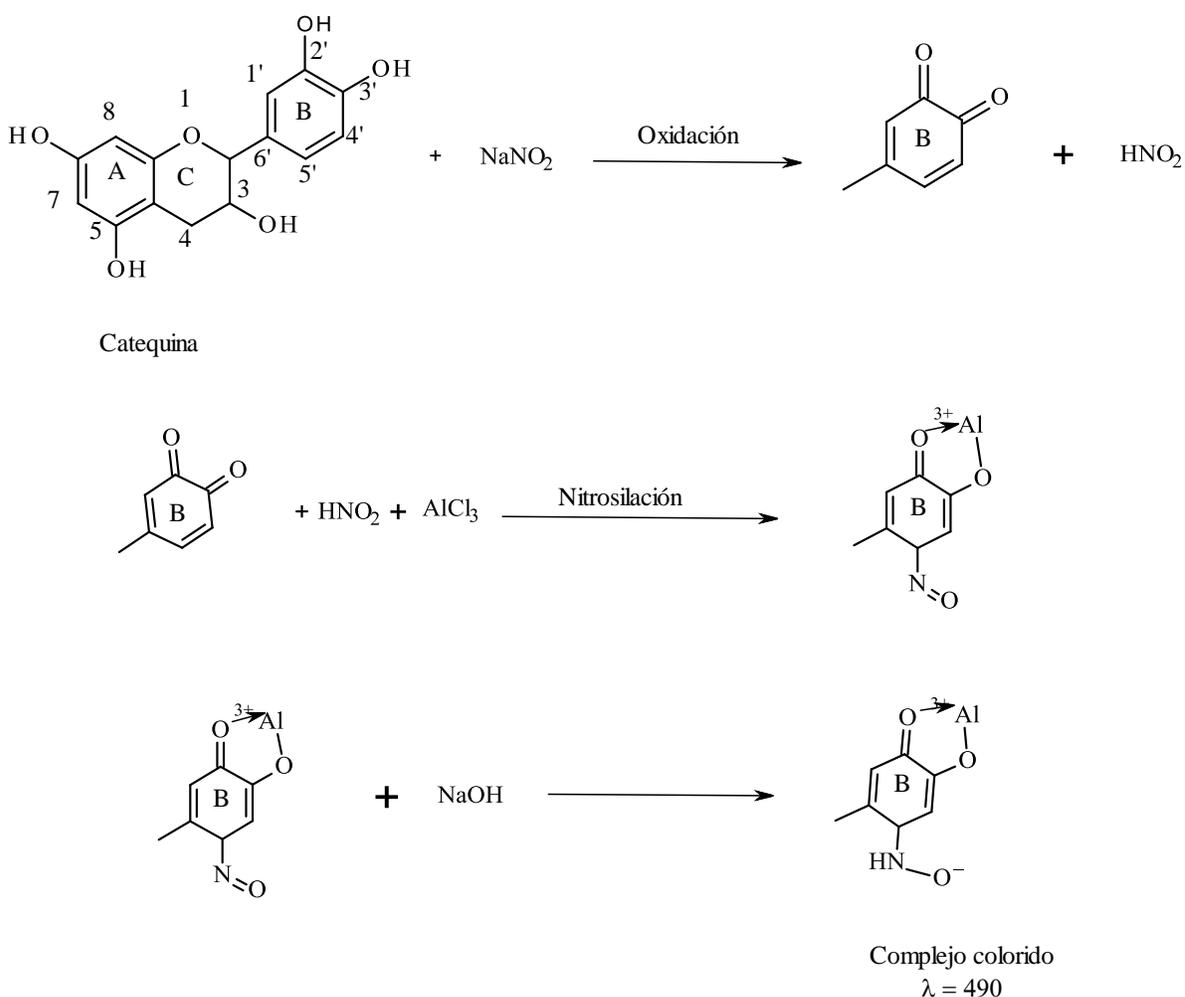
Finalmente las muestras se almacenaron en congelación a -20°C en frascos color ámbar cerrados para evitar la degradación de los flavonoides.

### **4.3. Cuantificación de flavonoides**

La concentración de flavonoides totales se determinó por los métodos de tricloruro de aluminio y 2-aminoetildifenilborónico. Comparando los resultados podemos plantear de manera general la variedad de flavonoides presentes en la muestra. A continuación se describen las características distintivas de los dos métodos:

*Cuantificación de flavonoides totales por el método del reactivo tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>):* El principio de este método se basa en la reacción de los iones de aluminio con los flavonoides en medio alcalino formando un complejo color rojo. Al medir la absorbancia a 490 nm es posible determinar la concentración de flavonoides totales (Zhu, Wang, Liu, Xia, & Tang, 2010).

En la primera etapa de la reacción los grupos hidroxilo del anillo B en las posiciones C2' y C3', en presencia de  $\text{NaNO}_2$  sufren una oxidación convirtiéndose en carbonilos. Como producto de reacción se genera  $\text{HNO}_2$  el cual en la segunda etapa, en presencia de  $\text{AlCl}_3$ , promueve una nitrosilación del anillo B en C5'. Adicionalmente, el aluminio se enlaza con el oxígeno en C4' y se coordina con el grupo carbonilo del C3'. En esta etapa la muestra adquiere un color amarillo. Finalmente con la adición de  $\text{NaOH}$  se reduce el oxígeno del grupo nitrosilo y la muestra adquiere el color rojo característico de esta prueba, Figura 13 (Zhu, Wang, Liu, Xia, & Tang, 2010).



**Figura 13.** Mecanismo de acción del método del tricloruro de aluminio (Zhu, Wang, Liu, Xia, & Tang, 2010).

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de flavonoides totales de los extractos de *P. americana* por el método del  $\text{AlCl}_3$ . Con estos datos se realizó una prueba de Duncan de  $\alpha = 0.05$  (nivel de significancia) y  $\nu = 6$  (grados de libertad) para evaluar posibles diferencias significativas entre los tres métodos de extracción utilizados en el presente trabajo para la obtención de flavonoides. Se demostró que la EAU con MeOH es mejor que la decocción e infusión con  $\text{H}_2\text{O}$ . Este comportamiento se debe a los siguientes factores: a) Los flavonoides de *P. americana* presentaron mayor afinidad al MeOH que al  $\text{H}_2\text{O}$ , debido a que éstos tienen polaridades similares al MeOH promoviendo su solubilización, b) La EAU promueve la ruptura de la pared celular liberando una mayor cantidad de flavonoides al disolvente, en la decocción e infusión ésta ruptura celular no es tan eficiente, c) La EAU se realiza a temperaturas por debajo de los  $40^\circ\text{C}$  lo cual evita la degradación de los flavonoides, la decocción e infusión se llevan a cabo a temperaturas cercanas a los  $100^\circ\text{C}$ , situación que conduce a la degradación de flavonoides. La prueba de Duncan también evidenció que no existe diferencia significativa en la obtención de flavonoides por decocción e infusión. Por lo cual podemos decir que para el caso de *P. americana* se obtiene la misma cantidad de flavonoides en la decocción e infusión.

En la Tabla 3 también se muestran los resultados obtenidos de la prueba de Duncan para *C. elliptica* y éstos indican que los tres métodos de extracción son diferentes entre sí. La mejor extracción se obtuvo con la decocción seguida de la infusión y la EAU. Este comportamiento se puede explicar de la manera siguiente: a) La polaridad de los flavonoides de *C. elliptica* tienen mayor afinidad al  $\text{H}_2\text{O}$  que al MeOH, probablemente debido a la presencia de glicosilflavonoides, b) Los extractos de *C. elliptica* requieren de tratamientos más severos como la decocción para poder extraer a los flavonoides.

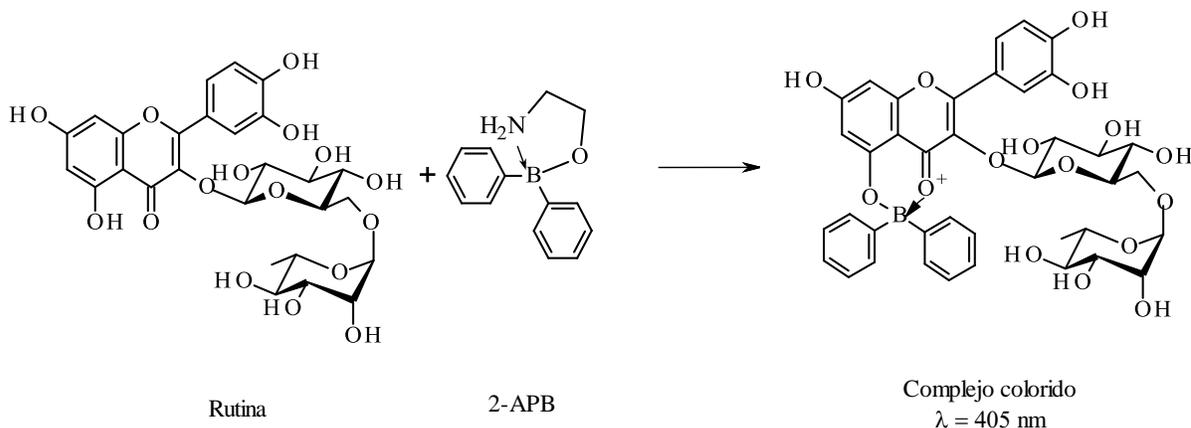
A partir de la cuantificación de flavonoides por el método del reactivo  $\text{AlCl}_3$  podemos concluir lo siguiente: a) En *P. americana* y *C. elliptica* están presentes los flavonoides, b) La concentración en *P. americana* es aproximadamente 23 veces mayor a la de *C. elliptica* y c) La EAU es mejor que la decocción e infusión cuando se tienen muestras ricas en flavonoides como es el caso de *P. americana*.

