

## ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DE TRONADORA, RAÍZ DE WEREQUE Y RAÍZ DE NOPAL

---

**María Eugenia Ramírez-Ortiz<sup>1</sup>, Olivia Yanet Rodríguez-Carmona<sup>2</sup>, Oscar Saúl Hernández-Rodríguez<sup>2</sup>, Luis Chel-Guerrero<sup>3</sup>, Miguel Ángel Aguilar-Méndez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Facultad Estudios Superiores-Cuautitlán-UNAM Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

<sup>2</sup> CICATA-Legaria-IPN, Ciudad de México, D.F.

<sup>3</sup> FIQ-UADY, Mérida, Yucatán, México.

[mro2102@hotmail.com](mailto:mro2102@hotmail.com), [rdzolivia@hotmail.com](mailto:rdzolivia@hotmail.com), [saul\\_inn2602@hotmail.com](mailto:saul_inn2602@hotmail.com), [cguerrer@correo.uady.com.mx](mailto:cguerrer@correo.uady.com.mx), [miguel\\_agme@hotmail.com](mailto:miguel_agme@hotmail.com)

<https://doi.org/10.3926/oms.362>

Ramírez-Ortiz, M.E., Rodríguez-Carmona, O.Y., Hernández-Rodríguez, O.S., Chel-Guerrero, L., & Aguilar-Méndez, M.A. (2016). Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience. 143-180.

## Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM-II) representa aproximadamente del 90 al 95% de todos los casos de Diabetes mellitus; es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica debido a defectos o alteraciones en la secreción o bien la acción de insulina. Uno de los principales tratamientos para el control de la hiperglucemia postprandial, se da a través de la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa (enzimas que hidrolizan carbohidratos) presentes en el tracto gastrointestinal. Desafortunadamente, los fármacos terapéuticos diseñados como inhibidores de estas enzimas vienen con varios efectos secundarios. Es donde radica la necesidad de buscar alternativas eficientes y baratas, con pocos o nulos efectos secundarios.

Los daños en las células pancreáticas causadas por especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical anión superóxido ( $O^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo (OH) es una etiología conocida de T2DM. Estudios *in vitro* e *in vivo*, demuestran que el uso de fitoquímicos tales como compuestos fenólicos sirven para aumentar los antioxidantes endógenos, ayudando a proteger eficazmente contra las células biológicas de efecto perjudicial, causado por el estrés oxidativo (Adedayo et al., 2015).

La hoja de tronadora, raíz de nopal y raíz de wereque, han sido usadas en la medicina tradicional mexicana desde tiempos milenarios para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los cuales destaca la diabetes mellitus. En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante e hipoglucemiante de dichas plantas, a partir de su extracción asistida por ultrasonido (acuosa y etanólica). Como se demostró en el presente trabajo, el mecanismo podría ser debido al efecto inhibitorio de algunos compuestos y ácidos fenólicos a la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, así como también, el efecto antioxidante de dichos compuestos. La evaluación *in vitro* demostró que el extracto etanólico de la hoja de tronadora presenta la mayor actividad antioxidante e hipoglucemiante, basado en los siguientes resultados: inhibición de  $\alpha$ -amilasa  $EC_{50} = 0.3$  mg/mL, inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa  $EC_{50} = 0.14$  mg/mL, contenido de fenoles totales = 204.82 mg EAG/g ES, contenido de flavonoides totales = 92.77 mg Eq de catequina/mg ES, capacidad de reducción de hierro = 889.85  $\mu$ ET/1000 ppm y capacidad secuestradora de radicales libres  $EC_{50} = 85.55$  ppm.

## Palabras clave

Actividad hipoglucemiante, antioxidante, tronadora, wereque, raíz de nopal.

## 6.1. Introducción

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2016), la diabetes mellitus es el desorden endócrino más común, afectando a alrededor de 422 millones de personas en el mundo. El término diabetes describe a un desorden metabólico con múltiples etiologías y se caracteriza por hiperglicemia crónica, con desordenes en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, dando como resultado deficiencias en la secreción de insulina, acción de insulina o ambos. El presente estudio se enfoca en el tratamiento para la diabetes mellitus tipo 2, pues es la forma más común de diabetes, ésta se caracteriza por la resistencia a la insulina y un incremento anormal de azúcar en sangre inmediatamente después de consumir alimentos (hiperglicemia postprandial) (Know, Apostolidis, Kim & Shetty, 2007). La diabetes mellitus no es una enfermedad única, sino una serie de trastornos metabólicos que comparten la característica común de la hiperglicemia, ésta a su vez genera especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando peroxidación lipídica y daños a la membrana, éstos radicales libres juegan un papel importante en la aparición de las complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, dañando riñones, ojos, vasos sanguíneos y nervios (Dean, Hunt & Wolff, 1988). Existe evidencia donde el estrés oxidativo está involucrado en una amplia gama de enfermedades y estados anormales del cuerpo, así como también, se ha demostrado que éste implica una disminución de los niveles de sustancias antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, urato) y aumento de los niveles de los productos de oxidación (daño en el DNA) (Norman & Temple, 2000). Es de importancia mencionar que el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, reportó que esta enfermedad ocupa el segundo lugar nacional en causa de defunciones en su estudio del año 2013, por lo que hace de éste un problema de salud pública.

Los antioxidantes naturales, particularmente los de origen vegetal, han generado un gran interés en los consumidores y comunidad científica, ya que existen estudios epidemiológicos que evidencian la relación del consumo frecuente de éstos con la disminución de las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer, entre otras (Barreira, Ferreira, Oliveira & Pereira, 2008; Renaud et al., 1998 y Temple, 2000). Srinivasan (2005) declara que las dietas ricas en frutas y vegetales pueden reducir el riesgo de una amplia variedad de enfermedades debido a la presencia de compuestos de naturaleza fenólica. Los efectos benéficos de los antioxidantes para la salud han sido atribuidos en parte a la presencia de compuestos fenólicos al ejercer sus efectos como resultado de sus propiedades antioxidantes (Martins et al., 2011). Se ha reportado que dichos compuestos poseen efectos be-

néficos incluyendo efectos inhibitorios de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Cheplick et al., 2010 y Ranilla, Kwon & Apostolidis, 2010). Así como también, se han estudiado dichas enzimas para el control del nivel de glucosa en sangre pues hidrolizan el almidón en glucosa durante la digestión (Lakshmana et al., 2015).

Para comprobar dicha actividad, se han desarrollado muchos ensayos para determinar la actividad antioxidante basadas en diferentes mecanismos químicos y biológicos, incluyendo capacidad antioxidante por equivalentes de Trolox (TEAC) (Miller et al., 1993), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Caz et al., 1993), poder antioxidante por reducción de hierro (FRAP) (Benzie & Strain, 1999) y cuantificación de radicales libres (DPPH) (Brand-Williams, Cuveiler & Berset, 1995).

Los compuestos antioxidantes pueden ser extraídos de fuentes vegetales con varios tipos de disolventes y métodos de extracción. Se ha demostrado que el tipo de antioxidantes y el rendimiento de los extractos dependen en gran medida de las propiedades del disolvente tales como polaridad, viscosidad y presión de vapor (Wijekoon et al., 2011). Dicho lo anterior, la correcta elección del disolvente puede favorecer la extracción de los compuestos. En la actualidad, se han desarrollado nuevos métodos de extracción de compuestos bioactivos de origen vegetal. En este sentido, la extracción asistida por ultrasonido, es un método no convencional que ofrece alta reproducibilidad, tiempos cortos de extracción, fácil manejo, menor consumo de disolvente, así como bajo consumo de energía (Khan et al., 2010). En la extracción asistida por ultrasonido, la cavitación ultrasónica crea fuerzas de cizallamiento que rompen las paredes celulares mecánicamente y aumentan los procesos de transferencia de masa. Además de que no hay ninguna reacción química aparente que pueda prevenir la probable degradación química de los compuestos de interés (Wang et al., 2008).

Dicho lo anterior, es de importancia el estudio científico de plantas como alternativa en el tratamiento de éste trastorno metabólico (DM-II). Aproximadamente el 63% de los pacientes diabéticos utilizan la medicina tradicional mexicana como tratamiento alternativo y complementario, además de los tratamientos médicos, la mayoría de estos medicamentos sin previo conocimiento al médico tratante del paciente (Argáez-López et al., 2003).

En este orden de ideas, es muy común en México el uso de fuentes vegetales como remedio alternativo para el tratamiento de diabetes mellitus. Una de ellas es

el nopal, éste se suele consumir en ayunas (*Opuntia spp.*) preparado con el fruto, el cladodio o con la mezcla de ambos (Ibáñez-Camacho & Roman-Ramos, 1979 y Bravo-Solis & Sánchez-Mejorada, 1991). También, la *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (*Bignoniaceae*), popularmente conocida como «tronadora», «huiztontli» o «xochitl huizton» se utiliza en todo México y América Central para la diabetes y el control trastorno urinario (Winkelman, 1986, Lozoya et al., 1987 y Hernández-Galicia et al., 2002). Finalmente, la raíz de *Ibervillea sonorae* Greene (sin. *Maxi maximowiczia sonorae* SWATS; *Cucurbitaceae*), popularmente conocido como «wereque», también es uno de los remedios más utilizados de plantas para el tratamiento de esta enfermedad (Xolalpa-Molina, 1994).

Razón por la cual el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido fenólico y flavonoides totales, así como la capacidad hipoglucemiante, antioxidante y antirradical de extractos acuosos y etanólicos, obtenidos de la hoja de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal.