**Tabla 3.** Contenido de flavonoides totales en *C. elliptica* y *P. americana* de extractos metanólicos obtenidos por ultrasonido (EAU), decocciones e infusiones acuosas, utilizando el método del reactivo tricloruro de aluminio.

Extracto	Flavonoides totales (mg eq de catequina /100 g de muestra seca)
<i>P. americana</i> * EAU <sup>1</sup>	3073.57 ± 87.07 <sup>a</sup>
<i>P. americana</i> decocción <sup>2</sup>	1998.40 ± 34.69 <sup>b</sup>
<i>P. americana</i> infusión <sup>2</sup>	1949.37 ± 33.24 <sup>b</sup>
<i>C. elliptica</i> EAU <sup>1</sup>	135.31 ± 6.19 <sup>a</sup>
<i>C. elliptica</i> decocción <sup>3</sup>	247.26 ± 7.83 <sup>b</sup>
<i>C. elliptica</i> infusión <sup>3</sup>	165.18 ± 5.34 <sup>c</sup>

Notas: Flavonoides totales (Lee, Kim, Lee, & Lee, 2003); Promedio de tres mediciones ± desviación estándar. \*Control positivo. Letras diferentes para cada muestra vegetal indican una diferencia significativa entre medias ( $\alpha = 0.05$  y  $\nu = 6$ ) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan. Curva de calibración con catequina: <sup>1</sup> ( $y = 0.0063x - 0.0263$ ,  $R^2 = 0.998$ , apéndice 2.A), <sup>2</sup> ( $y = 0.005x - 0.0035$ ,  $R^2 = 0.989$ , apéndice 2.B) y <sup>3</sup> ( $y = 0.0059x - 0.0209$ ,  $R^2 = 0.99$ , apéndice 2.C).

*Cuantificación de flavonoides totales por el método del reactivo 2-aminoetildifenilborínico (2-APB).* Este método consiste en intercambiar el ligando 2-aminoetanol por un flavonoide en el 2-APB. El complejo éster flavonoide-difenilborínico produce una solución de color rosa, que absorbe a 405 nm (Hariri, Sallé, & Andary, 1991). Este complejo solamente se forma si en la estructura del flavonoide existe un grupo hidroxilo en la posición C5 ó C3 y un grupo carbonilo en C4, Figura 14. Este método es más selectivo que el del reactivo  $AlCl_3$  y se utiliza para identificar flavonoles, flavanonas, flavonas excepto la tangeretina, algunas isoflavonas como la genisteína y la genistina. No cuantifica flavonoides tipo catequinas, antocianinas, proantocianidinas y algunas isoflavonas como daidzeína y daidzina (Jeffrey-Husrt, 2008).



**Figura 14.** Mecanismo de reacción del éster 2-aminoetildifenilborónico.

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de flavonoides totales de los extractos de *P. americana* por el método del 2-APB. A estos datos se les realizó una prueba de Duncan de  $\alpha = 0.05$  y  $\nu = 6$  para demostrar si existía diferencia significativa entre los tres métodos de extracción para la obtención de flavonoides. La prueba demostró que los tres métodos de extracción son diferentes entre sí. La mejor extracción se obtuvo con la decocción seguida de la infusión y finalmente la EAU. Este comportamiento se debió a que los flavonoides tipo flavonas, flavonoles y flavanonas, los cuales son detectados por el método del 2-APB, son más afines al  $\text{H}_2\text{O}$  a temperaturas altas que al MeOH a temperatura ambiente. El hecho de que la decocción sea mejor que la infusión, y la infusión mejor que la EAU, nos permitió proponer que los flavonoides detectados con el método del 2-APB son estables a temperaturas altas.

En la Tabla 4 también se muestran los resultados de la cuantificación de flavonoides totales utilizando el 2-APB para *C. elliptica* y su análisis comparativo de Duncan. Los resultados del análisis comparativo de medias demostraron que los tres métodos de extracción son diferentes entre sí. La mejor extracción fue la EAU seguida de la decocción y después la infusión. La cuantificación de flavonoides totales en *C. elliptica* con el 2-APB indica una escasa concentración de flavonoles, flavanonas, flavonas e isoflavonas en los extractos evaluados.

**Tabla 4.** Concentración de flavonoides totales en extractos metanólicos asistidos por ultrasonido, decocciones e infusiones acuosas de *C. elliptica* y *P. americana*. Método del 2-aminoetildifenilborónico.

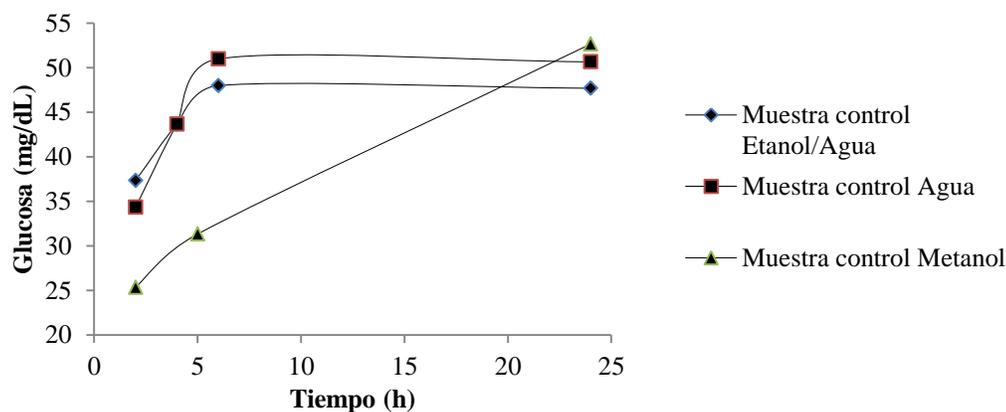
Muestra	Flavonoides totales (mg eq de rutina/100 g de muestra seca)
<i>P. americana</i> * ultrasonido <sup>1</sup>	498.54 ± 13.08 <sup>a</sup>
<i>P. americana</i> decocción <sup>2</sup>	1089.34 ± 30.54 <sup>b</sup>
<i>P. americana</i> Infusión <sup>2</sup>	731.47 ± 1.22 <sup>c</sup>
<i>C. elliptica</i> ultrasonido <sup>1</sup>	34.47 ± 0.44 <sup>a</sup>
<i>C. elliptica</i> decocción <sup>3</sup>	23.81 ± 0.96 <sup>b</sup>
<i>C. elliptica</i> Infusión <sup>3</sup>	8.42 ± 0.37 <sup>c</sup>

Notas: Flavonoides totales (Hariri, Sallé, & Andary, 1991); Promedio de tres mediciones ± desviación estándar. \*Control positivo. Letras diferentes para cada muestra vegetal indican una diferencia significativa entre medias ( $\alpha = 0.05$  y  $\nu = 6$ ) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan. Curva de calibración con rutina: <sup>1</sup> ( $y = 0.0165x - 0.0803$ ,  $R^2 = 0.999$ , apéndice 3.A), <sup>2</sup> ( $y = 0.0173x - 0.0509$ ,  $R^2 = 0.991$ , apéndice 3.B) y <sup>3</sup> ( $y = 0.0167x - 0.0307$ ,  $R^2 = 0.997$ , apéndice 3.C).

De manera general, a partir de las determinaciones de flavonoides totales se concluyó lo siguiente: a) Las hojas de *P. americana* tienen un contenido alto de flavonoides tipo flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, catequinas, e isoflavonas, b) en la corteza de *C. elliptica* también están presentes los flavonoides aunque a concentraciones bajas y predominan principalmente flavonoides tipo flavanonas, flavonas e isoflavonas, c) para el caso de *P. americana*, los flavonoides fueron extraídos eficientemente en la EAU de acuerdo con el método del reactivo tricloruro de aluminio y además la decocción e infusión extraen la misma cantidad de flavonoides.

#### 4.4. Evaluación de la difusión de glucosa

La difusión de la glucosa se evaluó en el modelo propuesto por Gallagher, Flatt, Duffy, & Abdel-Wahad, (2003). Se realizaron pruebas preliminares para encontrar las condiciones óptimas del experimento. Se probaron diferentes concentraciones y cantidades de extracto y glucosa. Al final se llegó a las siguientes especificaciones: a) En el interior de la membrana, se adicionaron 2.5 mL de una disolución preparada a una concentración de glucosa de 100 mg/dL, NaCl 0.15 M y el extracto de interés de acuerdo a las concentraciones descritas en la Tabla 2. La disolución patrón de glucosa de 800 mg/dL se preparó con 24 h de anticipación, debido a que la glucosa en disolución requiere ese tiempo para alcanzar el equilibrio entre su forma cíclica y acíclica. Cabe resaltar que una solución de glucosa fuera del equilibrio afecta las mediciones realizadas con el detector Accu-Check® Active, el cual fue utilizado en el presente trabajo. b) En el exterior de la membrana, se adicionaron 2.5 mL de una disolución de NaCl 0.15 M. Los disolventes en el interior y exterior de la membrana fueron los mismos, sin embargo los extractos no presentaban la misma solubilidad por lo cual se disolvieron de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2.



**Figura 15.** Difusión de las muestras control con diferente composición de disolventes.

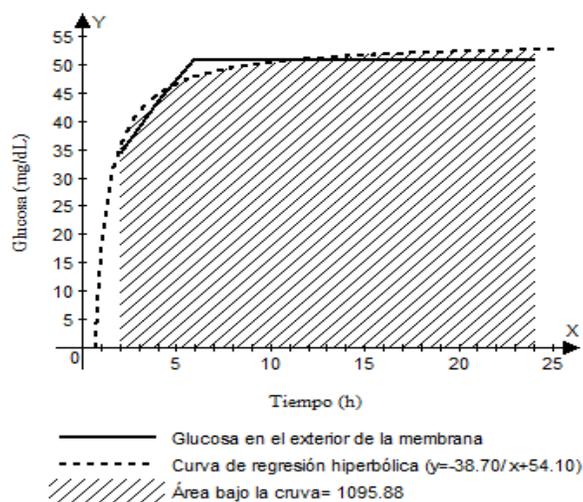
Los experimentos sin extractos de plantas (controles) alcanzaron el equilibrio de la difusión de glucosa a las 24 h. En la Figura 15 se muestran los resultados de la difusión normal de las muestras control con los disolventes utilizados en los experimentos. Podemos observar un efecto claro de los disolventes en la velocidad de difusión de la glucosa. La glucosa se difunde

mas rápido cuando el disolvente es H<sub>2</sub>O seguido de la mezcla EtOH/H<sub>2</sub>O y después el MeOH. Este comportamiento se puede explicar por las interacciones disolvente-soluto y soluto-membrana que se llevan a cabo en el sistema, para cada disolvente es diferente. Sin embargo, después de 24 h el sistema alcanza el equilibrio (Valadez-Blanco, Castelo-Ferreira, Jorge, & Livingston, 2008).

La inhibición de la difusión de glucosa a través de la membrana se determinó utilizando la relación del área bajo la curva de la muestra respecto a la de su control (disolvente) ( $A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}$ ) y para encontrar el % de inhibición de difusión de glucosa se utiliza la Ecuación 2.

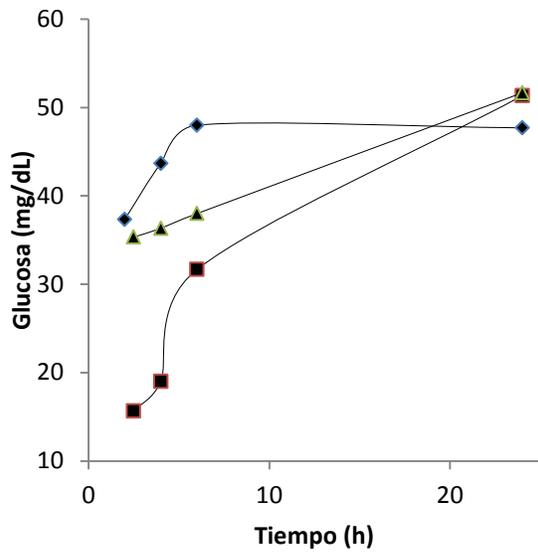
$$\% \text{ de Inhibición de glucosa} = (1 - A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Para calcular el área bajo la curva de los experimentos, se utilizó el programa Advanced Grapher 2.2<sup>3</sup>. Primero se graficaron los datos de difusión vs tiempo. Luego se realizaron regresiones hasta encontrar la ecuación con el mejor ajuste a los datos experimentales, Apéndice 5, y finalmente se calculó el área bajo la curva a partir de la integración de la ecuación de regresión correspondiente en el intervalo de tiempo de interés (6 y 24 h), Figura 16.



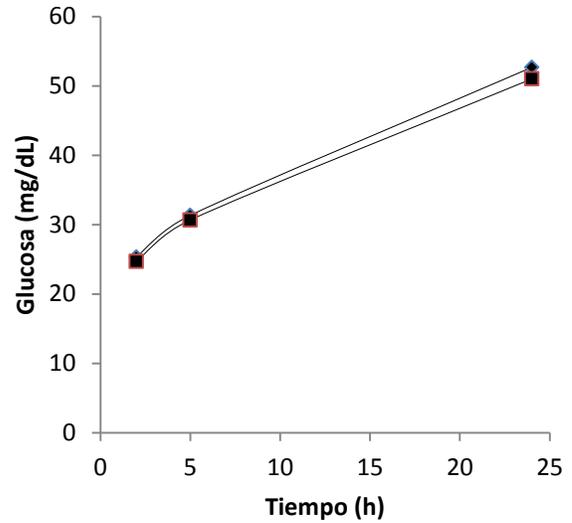
**Figura 16.** Cálculo del área bajo la curva de los experimentos de difusión de glucosa. Área y figura obtenida con el programa Advanced Grapher 2.2.

<sup>3</sup> Alentum Software, INC. <http://www.alentum.com/agrapher/>



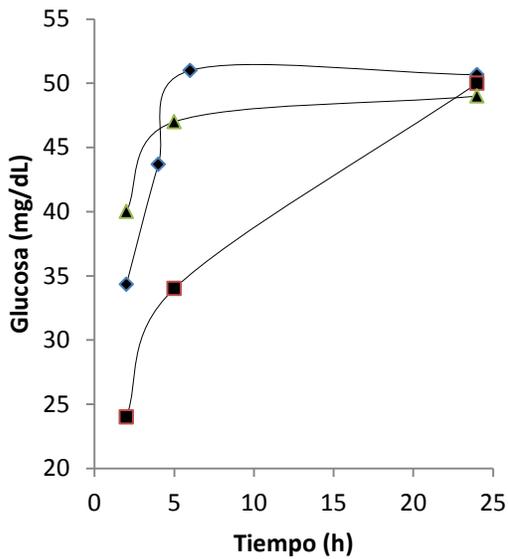
◆ Glucosa 100 mg/dL (etanol/agua)  
 ■ *P. americana* 130 g/L  
 ▲ *P. americana* 10 g/L

A)



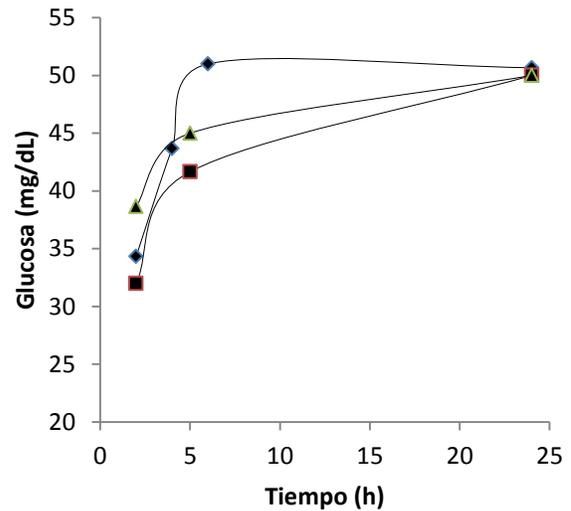
◆ Glucosa 100 mg/dL (metanol)  
 ■ *C. elliptica* 130 g/L

B)



◆ Glucosa 100 mg/dL    ■ *P. americana* 130 g/L  
 ▲ *C. elliptica* 260 g/L

C)



◆ Glucosa 100 mg/dL    ■ *P. americana* 130 g/L  
 ▲ *C. elliptica* 260 g/L

D)

**Figura 17.** Concentración de glucosa en el tubo exterior vs tiempo del experimento de la difusión de glucosa para extractos de A) *P. americana* por EAU B) *C. elliptica* por EAU C) *P. americana* y *C. elliptica* por decoccción D) *P. americana* y *C. elliptica* por infusión.