## 6.2. Antecedentes

### 6.2.1. *Tecoma Stans*

La *Tecoma stans* popularmente conocida en México como tronadora, es un árbol pequeño o arbusto bajo, perennifolio o caducifolio. El nombre científico del género *Tecoma* deriva del nombre prehispánico náhuatl *tecomaxochitl* que significaría flor en forma de copa, aunque también la conocían los antiguos mexicanos como *nixtamaxochitl*. El nombre de la especie (*stans*) viene del latín «stare» que significa estar derecho, haciendo referencia a su porte erecto. A la tronadora se le reportan 54 usos medicinales distintos y 56 componentes químicos contenidos en la planta, aunque su aplicación medicinal ha sido enfocada siempre hacia la diabetes. Las hojas de la planta contienen los alcaloides monoterpénicos, actidina, boschniakina, tecomanina, tecostatina y tecostidina; los alcaloides como, indol, eskatol y triptamina, los monoterpénicos, aucubin, plantarenalósido, stanside, stansioside, alfa-stansioside, beta-stansioside y 5-deoxistansioside, los componentes benzílicos ácidos cafeíco, paracumárico y ferúlico y el flavonoide ácido siríngico. En las flores se han identificado dos flavonoides, el glucósido, y el rutinósido, de cianidín (Plantas medicinales de México, 2011).

Estudios reportan que los compuestos activos de la tronadora son los alcaloides (Hammouda et al., 1964 y Hammouda & Amer, 1966), su papel en las propie-

dades antidiabéticas de esta planta, sigue siendo controversial (Costantino et al., 2003). No obstante, éstos resultados sugieren que la captación de glucosa en los tejidos, es uno de los mecanismos por los cuales *Tecoma stans* ejerce su efecto antidiabético. La posibilidad de que las propiedades antidiabéticas de *Tecoma stans* fueran debidas al efecto de secreción de insulina ha sido descartada (Lozoya-Meckes & Mellado-Campos, 1985), sin embargo, Aguilar-Santamaría et al. (2009), reportaron la actividad inhibidora de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en extractos acuosos de esta planta. Asimismo, la actividad hipoglucemiante de *Tecoma stans* ha sido confirmada en modelos animales (Flores-Sáenz et al., 1991).

### 6.2.2. *Opuntia sp*

Son plantas, suculentas arborescentes, arbustivas o rastreras, simples o cespitosas, generalmente espinosas. Tronco bien definido o con ramas desde la base, erectas, extendidas o postradas. Artículos globosos, claviformes, cilíndricos o aplanados (cladodios), muy carnosos o leñosos. Limbo de las hojas pequeñas, cilíndrico, carnosos, muy pronto caduco. Aréolas axilares con espinas, pelos, glóquidas y a veces glándulas; generalmente las de la parte superior de los artículos son las productoras de flores, espinas solitarias o en grupos, desnudas o en vainas papiráceas. Fruto en baya, seco o jugoso, espinoso o desnudo, globoso, ovoide hasta elíptico. El género *Opuntia* se divide en dos subgéneros: el *Cilindropuntia* (en general, éste no tiene mayor importancia económica) y el *Platyopuntia*.

Los nopales silvestres tienen su centro de distribución en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas y Aguascalientes, sin embargo se han extendido hacia el norte y sur de México (Comisión nacional de las zonas áridas Instituto Nacional de Ecología, 1994).

En México, se estima que aproximadamente 500 especies de plantas medicinales se utilizan para tratar la DM-II. Una de estas plantas es *streptacantha Opuntia Lem.* (*Cactaceae*), comúnmente conocido como «Nopal», que tiene usos tradicionales de las tribus precolombinas de México documentados por el código florentino, un documento elaborado en el S. XVI. Más tarde (S. XVII), Hernández se refiere al uso del cladodio en el tratamiento de gastritis, cólico intestinal y úlceras (Argueta, 1994). También, Alimi *et. al* (2010), determinaron que la raíz de nopal tiene 57.56 0.51 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto.

### 6.2.3. *Ibervillea Sonorae*

Se trata de una planta dioica perenne que pertenece a la familia *Cucurbitaceae*. Es una raíz grande del tamaño de una jícama. Echa una enredadera que trepa en los árboles. La flor es amarilla, pequeña. El fruto es una bola verde, rayado cuando es tierno y rojo con rayas claras cuando está maduro. Florea en mayo. Crece en los cerros, en las lomas y en los valles. Es muy amarga (Alarcon Aguilara et al., 2005). Se desarrolla en la región semiárida al norte de México (Henández, Calzada, Román & Alarcón, 2007) y ha sido empleada desde hace varios siglos por diferentes grupos étnicos para tratar padecimientos de la piel, artritis, reumatismo y algunas enfermedades cardiacas (Hernández, 2011).

Ésta raíz tuberosa de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene (*Cucurbitaceae*), una planta conocida localmente como «Wereke», se utiliza ampliamente en México para el tratamiento empírico de DM-II (Jonhson et al., 2006; Lira & Strich, 2002; Hernández-Galicia, Calzada, Román-Ramos & Alarcón-Aguilar, 2007).

Investigaciones químicas anteriores de *I. sonora* resultaron en el aislamiento y la identificación de varios triterpenos de tipo Cucurbitane conocidos como kinoinis (Achenbach, Horn, Dominguez, Rombold & Gómez-López, 1993). Su popularidad ha dado lugar a múltiples formulaciones comerciales, cuya eficacia antidiabética queda por evaluar. Sin embargo, la actividad hipoglucémica de los extractos acuosos, jugo crudo, y diclorometano y metanol de raíz de *Ibervillea sonora* en ratones y ratas sanas y aloxano diabéticos se ha documentado (Alarcón, Calzada, Hernández, Ruiz & Román, 2005).

El consumo de esta planta se ha vuelto una alternativa terapéutica eficiente para personas con DM-II que no cuentan con los recursos económicos para adquirir medicamentos alópatas y, por lo tanto, su uso es cada vez más recurrente. La forma más común de extracción de los principios activos de esta planta para su consumo es la decocción acuosa de la raíz (Alarcón et al., 2005). El efecto hipoglucémico del extracto acuoso se ha demostrado y validado en diversos estudios (Alarcón et al., 2005 ; Henández et al., 2007; Rivera et al., 2011 y Blancas, 2005).

De acuerdo con lo mostrado por Hernández-Galicia et al. (2007), la actividad hipoglucemiante del wereque se atribuye a un grupo de monoglicéridos y ácidos grasos, presentes en la raíz de la planta, que fueron extraídos con diclorometano.

Sin embargo es necesario ampliar el reconocimiento de componentes contenidos en las fracciones acuosas, ya que éste es el modo habitual de consumo.

Los estudios previos de la preparación tradicional de *Ibervillea sonorae* han demostrado que reduce la glucemia de los animales experimentales en una forma dependiente de la dosis, que tiene un efecto diferente con cada una de las dosis administradas de 150, 300, 600 y 850 mg/kg (Alarcon-Aguilar et al., 2002a).

## 6.3. Extracción

### 6.3.1. Métodos de extracción convencionales

#### 6.3.1.1. Extracción con líquidos presurizados

La técnica conocida como extracción con líquidos presurizados o por su nombre comercial como extracción acelerada con disolventes. Las temperaturas elevadas permiten acelerar la cinética del proceso extractivo mientras que las altas presiones evitan que el disolvente alcance su punto de ebullición, lo que permite una rápida y segura extracción de los analitos de interés (Ahmed, 2001).

#### 6.3.1.2. Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de compuestos o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Ferraroli's, 1975).

#### 6.3.1.3. Destilación

Es el procedimiento utilizado para separar dos líquidos que se encuentran disueltos. Este procedimiento se basa en el hecho de que no todos los líquidos tienen el mismo punto de ebullición (Cuevas-Quintero & Brambila-Horta 2003). La des-



tilación implica que los materiales vegetales se mezclan (o no) con un disolvente seguido por calentamiento o por la introducción de vapor de agua. Los vapores resultantes se enfrían y se recogen en un separador y el extracto separado del disolvente (Mircea-Vinatoru, 2001).

#### 6.3.1.4. *Soxhlet*

En la extracción Soxhlet, la muestra se pone repetidamente en contacto con las porciones frescas del disolvente, lo que contribuye a desplazar el equilibrio de transferencia y no se requiere filtración después de la etapa de lixiviación. Los deméritos más significativos del extractor Soxhlet, en comparación con las otras técnicas convencionales para la preparación de muestras sólidas son, el largo tiempo requerido para la extracción que causa la pérdida de disolvente y es perjudicial para el medio ambiente (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

### 6.3.2. *Métodos de extracción no convencionales*

#### 6.3.2.1. *Extracción asistida por microondas*

En los últimos años, la extracción asistida por microondas (MAE, *microwave assisted extraction*) permite un calentamiento más rápido y eficiente de la muestra. La muestra se extrae aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado. Este tipo de radiación permite el calentamiento selectivo de la muestra según el disolvente utilizado. Esta técnica depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden emplear, ya que conviene que éstos no sean transparentes a la radiación de microondas y que tengan un elevado momento dipolar, sin olvidar la solubilidad de los analitos en los mismos (Shen & Lee, 2003).

#### 6.3.2.2. *Extracción sólido-líquido*

La extracción sólido líquido (ESL) es un proceso realizado con temperaturas elevadas, por lo general entre 50 y 200°C y a presiones de entre  $10 \pm 15$  MPa. La presión permite que la extracción en la célula sea más rápida y ayuda a forzar la penetración del líquido en los poros de la matriz. Un gran número de aplicacio-

nes han sido reportadas para la extracción en muestras ambientales y muestras de alimentos por éste método (Branchet et al., 2001).