En la Figura 17 se muestran los resultados de los experimentos de la difusión de glucosa. A estos se les calculó el área bajo la curva y se les determinó el porcentaje de inhibición utilizando su respectiva muestra control.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la inhibición de la difusión de glucosa de los extractos obtenidos por EAU, decocción e infusión de *C. elliptica* y *P. americana*. Al analizar los extractos obtenidos por EAU, se observó que el de *P. americana* a 130 g/L tuvo la mejor inhibición (55.3 %) a las 6 h de iniciado el experimento, mientras que a las 24 h la inhibición disminuyó hasta un 20.1%. Este comportamiento es normal, todos los sistemas tienden al equilibrio, por lo que es determinante identificar el tiempo donde se alcanza el efecto máximo. En este grupo de experimentos de inhibición de la difusión de glucosa se alcanzó a las 6 h.

**Tabla 5.** Porcentaje de inhibición de la difusión de glucosa de extractos de *P. americana* y *C. elliptica* a las 6 y 24 h.

Muestra	% de inhibición de la difusión de glucosa	
	6 h	24 h
<i>P. americana</i> EAU 130 g/L	55.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	20.1 ± 0.6 <sup>a</sup>
<i>P. americana</i> EAU 10 g/L	25.9 ± 0.9 <sup>b</sup>	9.0 ± 0.9 <sup>b</sup>
<i>P. americana</i> decocción 130 g/L	34.4 ± 1.8 <sup>c</sup>	17.2 ± 0.5 <sup>c</sup>
<i>P. americana</i> infusión 130 g/L	19.7 ± 0.4 <sup>d</sup>	10.4 ± 0.6 <sup>b</sup>
<i>C. elliptica</i> EAU 130 g/L	1.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.8 <sup>a</sup>
<i>C. elliptica</i> decocción 260 g/L	8.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.8 <sup>b</sup>
<i>C. elliptica</i> infusión 260 g/L	8.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	6.4 ± 1.5 <sup>b</sup>

Notas: Letras diferentes en el mismo cuadrante indican una diferencia significativa entre medias ( $\alpha = 0.05$  y  $\nu = 6$ ) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan.

En el caso de los experimentos de inhibición de la difusión de glucosa de extractos de *C. elliptica* se puede apreciar que la inhibición es baja, independientemente del tiempo y el método de obtención del extracto. Esto concuerda con un contenido bajo de flavonoides totales en los tres extractos (EAU, decocción e infusión).

A partir de los resultados obtenidos del análisis comparativo de medias, utilizando la prueba de Duncan, se concluyó que los extractos obtenidos de la decocción e infusión de *C. elliptica* a 260 g/L inhiben de manera similar la difusión de glucosa tanto a las 6 como a las 24 h.

Por otra parte, la inhibición de la difusión de la glucosa de la decocción e infusión de *P. americana* a 130 g/L son diferentes significativamente. Para explicar esta diferencia, se compararon los contenidos de flavonoides totales cuantificados por los métodos de los reactivos  $\text{AlCl}_3$  y 2-ABP. Este comparativo permitió evidenciar que los extractos no presentaron diferencia significativa con el método del  $\text{AlCl}_3$ , pero si hay diferencia significativa con el método del 2-ABP. La decocción, 1089.34 mg eq de rutina/100 g de muestra seca, tiene un mayor contenido de flavonoides que la infusión, 731.47 mg eq de rutina/100 g de muestra seca, por el método del reactivo 2-ABP. Consecuentemente, se puede atribuir que la diferencia en la inhibición de la difusión de glucosa entre la decocción e infusión de *P. americana* se debe a flavonoides tipo flavonas, flavonoles y flavanonas.

#### **4.5. Correlación lineal de flavonoides totales versus % de inhibición de la difusión de glucosa**

Para evaluar la posible relación entre flavonoides y la capacidad de los extractos de *P. americana* y *C. elliptica* para inhibir la difusión de glucosa, se realizó una correlación lineal. Para lograr esto, primero se calculó la cantidad total de flavonoides en mg contenidos en las muestras utilizadas para la prueba de inhibición de la difusión de glucosa. Estos cálculos se hicieron con las concentraciones obtenidas por los métodos de los reactivos  $\text{AlCl}_3$  y 2-ABP, para todos los extractos que fueron evaluados. Posteriormente, se realizaron las correlaciones y se encontró que para los flavonoides cuantificados con el reactivo 2-ABP no se presentó correlación con el % de inhibición de la difusión de glucosa. Mientras que al hacer la prueba de correlación con los flavonoides cuantificados con  $\text{AlCl}_3$ , se observó una fuerte correlación lineal entre cinco experimentos, incluyendo extractos de *P. americana* y *C. elliptica*, Tabla 6 y Figura 18. Los extractos excluidos fueron la EAU de *P. americana* a 10 g/L debido a su baja concentración y *P. americana* infusión 130 g/L debido a que sufrió una caída drástica en el contenido de flavonoides totales, de acuerdo al método del reactivo 2-ABP.

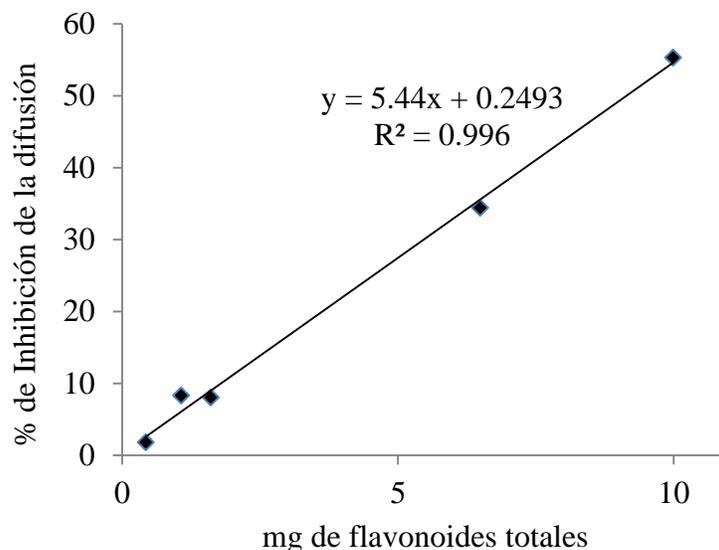
**Tabla 6.** Contenido de flavonoides calculados por el método del tricloruro de aluminio presentes en los experimentos de difusión de glucosa y su respectivo porcentaje de inhibición.

Muestra	mg de flavonoides totales método del AlCl <sub>3</sub>	Porcentaje de inhibición de la difusión de glucosa a las 6 h
<i>P. americana</i> EAU 130 g/L	9.99	55.3 ± 0.8
<i>P. americana</i> decocción 130 g/L	6.49	34.4 ± 1.8
<i>C. elliptica</i> decocción 260 g/L	1.61	8.0 ± 0.8
<i>C. elliptica</i> infusión 260 g/L	1.07	8.3 ± 1.9
<i>C. elliptica</i> EAU 130 g/L	0.43	1.8 ± 1.3

Nota: Promedio de tres mediciones ± desviación estándar.

La Figura 18 muestra una fuerte correlación lineal entre mg de flavonoides y el % de inhibición de la difusión. Por lo cual se procedió a su análisis aplicando una correlación de Pearson. El coeficiente de Pearson con valor de 0.996 evidenció que existe una fuerte dependencia entre los mg de flavonoides y la inhibición de la difusión de glucosa. A mayor contenido de flavonoides mayor efecto inhibitorio de la difusión de la glucosa. Este comportamiento solo se observó para los flavonoides totales calculados por el método del reactivo del tricloruro de aluminio y para la inhibición de la difusión de glucosa a las 6 h. En los demás casos no se observó ningún tipo de tendencia, por lo cual no fue posible establecer alguna correlación.

Con los resultados anteriores se puede proponer que los flavonoides totales detectados con el reactivo AlCl<sub>3</sub> en extractos de *P. americana* y *C. elliptica* están fuertemente relacionados con la inhibición de la difusión de glucosa a través de una membrana de diálisis en las primeras 6 h de la evaluación de la difusión de glucosa. Este efecto retardante es importante, debido a que la glucosa es un carbohidrato que se absorbe rápidamente en el intestino delgado, tarda no más de 3 h en llegar al torrente sanguíneo (Noriega, 2004). Consecuentemente, el consumo combinado de fuentes ricas en flavonoides con alimentos de contenidos altos en azúcares puede ayudar a disminuir la absorción de éstos.



**Figura 18.** Correlación de Pearson entre mg de flavonoides presentes en los experimentos y el % de inhibición de la difusión de glucosa.

El análisis de la Figura 18 muestra una correlación muy fuerte entre flavonoides e inhibición de la difusión de glucosa. Sin embargo con estos resultados no es posible concluir que el efecto antidiabético que presenta *C. elliptica* se deba a la inhibición de la difusión de glucosa, pueden existir otros mecanismos involucrados en la actividad antidiabética de corteza de *C. elliptica*. Pero si es posible concluir que independientemente del origen de la muestra, existe un fuerte efecto retardante en la difusión de glucosa ocasionada por los flavonoides.