### 6.3.2.3. *Extracción por fluidos supercríticos*

Los fluidos supercríticos tienen densidades similares a las de los líquidos pero con coeficientes de difusión mayores y viscosidades más bajas, similares a la de los gases, por lo que la extracción es más rápida que con líquidos orgánicos (Ahmed, 2001). El dióxido de carbono ha sido el fluido de elección en la mayoría de las extracciones ya que es un disolvente adecuado para analitos no polares. Para compuestos más polares es necesaria la introducción de modificadores, como el metanol o el agua, para aumentar la polaridad del CO<sub>2</sub> y mejorar la extracción de estos compuestos (Lijun-Wang & Curtis, 2006).

### 6.3.2.4. *Extracción asistida por ultrasonido*

En la extracción asistida por ultrasonido se utilizan sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente (Gao & Llu, 2005).

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la sonicación, ya sea que las sustancias de interés se encuentren en células internas o externas del tejido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal se aumenta el área de exposición al solvente y a la cavitación producida. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Vinatoru, 2001). Otra ventaja según Rostagno et al. (2003), es que ésta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas.

Objetivo: Realizar la extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos y evaluar su actividad antioxidante e hipoglucemiante de la hoja de *Tecoma stans* (hoja de tronadora), raíz de *Ibervillea sonora greene* (wereque) y raíz de *Opuntia sp* (raíz de nopal).

## 6.4. Metodología experimental

### 6.4.1. Materiales y métodos

#### 6.4.1.1. Reactivos

El material vegetal fue adquirido en el mercado Sonora de la Ciudad de México. Mientras que el cloruro de aluminio hexahidratado en laboratorios Reasol. La gelatina de laboratorios Gelita de México. El nitrito de sodio y alcohol amílico de laboratorio Mallinckrodt. Cloruro de hierro anhidro y reactivo de Mayer's del laboratorio Fluka. Acetato de sodio de laboratorio Analytyka. Ácido ascórbico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico de laboratorio J.T. Baker.  $\alpha$ -amilasa de páncreas de porcino,  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*, ácido acético glacial, hidróxido de sodio y cloroformo laboratorio Fermont. Ácido gálico monohidratado, 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), catequina, quercetina, cloruro férrico hexahidratado, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), reactivo de Folin-Cioaltea, ácido 6 hidroxil 2,5,7,8 tetrametil carboxílico y reactivo de Dragendorff de Sigma-Aldrich. Reactivo de Fehling A, reactivo de Fehling B y etanol de laboratorio Meyer. Carbonato de sodio y viruta de magnesio de laboratorio Golden Bell. Bicarbonato de sodio y carbonato de sodio de laboratorio Merck. Reactivo de Molish de laboratorio Hycl.

#### 6.4.1.2. Obtención de los extractos

Se prepararon disoluciones con disolventes de distinta polaridad (agua y etanol) de la hoja de tronadora, raíz de wereque y de nopal; empleando una relación materia/disolvente de 1:20. Posteriormente, se realizó la extracción vía ultrasónica, utilizando un baño ultrasónico con una frecuencia de 25 kHz, haciendo dos lavados de 30 min cada uno. Las muestras fueron centrifugadas (1750 rpm, 15 min), concentradas en un rotavapor (Yamato, RE500) y liofilizadas en un equipo Labconco (Freezone 4.5 l). Finalmente los concentrados fueron almacenados en frascos ámbar hasta su análisis.

#### 6.4.1.3. Análisis fitoquímico

La metodología seguida para el análisis fitoquímico fue publicada por Dominguez (1973), y contempla la detección de los metabolitos secundarios generalmente relacionados con actividades biológicas.

**Alcaloides.** Las soluciones fueron acidificadas con HCl 1N. A 1mL de la muestra, se le agregaron de 2 a 3 gotas de cada uno de los siguientes reactivos. Dragendorff: la prueba es positiva cuando aparece una coloración rojo, marrón o naranja. Wagner: la prueba es positiva con la aparición de precipitados floculentos color marrón. Hager: la prueba es positiva con la aparición de un precipitado. Mayer's: la prueba es positiva cuando aparece un precipitado blanco, amarillo claro o marrón.

**Flavonoides.** Prueba de Shinoda: A 1 ml de muestra se le adicionó un trozo de viruta de magnesio, posteriormente, se le agregaron 5 gotas de HCl concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta es prueba positiva para la presencia de flavonoides. Prueba de Rosenheim: a 1 mL de solución acuosa con la muestra, se añadió 0.5 ml de HCl concentrado, fue mezclado y calentado durante 10 minutos a 100°C y después enfriado, fue trasvasado a otro tubo de ensayo al cual se le agregó 0.4 ml de alcohol amílico y mezclados, se dejó reposar hasta la aparición de dos fases. La prueba se consideró positiva si aparecía una coloración en la fase amílica que va desde el carmesí oscuro al rosado débil. Prueba del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1mg de muestra se disuelve en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se observa coloración amarilla para flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

**Carbohidratos.** Prueba de Fehling: a 1 mL de muestra se agregaron 0.5 mL del reactivo de Fehling A y 0.5 mL de reactivo de Fehling B. Se colocó la muestra en un baño de agua hirviendo, la prueba es positiva una vez que aparezca el precipitado color rojo ladrillo. Prueba de Molish: a 500 µL de muestra se les agrega gota a gota el reactivo, después 500 µL de ácido sulfúrico fueron adicionados cuidadosamente por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

**Saponinas.** Prueba de la agitación: las muestras secas se disolvieron con agua en un tubo de ensayo, se agitó vigorosamente durante 3-5 min. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por 30 min, se considera prueba positiva. Prueba de NaHCO<sub>3</sub>: a 500 µL de muestra se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se agitó ligeramente, luego se agregaron 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indican que la prueba es positiva. Prueba de Salkowski: se disolvieron de 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo y se añadió 1mL de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo.

**Esteroles y triterpenos.** Prueba de Liebermann-Burchard: se mezcló 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo. La mezcla se enfrió a 0° C y se le añadió una gota de ácido sulfúrico. Gota a gota se añade este reactivo a la muestra. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva. Prueba de Salkowski: 1mg de muestra en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

**Cumarinas.** Prueba de NaOH 10%: se disolvió 1mg de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba es positiva.

**Insaturaciones.** Prueba de  $\text{KMnO}_4$ : a 500  $\mu\text{L}$  de muestra, se añadió gota a gota una solución de  $\text{KMnO}_4$  al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café.

#### 6.4.1.4. Actividad hipoglucemiante

##### 6.4.1.4.1. Método de actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa

En un tubo para microcentrífuga de 2mL (Eppendorf) se vertieron 300  $\mu\text{L}$  de distintas concentraciones de extracto seco en disolvente (agua o etanol) posteriormente se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato 0.02 M a pH 6.9 conteniendo 0.25 mg/mL de  $\alpha$ -amilasa, dicha mezcla se incubó a 25°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de solución de almidón de maíz al 0.5%, igualmente, en amortiguador de fosfato 0.02M a pH de 6.9. La mezcla fue incubada a 25 °C durante 10 minutos, acto seguido se añadió 600  $\mu\text{L}$  de solución DNS. Posteriormente, se calentó en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan G0) empleando acarbosa como control positivo.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa mediante la Ecuación (1), (Bahareh et al.,2012).

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{control}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$\Delta Abs_{control}$  = Diferencia de absorbancia del control, antes y después de la incubación.

$\Delta Abs_{muestra}$  = Diferencia de absorbancia de la muestra, antes y después de la incubación.

#### 6.4.1.4.2. Método de actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

La prueba se realizó en una microplaca de 96 pozos, se vertieron 50  $\mu$ L de distintas concentraciones de extracto seco en disolvente (agua o etanol) y se le agregó 100  $\mu$ L de disolución de  $\alpha$ -glucosidasa de levadura de *S. cerevisiae* en amortiguador de fosfato 0.1M a pH 6.9. La mezcla fue pre-incubada a 25°C durante 10 minutos, posteriormente se añadieron 50  $\mu$ L de la disolución de p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido en 0.1M en amortiguador de fosfato a pH 6.9. Se hizo una primera lectura de absorbancia a 405nm. Después se incubó a 25 °C durante 5 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan G0) empleando acarbosa como control positivo (Bahareh et al., 2012). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la Ecuación (2):

$$\text{Inhibición (\%)} = \left( \frac{\Delta Abs_{control} - \Delta Abs_{muestra}}{\Delta Abs_{control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

$\Delta Abs_{control}$  = Diferencia de absorbancia del control, antes y después de la incubación.

$\Delta Abs_{muestra}$  = Diferencia de absorbancia de la muestra, antes y después de la incubación.

El valor de  $EC_{50}$  fue determinado a partir de los datos obtenidos en la gráfica de efecto de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa contra la concentración del extracto. El  $EC_{50}$  está determinado como la cantidad necesaria del extracto estudiado para reducir la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa en un 50%. Los resultados obtenidos fueron reportados en mg de extracto seco/mL de disolvente.

#### 6.4.1.5. *Determinación de fenoles totales*

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). En un tubo para microcentrífuga de 2mL (Eppendorf) se colocaron 200 $\mu$ L de muestra. Posteriormente, se adicionaron 1400 $\mu$ L de agua destilada y 100 $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, dejando reposar la solución resultante durante 3 minutos. A continuación, se adicionaron 300 $\mu$ L de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, seguido de 180 $\mu$ L de agua destilada. Finalmente la mezcla se mantuvo durante 90 minutos en la oscuridad y la absorbancia determinada a una longitud de onda de 760nm (Thermo Scientific Multiskan GO). El contenido fenólico total fue expresado como mg Eq ácido gálico/g extracto seco.