## 5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides totales se concluye que los extractos de corteza de *C. elliptica* tienen concentraciones bajas de flavonoides (247.2-8.4 mg de flavonoides totales eq catequina/100 g muestra seca). También, presentan una inhibición baja de la difusión de la glucosa (1.8-8.3 %, 6 h de difusión). Consecuentemente, se determinó que a partir de los resultados obtenidos para *C. elliptica* no es posible asociar la inhibición de la difusión de glucosa con flavonoides totales obtenidos de extractos de corteza de ésta planta. Consecuentemente se rechaza la hipótesis planteada en este trabajo. Sin embargo, al llevar a cabo la correlación de flavonoides para todos los experimentos realizados en el presente trabajo incluyendo los extractos de hojas de *P. americana*, se encontró una fuerte correlación entre flavonoides totales cuantificados por el método del reactivo  $\text{AlCl}_3$  y el % de inhibición de la difusión de glucosa ( $R^2 = 0.996$ ). Este resultado fue independiente del origen de la muestra, por tal motivo la hipótesis planteada en el presente trabajo efectivamente se rechaza para *C. elliptica*, pero no necesariamente se rechaza para extractos de plantas que inhiben la difusión de glucosa, tal como *P. americana*.

## 6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabajo se proponen los siguientes puntos:

Estudiar el efecto de los disolventes en la difusión normal de la glucosa así como el comportamiento de flavonoides puros en estos.

Determinar la estructura química y concentración de los flavonoides encontrados en la hoja de *P. americana* y evaluar a cada uno de ellos mediante el experimento de la difusión de glucosa.

Realizar un estudio detallado de los métodos de extracción de flavonoides para encontrar las condiciones adecuadas de extracción, evaluando parámetros como tiempos, temperaturas, disolventes y la relación entre muestra y disolvente.

## 7. REFERENCIAS

- Abdul, S. (2007, December 19). *Islamicpostonline*. Consultado el 2010, January 09, from [http://www.islamicpostonline.com/article/mauby\\_caribbean\\_drink](http://www.islamicpostonline.com/article/mauby_caribbean_drink).
- Ballester-Sanz, A., Sanz-Franco, M. J., & Galan-Grau, E. (1999). Homeopatía. Fundamentos científicos. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 6 (2), 71-78.
- Büyükbalci, A., & El, S. N. (2008). Determination of *in vitro* antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 27-33.
- Gallagher, A. M., Flatt, P. R., Duffy, G., & Abdel-Wahad, Y. H. A. (2003). The effects of traditional antidiabetic plants on *in vitro* glucose diffusion. *Nutrition Research*, 23, 413-424.
- Hariri, E. B., Sallé, G., & Andary, C. (1991). Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma*, 162, 20-26.
- Hart, F. L., & Fisher, H. J. (1991). *Análisis moderno de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Hönes, J., Müller, P., & Surridge, N. (2008). The technology behind glucose meters: Test strips. *Diabetes Technology and Therapeutics*, 10, 10-26.
- Jeffrey-Husrt, W. (2008). *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals* (2 ed.). Pennsylvania: CRC Press.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7292-7295.
- Lehninger, D., & Cox, M. (2005). *Lehninger principios de bioquímica* (4 ed.). Barcelona: Omega.
- Lock, O., Cabello, I., & Doroteo, V. H. (2006, Diciembre 1). *Análisis de flavonoides en plantas*. Consultado el 2012, May 07, from [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-VI-6.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-6.pdf).

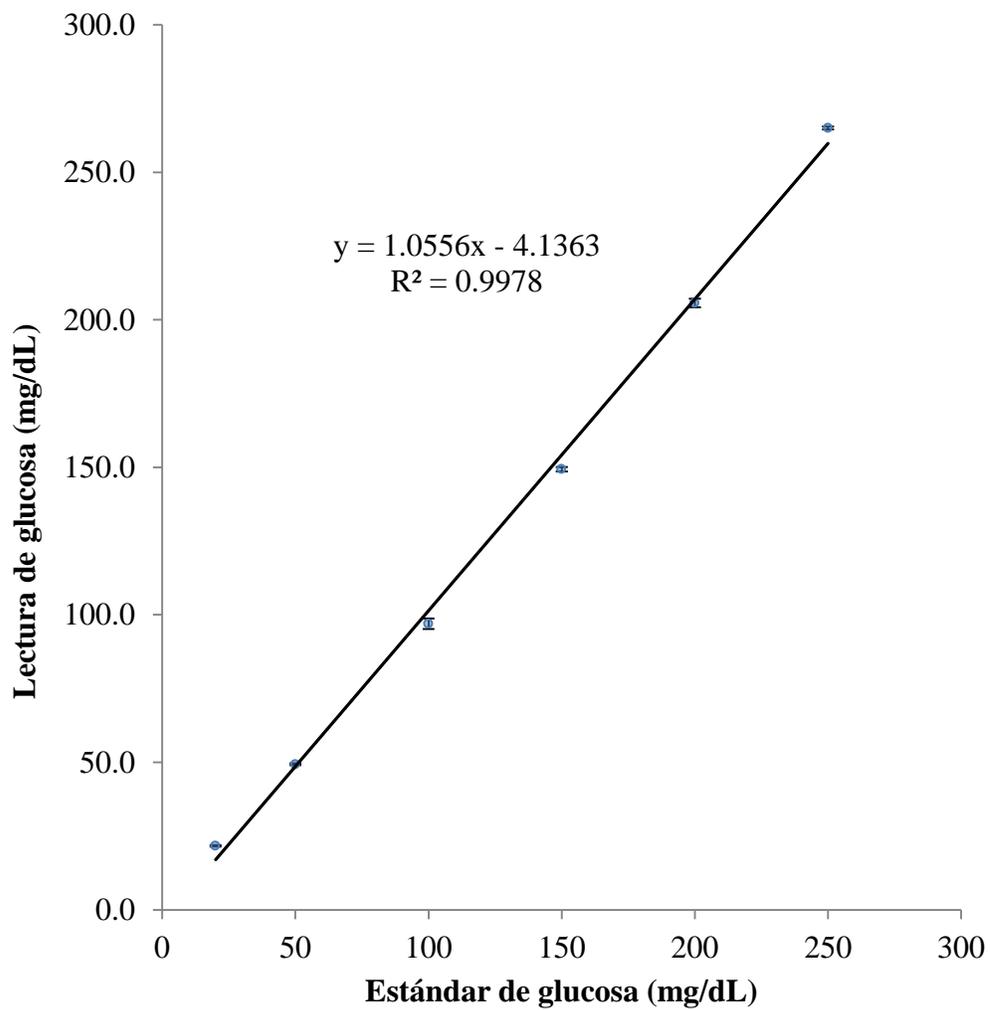
- Marroquín-Segura, R., Flores P, M., García B, M. M., Mora G, J. L., Sánchez R, J. F., & Aguilar C, A. (2005). Efecto antihiper glucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36 (2), 27-32.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallegos, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidante. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271-278.
- Mat-Ali, M. S. (2008). Analysis of phenolics and other phytochemicals in selected Malaysian traditional vegetables and their activities *in vitro*. *University of Glasgow*, 1-179.
- McCune, L. M., & Jhons, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms on *diabetes mellitus* used by the indigenous people of North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology*, 197-205.
- Meireles, A. (2009). *Extracting bioactive compounds for food products theory and applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Noriega, E. (2004). El índice glucémico. *Cuadernos de Nutrición*, 117-124.
- Peña-García, N. (2003). Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bioenzimáticos y multienzimáticos. *Universidad Complutense de Madrid*. Tesis de doctorado, 1-398.
- Pérez-García, E. A., & Meave, J. A. (2004). Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern Mexico. *Plant Ecology*, 175, 147-163.
- Pérez-García, E. A., Meave, J. & Gallardo, C. (2001). Vegetación y flora de la región Nizanda, Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* (56), 19-88.
- Secretaría de Salud. (2011, Marzo 17). *Secretaría de salud*. Consultado el 2011, August 03, from [http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n\\_seccion=Boletines&seccion=2011-03-17\\_5105.html](http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n_seccion=Boletines&seccion=2011-03-17_5105.html).
- Sobel, B. E., & Schneider, D. J. (2002). *Medical management of diabetes and heart diseases*. New York: Marcel Dekker.
- Valadez-Blanco, R., Castelo-Ferreira, Jorge, R. F., & Livingston, G. A. (2008). A membrane bioreactor for biotransformations of hydrophobic molecules using organic solvent nanofiltration (OSN) membranes. *Journal of Membrane Science*, 50-64.
- Winkel-Shirley, B. (2001). It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, 1399-1404.

Zhang, R., Yao, Y., Wang, Y., & Ren, G. (2011). Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *Nutrition & Metabolism*, 85 (8), 1-6.

Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., & Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study of different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3 (2), 90-97

## APÉNDICE 1

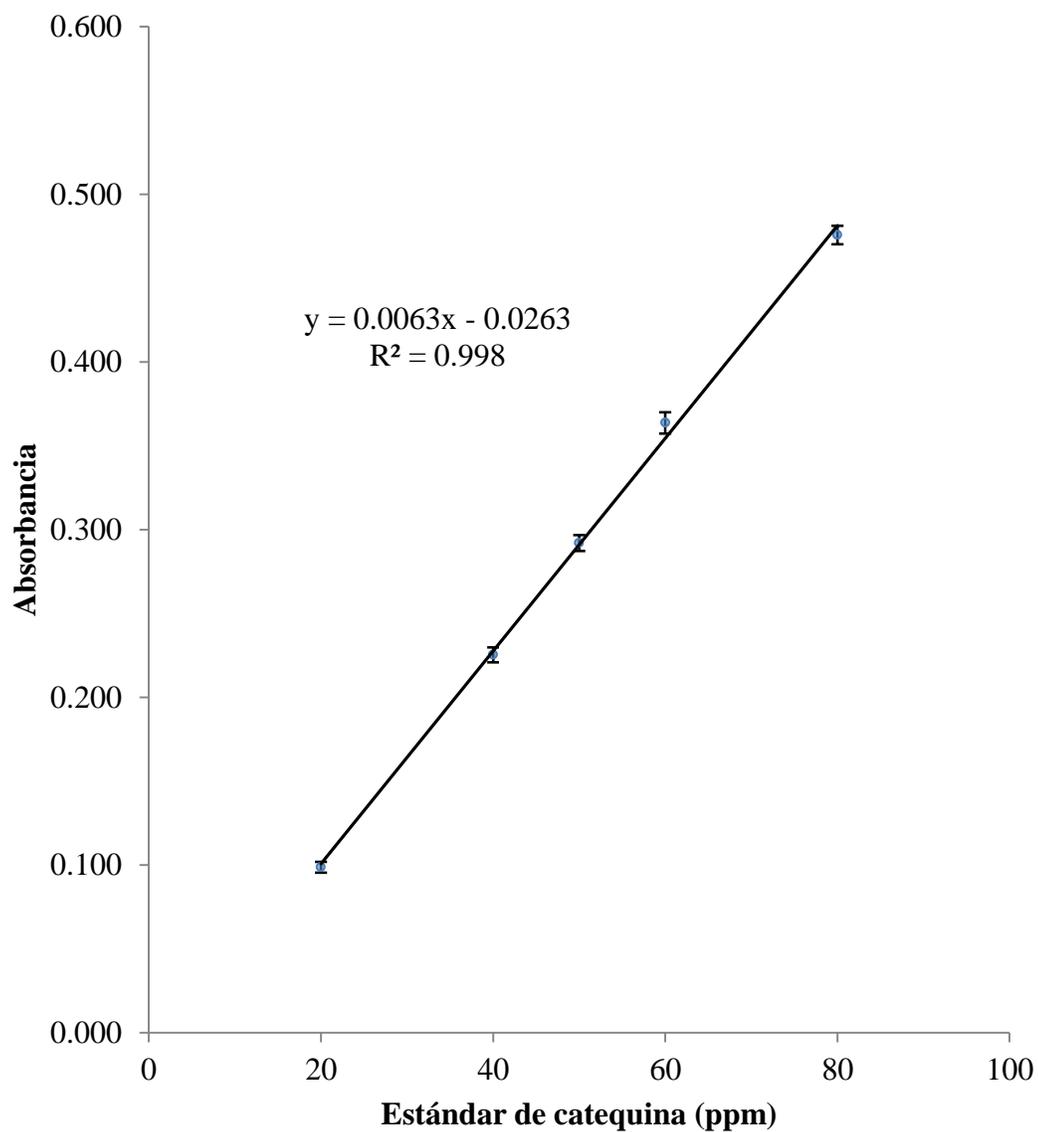
Curva de calibración de estándares de glucosa. Procedimiento utilizado para validar el medidor de glucosa Roche Accu-Check® Active.



## APÉNDICE 2

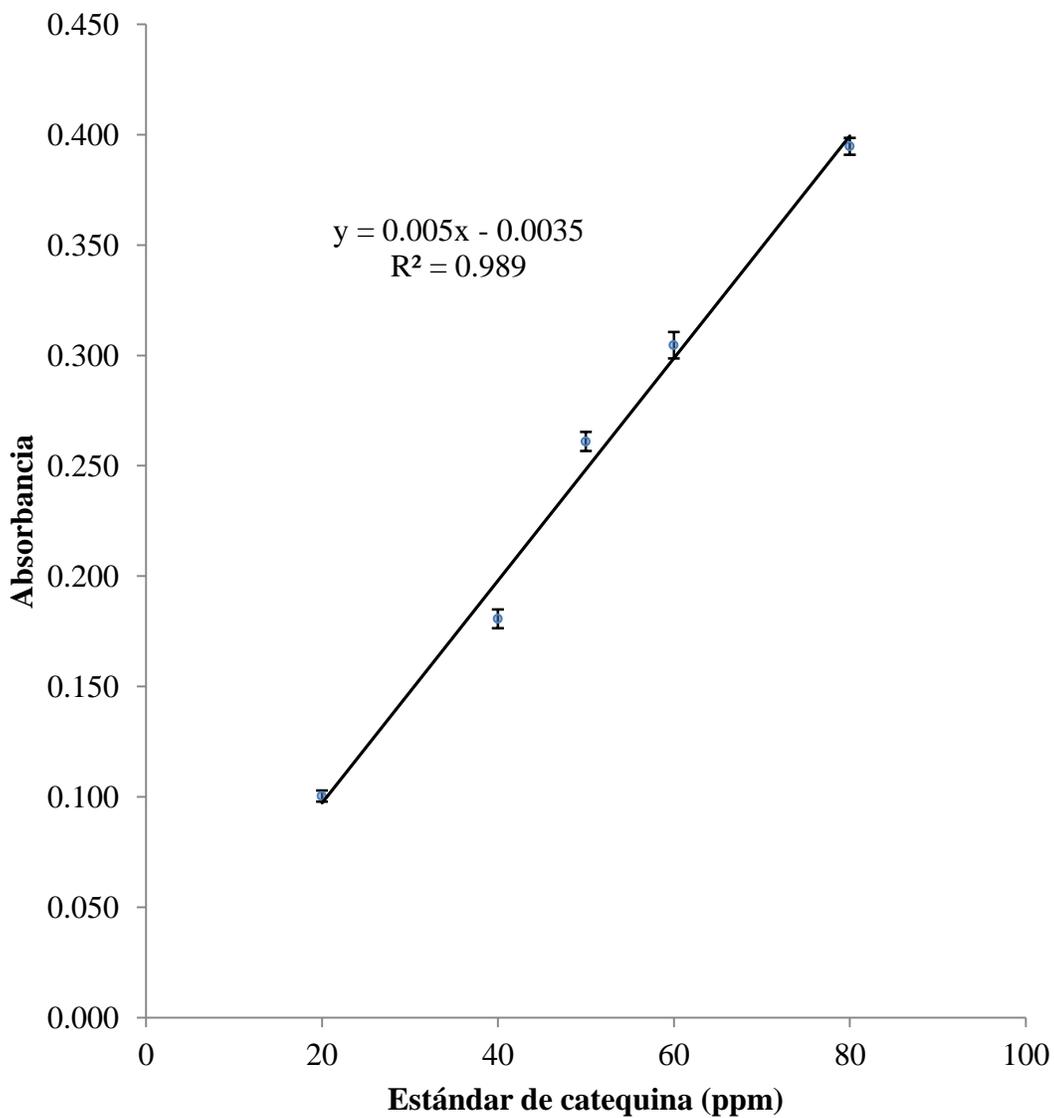
### Apéndice 2.A

Curva de calibración de los estándares de catequina para la cuantificación de flavonoides totales. Método espectrofotométrico del tricloruro de aluminio. Absorbancias leídas en un lector de microplacas.