#### 6.4.1.6. *Determinación de flavonoides*

Se empleó la metodología reportada por Benariba et al. (2013). En tubos de microcentrífuga de 2mL (Eppendorf), se colocaron 200 $\mu$ L de muestra, 800 $\mu$ L de agua destilada, 60 $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> (150 g/L) y 60 $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O (100 g/L). La mezcla se mantuvo en reposo por 6 minutos y posteriormente se agregaron 800 $\mu$ L de NaOH (1 M) y 80 $\mu$ L de agua destilada. La solución se mantuvo a temperatura ambiente ( $\approx$ 22°C) durante 15min. La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 510nm. Los valores de flavonoides totales fueron expresados como mg Eq Catequina/g extracto seco.

#### 6.4.1.7. *Actividad antioxidante*

##### 6.4.1.7.1. Método de reducción de hierro (FRAP)

La capacidad antioxidante se evaluó utilizando la prueba de FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power). La determinación de FRAP está basada en la reducción del complejo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ al complejo azulado Fe<sup>2+</sup>-TPTZ (Benzie & Strain, 1996).

La solución FRAP se preparó mezclando 25mL de amortiguador de acetato 300mM (pH 3.6), 2.5mL de solución TPTZ (0.01 M) y 2.5mL de una solución de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.02 M). La solución FRAP se llevó a una temperatura de 37°C

por un tiempo de 4min previo a su uso. Una muestra de 100 $\mu$ L de cada extracto fue mezclada con 1900 $\mu$ L de solución FRAP, manteniendo en oscuridad por 30 min. La absorbancia fue determinada a 593nm y los resultados expresados como  $\mu$ MEq trolox/L.

#### 6.4.1.7.2. Método de DPPH

La capacidad antirradical fue determinada por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) siguiendo la metodología descrita por Quiroz-Reyes et al. (2013). Una alícuota de 100 $\mu$ L de extracto se mezcló con 125 $\mu$ L de Buffer Tris-HCl 0.1M, agitando con vortex durante 5s. A esta solución, se agregaron 500 $\mu$ L de solución de DPPH (0.17 mg/mL de etanol). Después de 30min en oscuridad la absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 517nm.

La capacidad secuestradora de radicales libres fue calculada como porcentaje de inhibición a partir de la Ecuación (3):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left( 1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) \times 100 \quad (3)$$

El valor de EC<sub>50</sub> fue determinado a partir de los datos obtenidos en la gráfica de efecto de reducción de DPPH contra la concentración del extracto. El EC<sub>50</sub> está determinado como la cantidad necesaria del extracto estudiado para reducir la concentración de DPPH en un 50%. Los resultados obtenidos fueron reportados en ppm de extracto seco.

#### 6.4.1.8. Identificación de compuestos fenólicos

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies. La detección se llevó a cabo a 280 nm y a una temperatura de 30°C. La velocidad de flujo fue de 0.3mL/min. Las fase A consistió en 99.9% de agua y 0.1% de ácido fórmico mientras que la fase B fue 50% de metanol y 50% de acetonitrilo. La fase gradiente fue 88% de A y 12% de B, la fase final fue 35% de A y 45% de B. Se inyectaron 5 $\mu$ L del extracto.



## 6.5. Resultados y discusión

### 6.5.1. Análisis fitoquímico

En el análisis fitoquímico preliminar de la hoja de tronadora (Tabla 28) se hace evidente la presencia de compuestos como saponinas, flavonoides, insaturaciones y carbohidratos, siendo éstas mayormente detectadas en los extractos etanólicos. En este sentido, dichos compuestos como se comprueba más adelante, presentan actividad antioxidante y antirradical. Los antioxidantes de fuentes naturales son la única alternativa a los antioxidantes sintéticos que actúan en contra los radicales libres y éstos a su vez, son asociados a enfermedades crónico degenerativas como la DM-II.

También se aprecia que en los extractos de raíz de wereque hay presencia abundante de saponinas y ligeramente de carbohidratos, siendo este grupo el que predomina con ambos disolventes, sin embargo, cuando se emplea etanol se logran extraer también esteroides.

Componentes fitoquímicos	Presencia					
	Hoja de tronadora		Raíz de wereque		Raíz de nopal	
	Acuosa	Etanólica	Acuosa	Etanólica	Acuosa	Etanólica
Alcaloides	–	–	–	–	–	–
Flavonoides	++	+++	–	–	+	++
Carbohidratos	++	+++	+	++	++	+++
Saponinas	++	+++	+++	+++	+	+++
Esteroides	+	–	–	+	–	++
Cumarinas	–	–	–	–	–	–
Insaturaciones	–	+++	–	–	–	–

+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, – No detectado.

Tabla 28. Metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos de hoja de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal.

En la Tabla 28, se observa que las pruebas realizadas resultaron positivas para carbohidratos, saponinas y esteroides, en los extractos etanólicos, mientras que para los extractos acuosos fue positivo para flavonoides, carbohidratos y saponinas.

Los metabolitos secundarios se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, presentando múltiples propiedades farmacológicas (Gutiérrez et al. 2000), siendo de interés debido a su efecto biológico en otros organismos. Los resultados obtenidos en la presente investigación se corroboran con los de Zhong et al. (2010) donde demuestran que los polisacáridos de *O. ficus indica* presentan actividad antirradical comparada con la del ácido ascórbico. También Biesaga (2011), demostró que algunos polisacáridos de *O. ficus indica* presentan actividad antioxidante. En este sentido, es bien sabido que los polisacáridos de *O. ficus indica* son polímeros constituidos de monosacáridos con varios hidrógenos, grupos hidroxilo y ácidos. Dicho lo anterior, los mecanismos antioxidantes de los polisacáridos se han atribuido a su capacidad de donar hidrógeno, a sus grupos hidroxilo que pueden actuar como donadores de electrones y a la presencia de compuestos antioxidantes tales como polifenoles (Biesaga, 2011). La distribución de estos metabolitos está relacionada a que cada grupo fitoquímico presenta funciones específicas, entre ellas múltiples propiedades farmacológicas. Inal & Kahraman (2000) reportaron que los flavonoides y polisacáridos presentan actividad antirradical, esto es por su capacidad de donar electrones e hidrógenos.

### **6.5.2. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa**

En la evaluación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa, se tiene que los extractos etanólicos presentaron la mayor inhibición enzimática.

En la Figura 12 se evidencia un comportamiento lineal entre la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición enzimática en ambos extractos de we-reque, alcanzando porcentajes de inhibición mayores al 50 por ciento a partir de aproximadamente 2 mg de extracto seco/mL de disolvente, con lo que se ha demostrado que los compuestos fenólicos presentes en dicha planta presentan actividad inhibitoria enzimática.

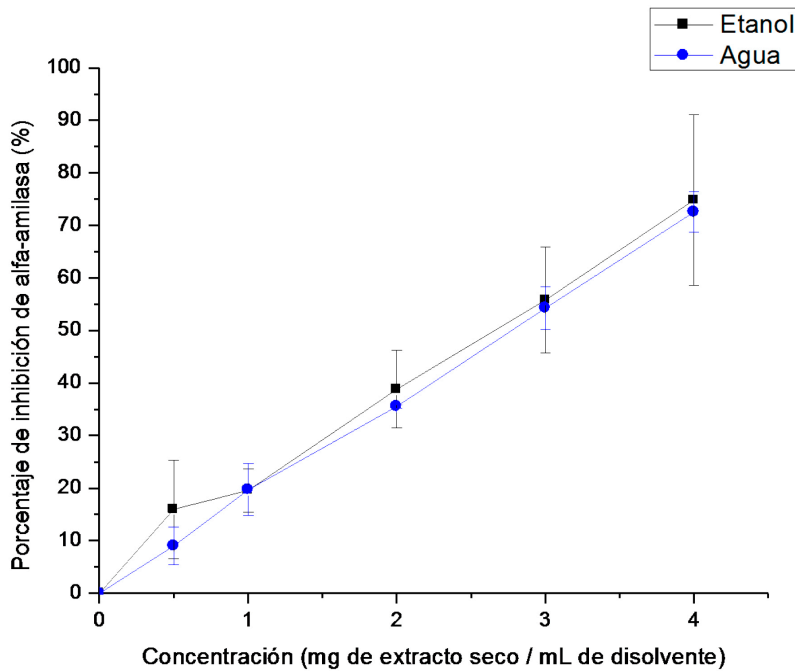


Figura 12. Porcentaje de inhibición de alfa-amilasa de extractos etanólicos y acuosos de raíz wereque.

En la Figura 13, se presenta la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa de los extractos de la hoja de tronadora, se hace evidente la relación lineal entre la concentración del extracto con la bioactividad, así como también se tiene que sólo se requieren 0.3 mg de extracto seco/mL de disolvente para obtener un 50 por ciento de inhibición enzimática. Con esto se demuestra que la hoja de tronadora es un potencial inhibidor de  $\alpha$ -amilasa y esto a su vez está íntimamente relacionado con la presencia de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante, la cual se analiza posteriormente. Esto se corrobora con estudios previos, donde se confirma la actividad hipoglucemiante de *Tecoma stans* en modelos animales (Flores-Sáenz et al., 1991). Hay muchos estudios sobre el análisis de los componentes químicos de *O. ficus indica*, en los cuales al igual que en el presente estudio fitoquímico, demuestran la presencia de polisacáridos, esto puede tener relación con su menor actividad enzimática por ejemplo con respecto a la hoja de tronadora pues ésta última tiene mayor presencia de compuestos fenólicos y éstos a su vez relacionados con dicha bioactividad (Xian - Ke Zhong et. al., 2010).

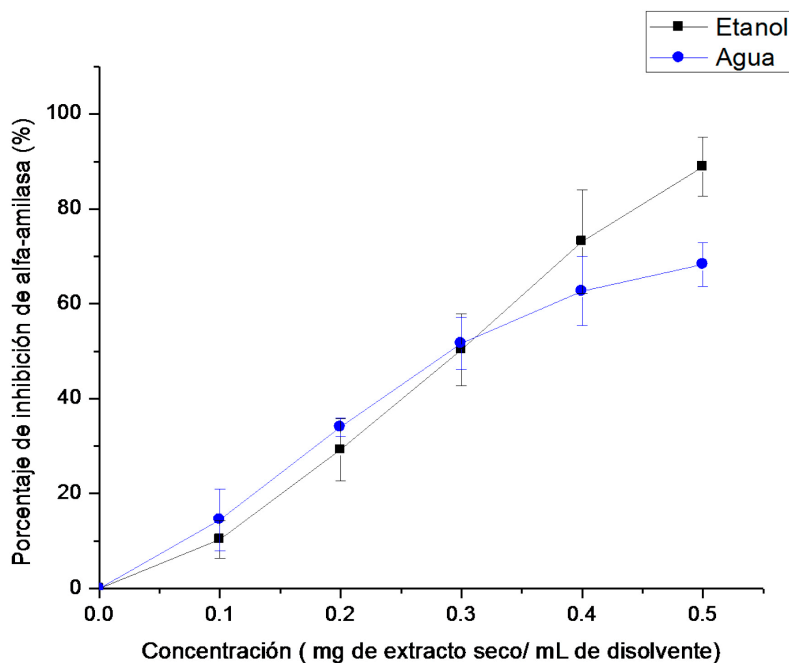


Figura 13. Porcentaje de inhibición de alfa-amilasa de extractos etanólicos y acuosos de hoja de tronadora.

No obstante, en la Figura 14, se aprecia que se tuvo una mayor actividad enzimática con los extractos etanólicos, esta bioactividad se puede atribuir a los polisacáridos, justificándose por un lado con el análisis fitoquímico pues demuestra mayor presencia de carbohidratos así como también a comparación de los extractos etanólicos de tronadora (204.82 mg EAG/g ES), la raíz de nopal contiene menor cantidad de fenoles totales (37.04 mg EAG/g ES), resultados que sugieren que el polisacárido reducido de *O. ficus indica* induce la peroxidación lipídica inducida por la actividad antirradical del  $-OH$  (Xian - Ke Zhong *et. al.*, 2010). También se puede inferir que los polisacáridos presentes en la raíz de nopal extraídos con etanol favorecieron la bioactividad debido a la presencia de radicales hidroxilo ( $-OH$ ).

En la Figura 15, se presenta la curva correspondiente a la acarbosa, pues esta fue usada como control positivo, se observa el comportamiento lineal así como también se tiene que se alcanza el máximo de inhibición con una concentración de 1mg/mL de disolvente.

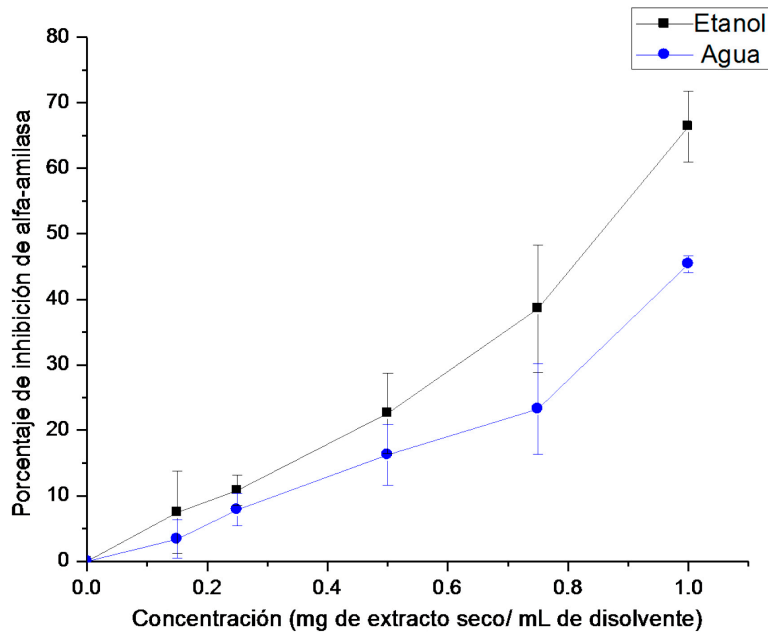


Figura 14. Porcentaje de inhibición de alfa-amilasa de extractos etanólicos y acuosos de raíz de nopal.

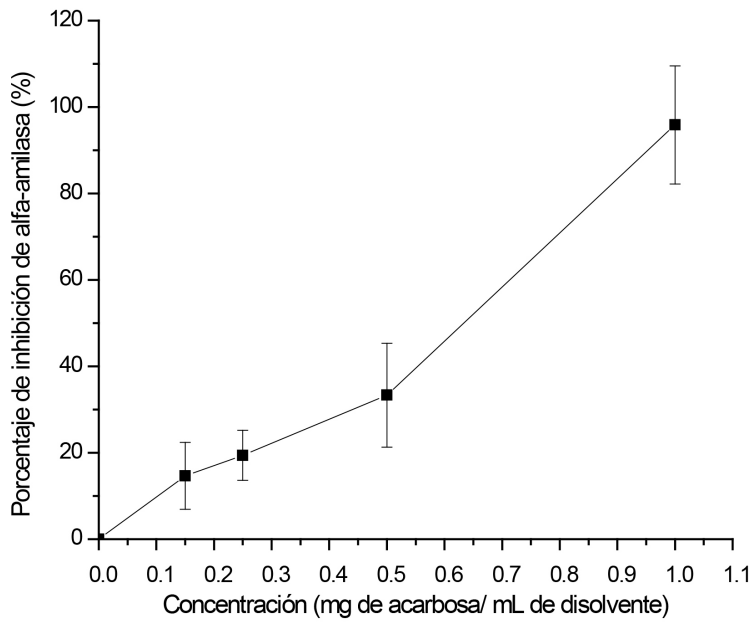


Figura 15. Porcentaje de inhibición de acarbosa en la  $\alpha$ -amilasa

Clínicamente, la acarbosa, es un inhibidor de la pseudo-oligotetrasacárido de amilasas y glucosidasas, y se emplea como terapia adyuvante en pacientes con diabetes. Actualmente su uso es limitado, principalmente debido a sus incómodos efectos secundarios (Aguilar-Santamarina, 2009).

En la Figura 16, se muestra de manera general los resultados en miligramos de extracto seco por mililitro de disolvente (mg/mL) que se requieren para inhibir en un 50 por ciento la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, empleando acarbosa como control positivo.

Todos los extractos exhibieron capacidad de inhibir la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa. No obstante, tomando como referencia la bioactividad de la acarbosa, se necesitó una mayor concentración de extracto de raíz de wereque, casi la misma concentración de extracto de raíz de nopal y una menor concentración de extracto de la hoja de tronadora, pues con ésta última solo se requieren 0.275 mg de extracto seco/mL de etanol para inhibir en un 50 por ciento la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en comparación con los 0.63 mg de

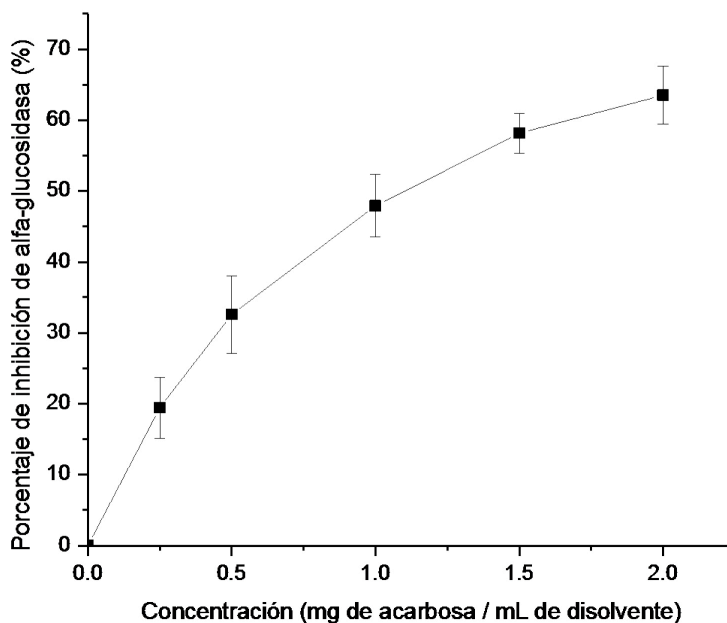


Figura 16. Porcentaje de inhibición de acarbosa en la  $\alpha$ -glucosidasa.

	Agua	Etanol
Raíz de wereque	2.8	2.5
Hoja de tronadora	0.275	0.3
Raíz de nopal	1	0.84
Acarbosa	0.63	

Control positivo: Acarbosa.

Tabla 29. Actividad hipoglucemiante en  $\alpha$ -amilasa [EC50 (mg/mL)] de los extractos.

extracto/mL de disolvente de la acarbosa. Con lo que se infiere que en el presente estudio el extracto etanólico presento una mejor inhibición enzimática que el mismo control. Los extractos tanto etanólicos como acuosos probados a la concentración máxima inhibitoria todos inhiben la actividad  $\alpha$ -amilasa más allá del 50%.