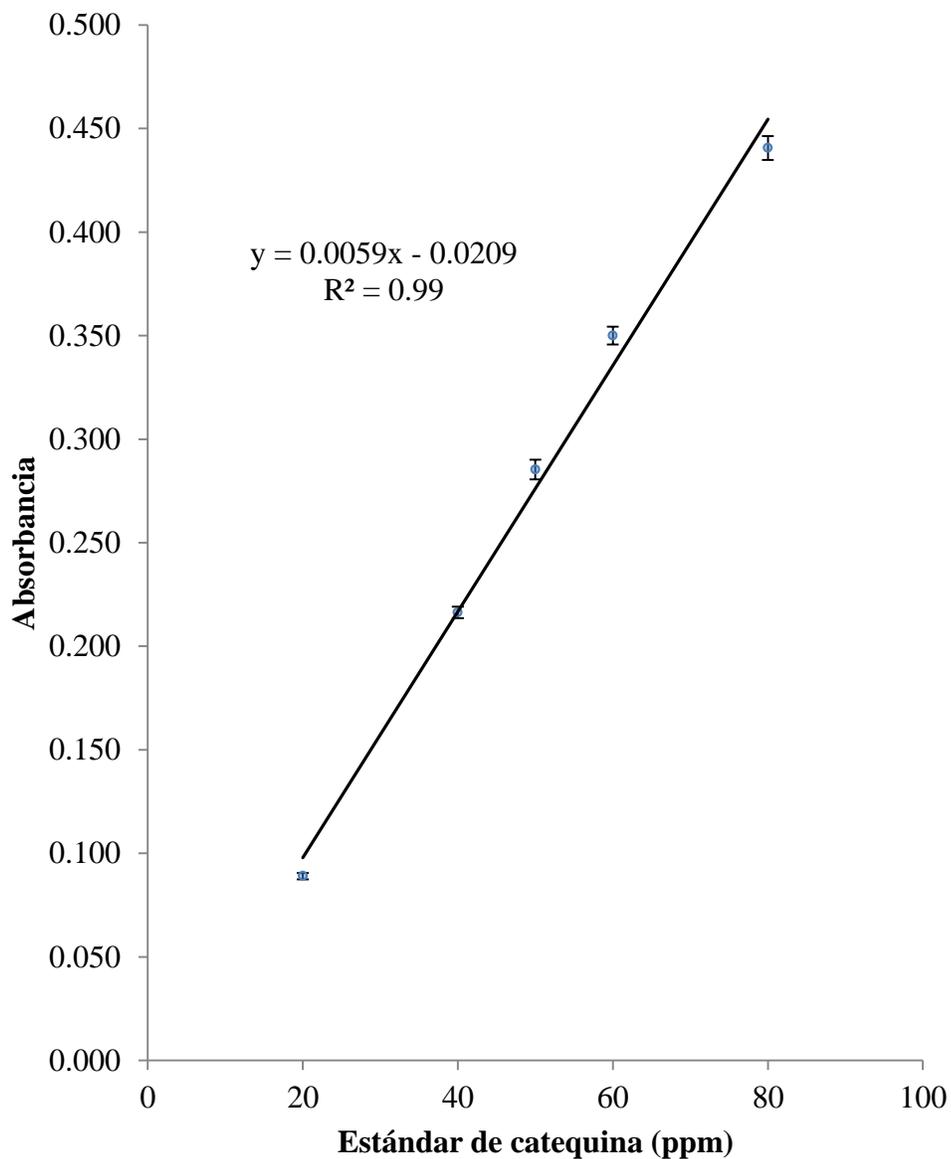
## Apéndice 2.B

Curva de calibración de los estándares de catequina para la cuantificación de flavonoides totales. Método espectrofotométrico del tricloruro de aluminio. Absorbancias leídas en un lector de microplacas.



## Apéndice 2.C

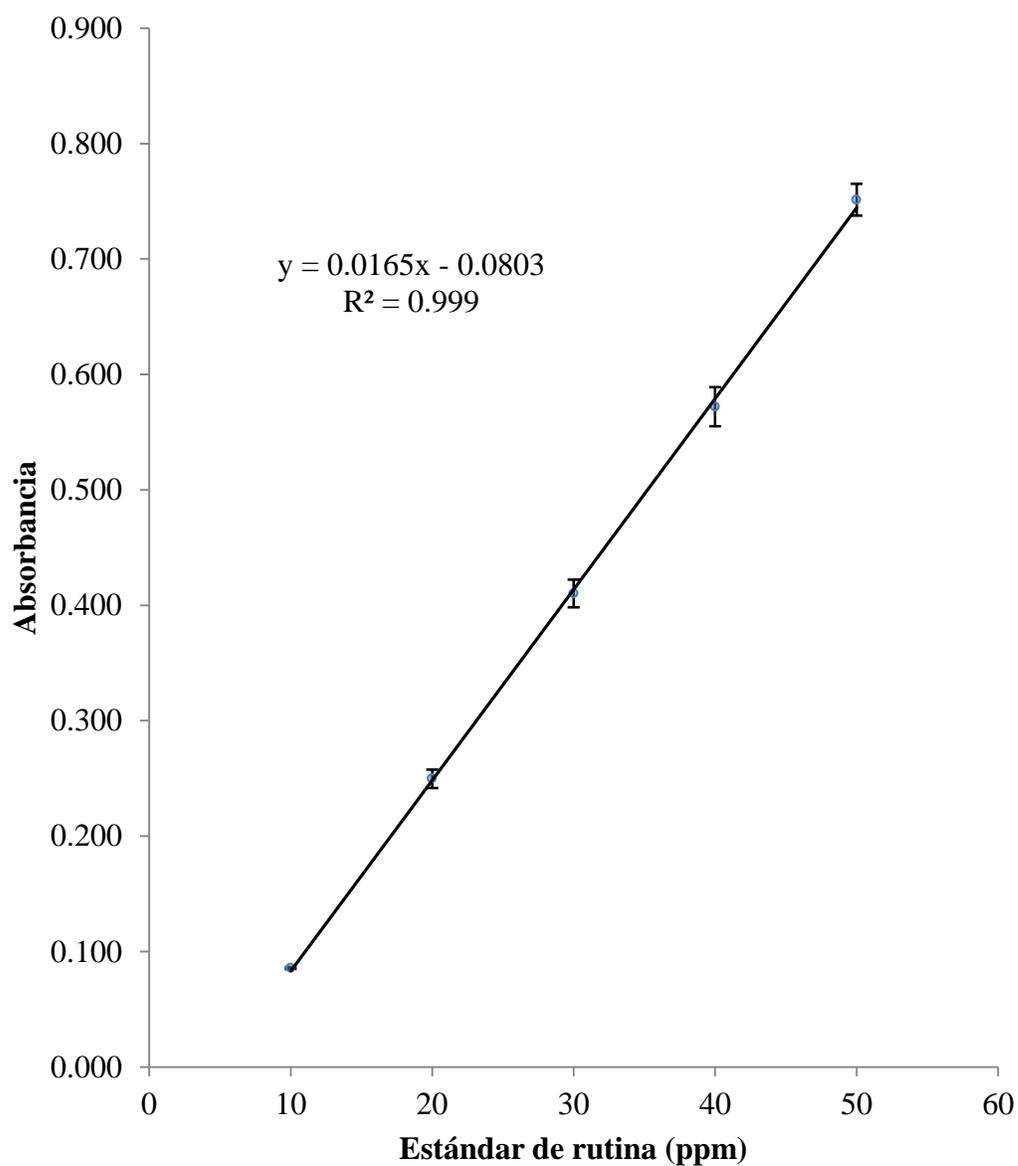
Curva de calibración de los estándares de catequina para la cuantificación de flavonoides totales. Método espectrofotométrico del tricloruro de aluminio. Absorbancias leídas en un lector de microplacas.