El presente trabajo demuestra que el posible mecanismo de acción de actividad hipoglucemiante evaluados en los extractos es a través de la inhibición enzimática y ésta se debe a los compuestos fenólicos, pues estudios previos también reportan que las plantas ricas en compuestos fenólicos tienen mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa y por lo tanto tienen potencial para contribuir al tratamiento de la DM-II (Shobana, Sreerama & Malleshi, 2009 y McCue & Shenty, 2004).

Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa son también conocidos como bloqueadores de almidón debido a que contienen sustancias que impiden que el almidón de la dieta pueda ser absorbido por el cuerpo. El almidón es un carbohidrato complejo que no puede ser absorbido a menos que sea hidrolizado primero por la enzima amilasa digestiva y otras enzimas. Recientemente se ha demostrado que los compuestos fenólicos desempeñan un papel en la mediación de la inhibición de amilasa y por lo tanto tienen potencial para contribuir al tratamiento de la DMII (McCue & Shetty, 2004). Sin embargo, los informes anteriores han indicado también que la inhibición excesiva de  $\alpha$ -amilasa pancreática podría resultar en la fermentación bacteriana anormal de carbohidratos no digeridos en el colon y actividad de inhibición de  $\alpha$ -amilasa, por tanto, es útil.

### 6.5.3. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

A continuación, se muestra de manera íntegra los resultados en miligramos de extracto seco por mililitro de disolvente (mg/mL) que se requieren para inhibir en un 50 por ciento la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa, empleando acarbosa como control positivo.

Todos los extractos tienen capacidad de inhibir la actividad enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa en distintas concentraciones cada uno. Sin embargo, tomando como referencia la bioactividad experimental de la acarbosa en este proyecto ( $EC_{50} = 1.08$  mg de extracto/mL de disolvente), se necesita una mayor concentración de extracto de raíz de wereque-agua, casi la misma concentración de extracto de raíz de wereque-etanol y una menor concentración de extracto de hoja de tronadora pues con ésta última solo se requieren 0.14 mg de extracto seco/mL de etanol para inhibir en un 50 por ciento la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa (Tabla 30).

Así también se hace evidente que empleando la concentración máxima, solo los extractos etanólicos inhiben la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa más allá del 50%.

Más adelante se explica a detalle el posible efecto de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante en éstos resultados.

La hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) y la producción de maltosa y glucosa a partir del almidón son catalizados por la  $\alpha$ -amilasa de páncreas y saliva

	Agua	Etanol
Raíz de wereque	> 4	1.1
Hoja de tronadora	> 2.5	0.14
Raíz de nopal	> 1	0.175
Acarbosa	1.08	

Control positivo: Acarbosa.

Tabla 30. Actividad hipoglucemiante en  $\alpha$ -glucosidasa [ $EC_{50}$  (mg/mL)] de los extractos.



humana, mientras que la  $\alpha$ -glucosidasa libera glucosa a partir de maltosa (Lakshmana Senthil et al., 2015).

Dicho lo anterior, un factor importante para dar lugar a una hiperglucemia postprandial es la absorción rápida de la glucosa en el intestino, en el que la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa desempeñan papeles importantes debido a la hidrólisis de almidón y oligosacáridos (Gray, 1995). La  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa participan en la digestión de la glucosa por lo que son consideradas enzimas clave en el control de la hiperglicemia postprandial. La  $\alpha$ -amilasa está presente tanto en la saliva como en la secreción pancreática y es la responsable de adherir los maltooligosacáridos en la maltosa, la cual es sustrato para la  $\alpha$ -glucosidasa intestinal (Loizzo et al., 2005). Por eso, se cree que la inhibición de estas enzimas puede controlar eficazmente la elevación del nivel de glucosa postprandial en sangre. Por lo tanto, una estrategia importante para el manejo de la hiperglucemia postprandial es inhibir la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Krentz & Bailey, 2005).

Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa naturales de las plantas han demostrado tener menor efecto inhibitorio contra la actividad de  $\alpha$ -amilasa y una actividad de inhibición más fuerte contra la  $\alpha$ -glucosidasa (Kwon, Vattem & Shetty, 2006). En este estudio, el extracto etanólico de tronadora, fue el que presentó mayor inhibición enzimática, por lo tanto, se puede usar potencialmente como terapia efectiva para la hiperglucemia postprandial.

#### ***6.5.4. Determinación de fenoles totales***

En este estudio, uno de los objetivos fue evaluar el efecto del disolvente en la extracción de compuestos fenólicos totales. Éstos fueron cuantificados con el reactivo de Folin-Ciocalteu, pues es un método ampliamente utilizado y proporciona una estimación rápida y útil del contenido de fenoles totales de extractos vegetales. En ésta prueba los ácidos de tungsteno y de molibdeno se usaron como agentes reactivos con los polifenoles contenidos en las muestras, dando positivo cuando existe un cambio de coloración de azul a verde (Aguirre Joya, De la Garza Toledo, Zugasti Cruz, Belmares Cerda & Aguilar Cristobal, 2013). El ácido gálico fue empleado como estándar. La concentración de polifenoles es expresada como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES). Como se puede apreciar en la Figura 17, los

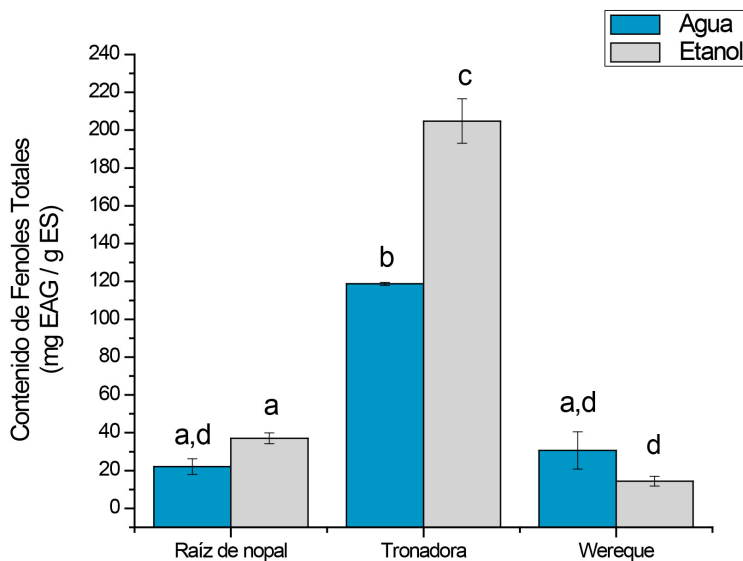


Figura 17. Comparativo del contenido total de fenoles en los extractos.

extractos de la hoja de tronadora son los que presentaron el mayor contenido de fenoles totales (204.82 mg EAG/g ES) mientras que los de la raíz de wereque presentaron el menor contenido (14.42 mg EAG/g ES). Así mismo, se observa que el mayor contenido de fenoles para raíz de nopal y tronadora se obtienen usando etanol como disolvente, caso contrario con la raíz de wereque (agua). En este sentido, se observa que no hay diferencia significativa en el contenido de fenoles totales entre la raíz de nopal y raíz de wereque ( $P < 0.05$ ).

Las características estructurales de los compuestos fenólicos son las responsables de la actividad antioxidante, por lo que las mediciones de fenoles en infusiones pueden estar íntimamente relacionadas con sus propiedades antioxidantes (Katalinic, Milos, Kulisic & Jukic, 2006). Gran parte de la literatura refiere que los compuestos fenólicos vegetales tienen un efecto antioxidante, actuando como eliminadores de ROS a través de la donación de hidrógeno así como también a la capacidad de su grupo hidroxilo (Biesaga, 2011).

Hubo un amplio rango de concentraciones de fenoles en los extractos evaluados como se muestra en la Figura 17. Sin embargo, el extracto con mayor contenido de fenoles totales fue el etanólico de la hoja de tronadora.

### 6.5.5. Determinación de flavonoides totales

Es bien sabido que los flavonoides son más solubles en metanol que en agua, no obstante, la extracción resulta más eficiente con las mezclas de éstos. Esto es probablemente consecuencia de la polaridad relativa, pues el agua provoca una hinchazón del material vegetal, aumentando a su vez el área superficial para el contacto soluto-disolvente y la mayor solubilidad de flavonoides en metanol que en agua. Asimismo, empleando compuestos alcohólicos como disolvente es más eficiente la extracción de flavonoides (Biesaga, 2011). Dicho lo cual, se aprecia y comprueba en la Figura 18, dicho comportamiento, pues con los extractos etanólicos se obtienen mayor cantidad de flavonoides totales.

Se observa también que el mayor contenido de flavonoides totales se tiene en el extracto etanólico de la hoja de tronadora (92.77 mgEq catequina/mg ES). Por otro lado, se aprecia que el comportamiento de la hoja de tronadora y raíz de nopal es el mismo, pues se obtienen más flavonoides en los extractos etanólicos, sin embargo, con la raíz de wereque es insignificante el tipo de disolvente en la extracción de dichos compuestos. Estos datos se corroboran con el análisis fitoquímico antes descrito.

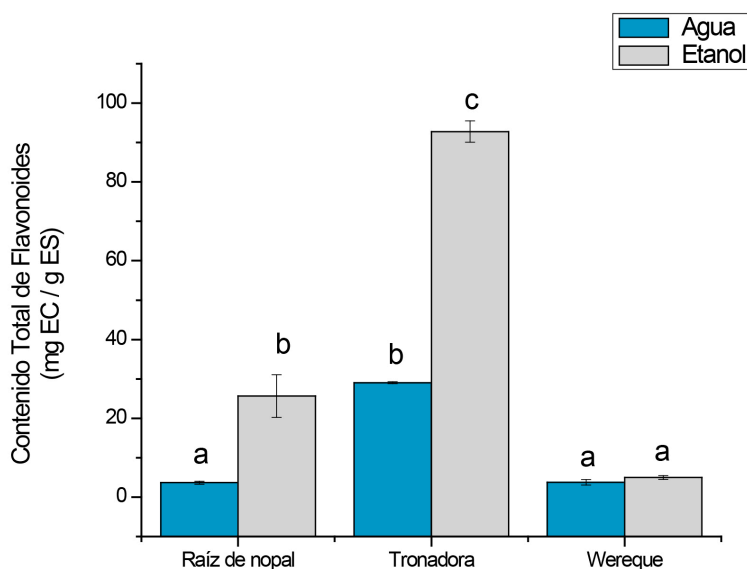


Figura 18. Comparativo de contenido total de flavonoides en los extractos.

### 6.5.6. Determinación de reducción de hierro (FRAP)

La Figura 19 muestra la capacidad reductora de hierro determinada por el método de FRAP, se observó que hubo grandes diferencias en la capacidad antioxidante entre las distintas muestras evaluadas. Los valores de FRAP variaron de 889.85 a 39.50  $\mu\text{M Eq trolox}/1000 \text{ ppm}$ . En este sentido, la extracción etanólica de la hoja de tronadora presentó el valor más alto de reducción de hierro con 889.85  $\mu\text{M Eq trolox}/1000 \text{ ppm}$ , con respecto a los extractos de raíz de wereque y raíz de nopal, donde la actividad reductora de hierro fue insignificante. Es de resaltar que la capacidad reductora de hierro fue mayor en aquellos extractos con el mayor contenido de flavonoides, por lo que se comprueba que en el presente estudio la actividad antioxidante es proporcional al contenido de fenoles totales.

En este sentido, el comportamiento de los flavonoides como antioxidantes se debe a las distintas vías de acción; capturando especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibición de las enzimas responsables de la producción de aniones superóxidos, quelación de los metales de transición involucrados en procesos de la formación de radicales libres y prevención de los procesos de peroxidación mediante la reducción de radicales alcoxi y peroxi (Veitch & Grayer, 2008).

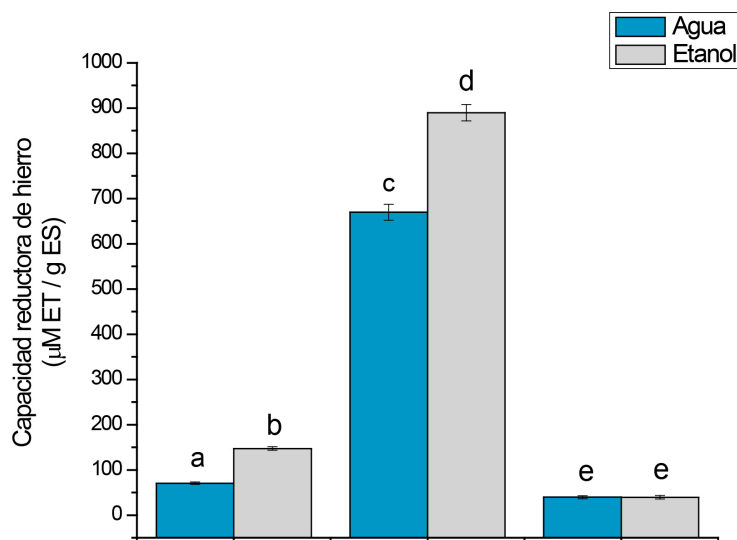


Figura 19. Comparativo de capacidad reductora de hierro en los extractos.

### 6.5.7. Capacidad de eliminación de radicales libres DPPH

En la Tabla 31, se presenta la cantidad necesaria de extracto para reducir la concentración de DPPH en un 50 por ciento ( $EC_{50}$ ). Se evidencia que para los extractos de raíz de nopal y raíz de wereque no hay influencia del tipo de solvente en la capacidad antirradical, pues con ninguno presentan dicha actividad. Caso contrario de los extractos de la hoja de tronadora, donde ambos extractos presentan actividad (acuoso y etanólico), sin embargo, el etanólico tiene la mayor capacidad antirradical. Con esto se infiere que la capacidad antirradical en este estudio está dado por el tipo de planta.

Entonces se tiene que los resultados obtenidos por DPPH en microplaca, el tipo de planta y el disolvente son factores que influyeron en la extracción de compuestos antioxidantes. El mayor porcentaje de inhibición se encontró con el extracto obtenido con etanol.

La influencia de los compuestos antioxidantes en la capacidad de eliminación de radicales libres está íntimamente relacionada con la facilidad en la donación de hidrógenos. De manera íntegra, los extractos etanólicos y acuosos de raíz de wereque, raíz de nopal y de la hoja de tronadora, son una fuente natural de antioxidantes (compuestos fenólicos y/o flavonoides) que pueden conservar la función de las células  $\beta$  previniendo la diabetes inducida por la formación de ROS (Durgeshnandani et al., 2014).

En conclusión, se hace evidente con las pruebas realizadas de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, que los extractos de la hoja de tronadora, presentan la mayor bioactividad con respecto a las demás plantas estudiadas (raíz de we-

	Concentración (ppm)	
	Agua	Etanol
Hoja de tronadora	181.64	85.55
Raíz de nopal	> 1000	> 1000
Raíz de wereque	> 1000	> 1000

Tabla 31. Comparativo de la capacidad de eliminación de radicales libres  $EC_{50}$ .

requé y raíz de nopal) tanto hipoglucemiante como antioxidante, por lo que se realizó una identificación de compuestos fenólicos mediante la técnica de HPLC.

### 6.5.8. Identificación de compuestos fenólicos

El cromatógrama que representa la identificación de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de la hoja de tronadora se muestra en la Figura 20, donde se identificó ácido cafeíco<sup>1</sup> a un tiempo de retención de 19.12 min y epicatequina<sup>2</sup> en 20.2 min.

Los compuestos fenólicos identificados en el extracto etanólico de la hoja de tronadora se presentan en la Figura 21, donde en función del tiempo de retención se evidencia la presencia del ácido ascórbico<sup>1</sup> (3.4 min), ácido cafeíco<sup>2</sup> (19.12 min) y epicatequina<sup>3</sup> (20.2 min).

Comparando los cromatogramas, es evidente que se extrajo una mayor cantidad de compuestos en el extracto etanólico pues se ha comprobado que el etanol altera la unión entre los disolventes y las matrices vegetales, favoreciendo así la identificación de compuestos fenólicos (Sahin & Samli, 2013). Confirmando

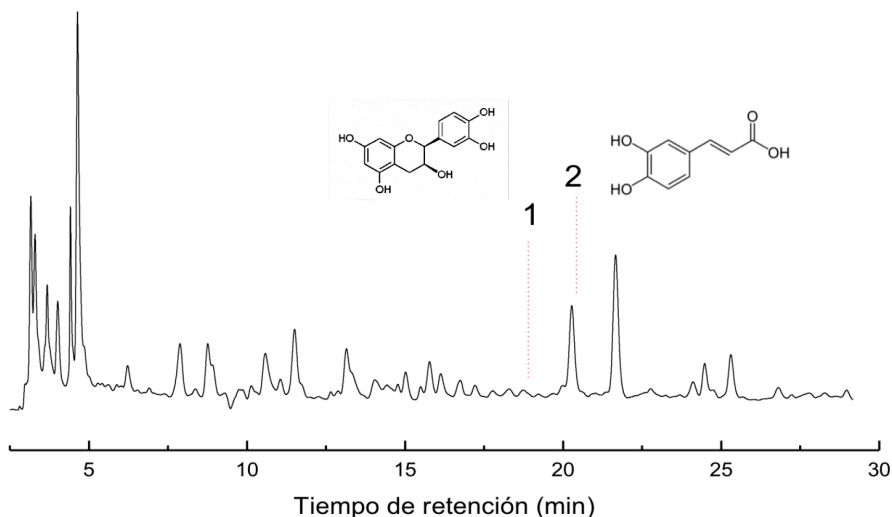


Figura 20. Identificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de la hoja de tronadora.

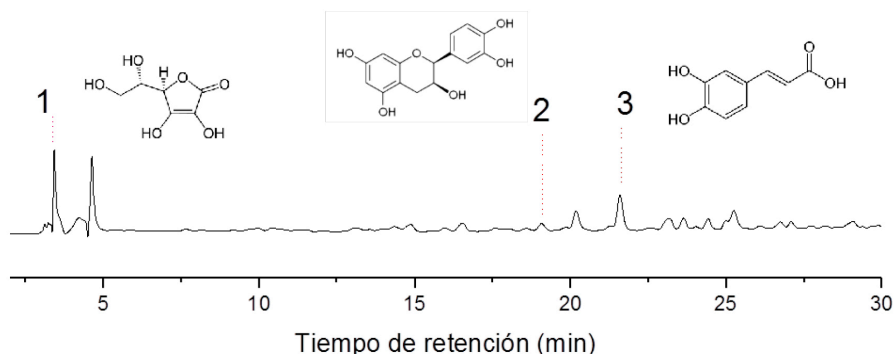


Figura 21. Identificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de la hoja de tronadora.

que existe una mayor presencia de ácidos fenólicos en el extracto etanólico de la hoja de tronadora, pues en éste, a diferencia del extracto acuoso, se identificó ácido ascórbico, a éste se le atribuyen propiedades antioxidantes (Halliwell, 1995 y Haruenkeit, Poovarodom & Vearasilp, 2011) debido a su fuerte poder reductor (Duran & Borja Padilla, 1993) con lo que se puede inferir que a mayor concentración de ácido ascórbico mayor es la actividad antioxidante del extracto.