## APÉNDICE 3

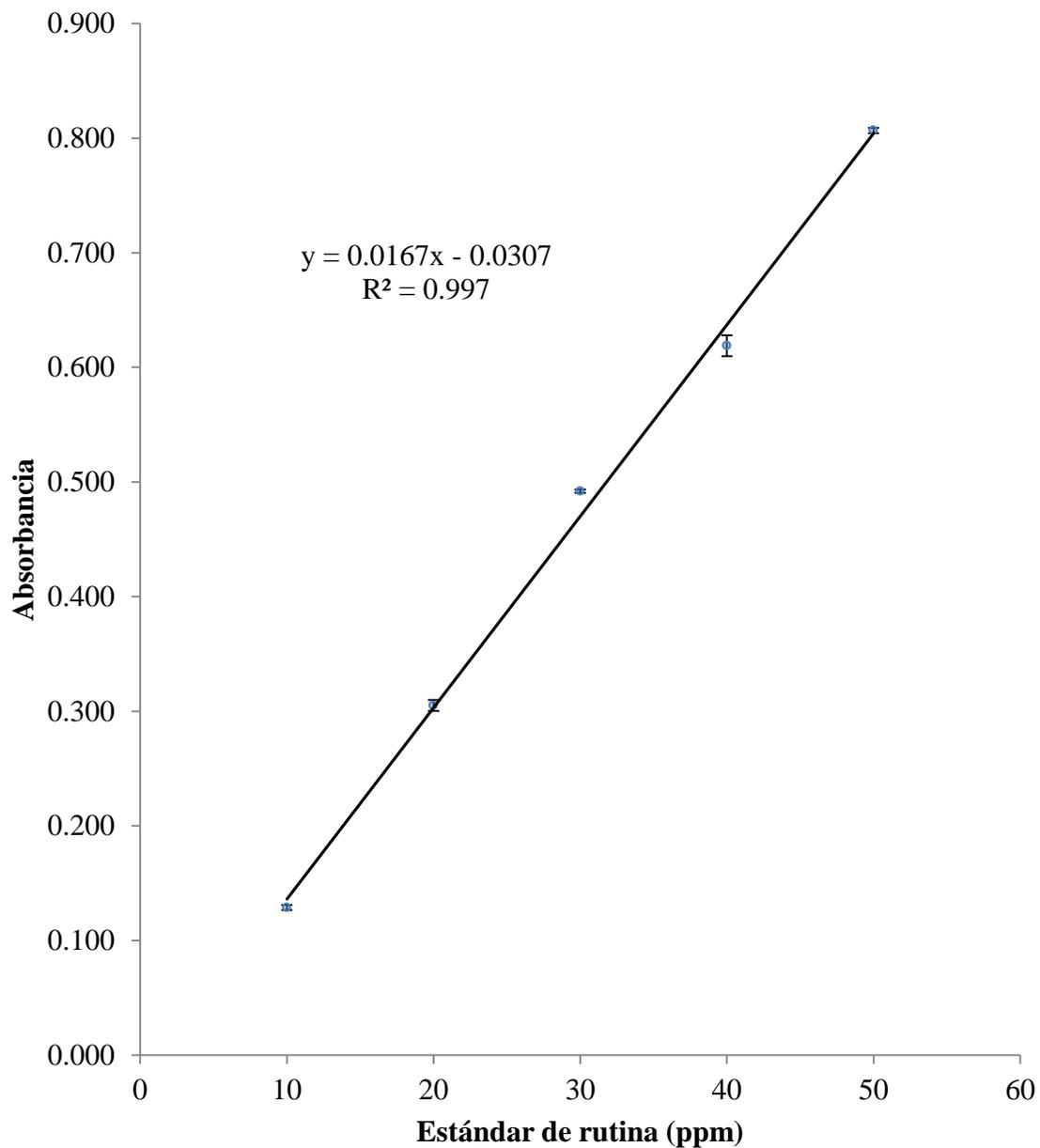
### Apéndice 3.A

Curva de calibración de los estándares de rutina para la cuantificación de flavonoides totales. Método espectrofotométrico del éster 2-aminoetildifenilborínico. Absorbancias leídas en un lector de microplacas.



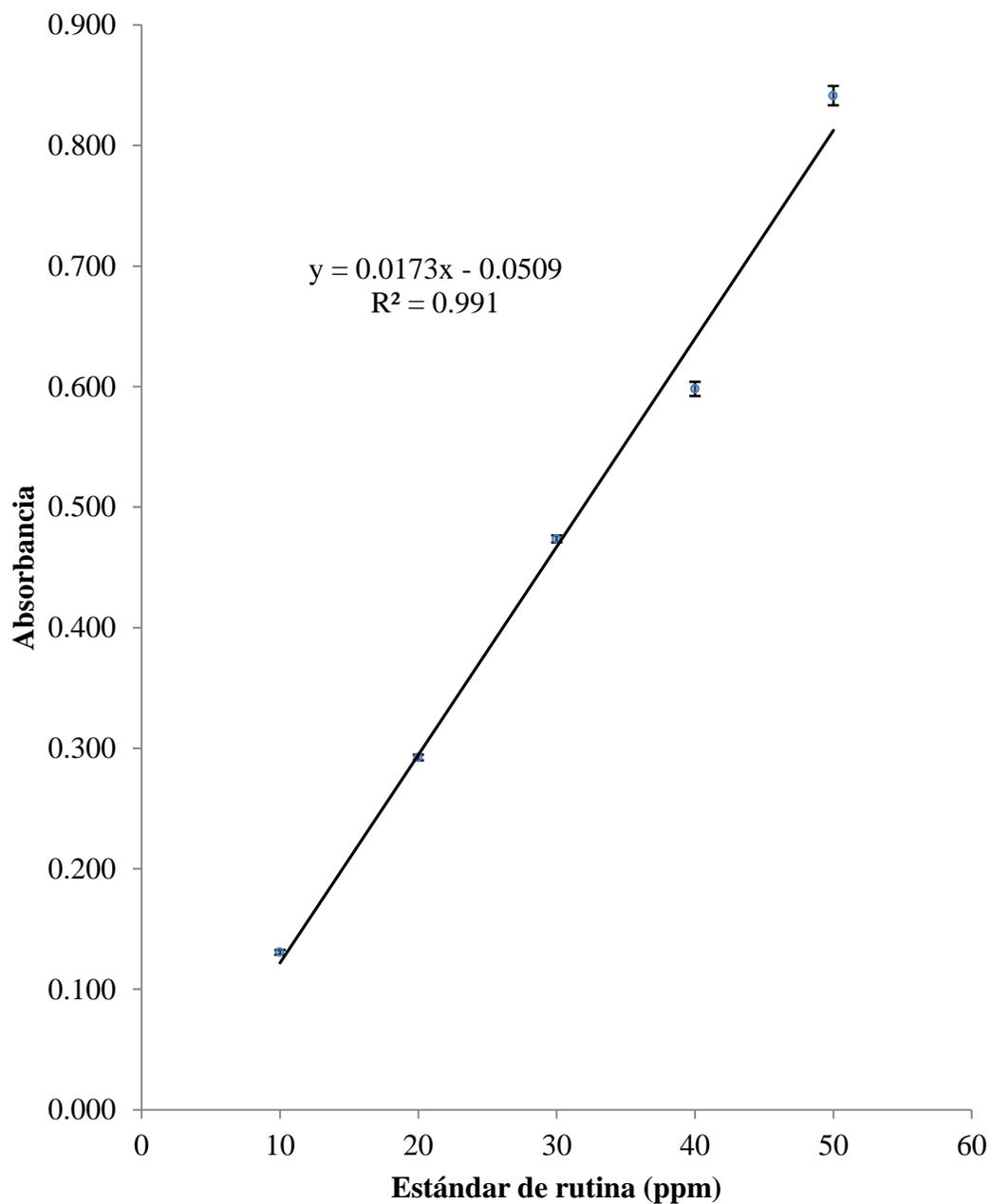
### Apéndice 3.B

Curva de calibración de los estándares de rutina para la cuantificación de flavonoides totales. Método espectrofotométrico del éster 2-aminoetildifenilborínico. Absorbancias leídas en un lector de microplacas.



### Apéndice 3.C

Curva de calibración de los estándares de rutina para la cuantificación de flavonoides totales. Método espectrofotométrico del éster 2-aminoetildifenilborónico. Absorbancias leídas en un lector de microplacas.



## APÉNDICE 4

Lugares en el estado de Oaxaca donde se ha localizado a *Colubrina elliptica*. Información obtenida del herbario SERBO

Distrito	Municipio	Referencia	Coordenadas	Fecha de muestreo
Tehuantepec	Santiago Lachiguiri	Sobre camino a Arroyo Igueza	16°41'10''N 95°31'11.8''W	01-abril-2007
Juchitán	Asunción Ixtepec	En el cerro de la piedra azul. A 1 km al NE (32°) de Nizanda	16°39'53''N 95°0'26''W	30-agosto-1995
Juchitán	Asunción Ixtepec	Planicies de cultivo en los alrededores de la vía del tren transísmico en Nizanda	16°40'0''N 95°1'17''W	19-agosto-1996
Pochutla	Santa María Huatulco	A 145 m al sur de la estación de campo marítima del parque nacional Huatulco en la playa "Cacaluta"	15°43'13''N 96°10'8.6''W	03-diciembre-2004

## APÉNDICE 5

Tipo de regresión, ecuaciones de regresión y coeficiente de regresión para los datos obtenidos con los experimentos de la difusión de glucosa.

Muestra	Tipo de regresión	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>
Muestra control EtOH/H <sub>2</sub> O	Hiperbólica	$y = -38.66/x + 54.15$	0.92
Muestra control H <sub>2</sub> O	Hiperbólico	$y = -38.7/x + 54.10$	0.98
Muestra control MeOH	Hiperbólico	$y = -24.60/x + 50.07$	0.98
<i>P. americana</i> EAU 130 g/L	Potencia	$y = 10.24 x^{0.52}$	0.94
<i>P. americana</i> EAU 10 g/L	Lineal	$y = 0.76 x + 33.39$	0.99
<i>C. elliptica</i> EAU 130 g/L	Polinomial	$y = -0.039 x^2 + 2.27 x + 20.90$	0.97
<i>P. americana</i> decocción 130 g/L	Logarítmica	$y = 10.40 \ln x + 16.93$	0.98
<i>C. elliptica</i> decocción 260 g/L	Hiperbólica	$y = -20.11/x + 50.307$	0.98
<i>P. americana</i> infusión 130 g/L	Logarítmica	$y = 7.04 \ln x + 28.34$	0.97
<i>C. elliptica</i> infusión 260 g/L	Hiperbólica	$y = 24.42/x + 50.56$	0.98