De acuerdo a los resultados, el extracto etanólico de la hoja de tronadora puede ser un potencial antioxidante e hipoglucemiante por la vía enzimática, inhibiendo la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

## 6.6. Conclusiones

De manera íntegra, podemos decir que nuestros resultados apoyan aún más la opinión de que algunas plantas medicinales son fuentes prometedoras de antioxidantes naturales (flavonoides) que podrían conservar la función de las células  $\beta$  y de esta manera prevenir la formación de ROS y así los efectos de la DM-II.

- En la hoja de tronadora, raíz de nopal y raíz de wereque el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante difiere significativamente entre ellas.
- El mayor contenido de fenoles totales y de flavonoides se obtiene con los extractos etanólicos de la hoja de tronadora, confirmándose con las evaluaciones fitoquímicas donde se evidencia la presencia de estos compuestos.

- Existe una relación estrecha entre la capacidad antirradical y reductora de hierro.
- La evaluación *in vitro* demostró que el extracto de la hoja de tronadora con etanol como disolvente presentan la mayor actividad antioxidante.
- En la evaluación *in vitro* de actividad inhibitoria enzimática (hipoglucemiante) el extracto etanólico de la hoja de tronadora presentó los mejores resultados.
- Se comprobó la actividad hipoglucemiante de los compuestos fenólicos en los extractos etanólicos de la hoja de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal mediante la inhibición enzimática.
- La actividad antioxidante de la hoja de tronadora, raíz de nopal y raíz de wereque está íntimamente relacionada con la prevención DMII así como también contrarresta los efectos secundarios de ésta.
- De acuerdo a los resultados, el extracto etanólico de la hoja de tronadora puede ser un potencial antioxidante e hipoglicemiante por la vía enzimática, inhibiendo la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

## Referencias

- Adedayo, O., Ganiyu, O., Funmi, P., Tech, M., Sunday, I., & Opeyemi, B. (2015). Antioxidant properties of phenolics constituents from different varieties of *Corchorus spp.* *Journal of Taibab University Medical Sciences*, 10(3), 278-287. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2014.11.005>
- Alarcón, F., Calzada, F., Hernández, G., Ruiz, C., & Román, R. (2005). Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonorae* root extracts-II. *Journal of ethnopharmacology*, 97, 447-452. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.035>
- Achenbach, H., Horn, K., Dominguez, J., Rombold, C., & Gómez-López, E. (1993). Cucurbitanes and cucurbitae-type glycosides from *Ibervillea sonorae*. *Phytochemistry*, 33(2), 437-445. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85535-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85535-Y)



- Aguilar-Santamarina, L., Rámirez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C., & Herrera-Arellano, A. (2009). Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, 124 (2009) 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.033>
- Aguirre-Joya, J., De la Garza-Toledo, H., Zugasti-Cruz, A., Belmares-Cerda, R., Aguilar-Cristobal, N. (2013). The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 436-442. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60093-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60093-3)
- Ahmed, F. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in food and drinks. *Trends Anal Chem*, 20, 649. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00121-2)
- Argáez-López, N., Wachter, N., Kumate-Rodríguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera-Arce, E. et al. (2003). The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in México. *Diabetes care*, 26, 2470-2471. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.8.2470>
- Argueta, V. (1994). *Atlas of the traditional Mexican medicinal plants*. 1051-1052. México: National Indigenous Institute.
- Blancas, G. (2005). *Obtención del extracto y la fracción hipoglucemiante de la raíz de *Ibervillea sonorae**. Trabajo de servicio social. División de ciencias biológicas y de la salud.
- Barreira, J., Ferreira, C., Oliveira, B., & Pereira, J. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 107, 1106-1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>
- Benzie, I., & Strain, J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods of Enzymology*, 29, 15-27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2505-2512. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059>

- Branchet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P., & Veuthey, J.L. (2001). Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, 24, 865-873. [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20011101\)24:10/11<865::AID-JSSC865>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20011101)24:10/11<865::AID-JSSC865>3.0.CO;2-U)
- Brand-Williams, W., Cuveiler, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bravo-Solis, H., & Sánchez-Mejorada, H. (1991). *Las cáctecas de México* (Vol. 3). México: U. A. México, Ed.
- Cuevas-Quintero, A., & Brambila-Horta, B. (2003). *Química I*. México: Editorial Umbral. 137.
- Costantino, L., Raimondi, L., Pirisino, R., Brunetti, T., Pessotto, P., Giannessi, F., Lins, A., Barlocco, D., Antolini, L., & El-Abady, A. (2003). Isolation and pharmacological activities of the Tecoma stans alkaloids. *IL Farmaco*, 58, 781-785. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(03\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(03)00133-2)
- Dean, R., Hunt, J., & Wolff, S. (1988). Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes and aging. *Biochemical Journal*, 256, 205-212. <https://doi.org/10.1042/bj2560205>
- Gao, M., & Llu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoids from cultures cells of Saussurea medusa Maxim. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1461-1463. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-6809-1>
- Gray, D. (1995). Carbohydrate digestion and absorption-role of small intestine. *New England Journal of Medicine*, 29, 1225-1230.
- Halliwell, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of rheumatic diseases*, 54, 505-510. <https://doi.org/10.1136/ard.54.6.505>
- Haruenkeit, R., Poovarodom, S., & Vearasilp, S. (2011). Comparison of Bioactive Compounds, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Mon Thong Durian During Ripening. *Food chemistry*, 118 (3), 540-547.

- Hernández, E., Calzada, F., Román, R., & Alarcón, F. (2007). Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: isolation and hypoglycemic activity. *Planta medica*, 73, 236-240. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967117>
- Hernández, A. (2011). Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su evaluación biológica *in vitro e in vivo*. Intituto Politecnico Nacional.
- Hernández-Galicia, E., Calzada, F., Román-Ramos, R., & Alarcón-Aguilar, F. (2007). Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: isolation and hypoglycemic activity. *Planta Medica*, 73, 236-240. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967117>
- Hernández-Galicia, H., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaría, L., Román-Ramos, R., Chavez-Miranda, A., Garcia-Vega, L. et al. (2002). Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45, 118-124.
- Ibáñez-Camacho, R., & Roman-Ramos, R. (1979). Hypoglycemic effect of *Opuntia cactus*. *Arch Invest Med*, 10(4), 223-230.
- Jonhson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N. et al. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytitherapy Research*, 20, 250-255. <https://doi.org/10.1002/ptr.1820>
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plants extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
- Kwon, Y.-I., Vatter, D.A., & Shetty, K. (2006). Clonal herbs of Lamiaceae species against diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15, 107-118.
- Know, Y., Apostolidis, E., Kim, Y., & Shetty, K. (2007). Health Benefits of Traditional Corn, Beans, and Pumpkin: In vitro Studies for Hyperglycemia and Hypertension Management. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 266-275. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.234>

- Krentz, A., & Bailey, C. (2005). Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65, 385-411. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00005>
- Lakshmana-Senthil, S., Vinoth-Kumar, T., Geetharamani, D., Suja, G., Yesudas, R., & Chacko, A. (2015). Fucoidan- An  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to NIDDM. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 644-647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.065>
- Luque de Castro, M.D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383-2389.
- Maestro-Duran, R., & Borja-Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina. *Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C)*, 44(2), 107-111.
- Martins, R., Chan, C., Waddington, E., Veurink, G., Laws, S., Croft, K. et al. (1999). Beta-amyloid and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. En T. Basu, N. Temple, & M. Garg (Eds.). *Antioxidant in Human Health and Disease* (367-391). Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
- McCue, P., & Shetty, K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 101-106.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Norman, J., & Temple. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-259. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00138-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00138-X)
- Plantas medicinales de México (2011). Recuperado el 10 de Febrero de 2015 de *Plantas medicinales de México*. <http://plantasdemexico.blogspot.mx/2011/07/tronadora-tecoma-stans.html>

- Ranilla, L., Kwon, Y., & Apostolidis, E. (2010). Phenolic compounds antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Biosource Technology*, 101, 4676-4689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.093>
- Rivera, F., Escalona, G., Garduño, L., Galaviz, C., & Paniagua, N. (2011). Anti-obesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 1, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2011/968984>
- Sarmadi, B., Aminuddin, F., Hamid, M., Saari, N., Abdul-Hamid, A., & Ismail, A. (2012). Hypoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. *Food Chemistry*, 134, 905-911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.202>
- Shen, G., & Lee, H. (2003). Determination of triazines in oil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 985, 167. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01222-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01222-0)
- Shobana, S., Sreerama, Y.N., & Malleshi, N. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chem*, 115, 1268-1273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.042>
- Srinivasan, K. (2005). Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(6), 399-414. <https://doi.org/10.1080/09637480500512872>
- Veitch, N., & Grayer, R. (2008). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Products Reports*, 25, 555-661. <https://doi.org/10.1039/b718040n>
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Waterhouse, A. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 11.1.1-11.1.8.

- Winkelman, M. (1986). Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology*, 18, 109-131. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90024-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90024-3)
- Xolalpa-Molina, S. (1994). *Flora medicinal Mayo de la región de El Fuerte y Choix, Sinaloa*. México: Instituto Nacional Indigenista.