



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro Interdisciplinario de Investigación para
el Desarrollo Integral Regional



Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Estudio de Polifenoles con Propiedades Antioxidantes,
Hipoglucémicas e Hipocolesterolémicas a partir de
Subproductos Agroforestales

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

M. en C. Dulce Carolina Almonte Flores

Directoras de Tesis

Dra. Martha Rosales Castro

Dra. Norma Paniagua Castro

Victoria de Durango, Durango, julio del 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **27** del mes de **Julio** del año **2015** la que suscribe **Dulce Carolina Almonte Flores** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B110525**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Rosales Castro** y de la **Dra. Norma Paniagua Castro** y cede los derechos del trabajo titulado “**Estudio de polifenoles con propiedades antioxidantes, hipoglucémicas e hipocolesterolémicas a partir de subproductos agroforestales**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones **caroalmonte23@outlook.com**, **mrciidirdgo@yahoo.com** y **npaniag@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. EN C. DULCÉ CAROLINA ALMONTE FLORES

El presente trabajo que lleva por título “Estudio de Polifenoles con Propiedades Antioxidantes, Hipoglucémicas e Hipocolesterolémicas a partir de Subproductos Agroforestales” se realizó en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), Unidad Durango y en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, México, DF., bajo la dirección de la Doctora Martha Rosales Castro y la Doctora Norma Paniagua Castro. Se tuvo el apoyo de la beca escolar de CONACYT y fue parte de los proyectos SIP20144644, SIP20144111, SIP20140428 y SIP20130445, del Instituto Politécnico Nacional.

Índice

I. Lista de Figuras	VI
II. Lista de Cuadros	VII
III. Lista de acrónimos	VIII
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
4. Antecedentes	7
4.1 Plantas	7
4.1.1 Usos medicinales de plantas	7
4.1.2 Metabolitos secundarios de plantas	9
4.2 Compuestos Polifenólicos	10
4.2.1 Definición y clasificación	10
4.2.2. Flavonoides	11
4.2.3 No Flavonoides	15
4.3 Propiedades Biológicas de Compuestos Bioactivos	16
4.3.1 Propiedades Antioxidantes de Compuestos Fenólicos y Modulación de Estrés Oxidativo	18
4.3.2 Efecto Hipoglucémico de plantas	20
4.3.3 Efecto Hipocolesterolémico de plantas	26
4.4 Genotoxicidad	28
4.4.1 Ensayo cometa	29
5. Justificación	30
6. Objetivo	31
6.1 Objetivos específicos	32
7. Materiales y Métodos	33
7.1 Materia prima	33
7.2 Extracción de compuestos polifenólicos	33
7.3 Determinación de Fenoles Totales (FT)	34
7.4 Determinación de Flavonoides Totales (F)	34
7.5 Determinación de Proantocianidinas (P)	34

7.6 Determinación de la Actividad Antioxidante	35
7.6.1 Determinación de AA mediante la técnica de eliminación del radical DPPH (2,2'-difenilo-1-picrilhidracilo)	35
7.6.2 Determinación de AA por el Método de decoloración del β -caroteno	35
7.6.3 Determinación de AA mediante el Método del Óxido Nítrico (NO)	36
7.6.4 Determinación de AA Mediante la Eliminación del Radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzoline-6-sulfónico)	37
7.7 Evaluación del efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico <i>in vivo</i> en modelo murino	37
7.7.1 Animales de estudio	37
7.7.2 Evaluación de las propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas	38
7.7.3 Actividad hipoglucemiante	38
7.7.4 Efecto hipoglucémico	39
7.7.5 Efecto hipocolesterolémico	40
7.8 Evaluación de Estrés Oxidativo <i>in vivo</i>	40
7.8.1 Método de Lipoperoxidación Hepático	40
7.9 Evaluación de Genotoxicidad	41
7.9.1 Ensayo Cometa	41
8. Resultados y Discusión	44
8.1 Determinación de la concentración de FT	44
8.2 Determinación de AA	48
8.2.1 Determinación de AA mediante la Técnica de Eliminación del Radical DPPH	48
8.2.2 Determinación de AA mediante el Método de decoloración del β -caroteno	49
8.2.3 Determinación de AA mediante Método del Óxido Nítrico (NO)	51
8.2.4 Determinación de AA Mediante la Eliminación del Radical ABTS	51
8.3 Evaluación del Efecto hipoglucémico	55
8.3.1 Actividad hipoglucemiante	55

8.3.2 Efecto hipoglucémico	57
8.4 Evaluación del Efecto hipocolesterolémico	59
8.5 Evaluación del Estrés oxidativo <i>in vivo</i>	61
8.6 Evaluación de Genotoxicidad	63
9. Conclusiones	69
10. Referencias	71

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura típica de los flavonoides	11
Figura 2. Estructura químicas de flavonoides.	15
Figura 3. Principales sitios y mecanismos de los fármacos antidiabéticos.	24
Figura 4. Principales sitios y mecanismos de acción de plantas antidiabéticas.	26
Figura 5. Correlación entre FT y F, $R^2=0.92$, $N= 36$	45
Figura 6. Correlación Fenoles Totales (FT) y Actividad Antioxidante; a) DPPH-FT ($r^2=0.43$, $p<0.05$, $n=36$), b) β caroteno-FT ($r^2=0.18$, $p<0.05$, $n=36$), c) NO-FT ($r^2=0.25$, $p<0.05$, $n=36$) y d) ABTS-FT ($r^2=0.55$, $p<0.05$, $n=36$).	53
Figura 7. Curva de tolerancia a la glucosa de los extractos de estudio	56
Figura 8. Concentración de colesterol total. T: testigo; TTx: Testigo con Tiloxapol; EHS: <i>Eryngium heterophyllum</i> ; EN: <i>Juglans regia</i> , ECR: <i>Cedrela odorata</i>	59
Figura 9. Concentración de triglicéridos y colesterol HDL. T: testigo; TTx: Testigo con Tiloxapol; EHS: <i>Eryngium heterophyllum</i> EN: <i>Juglans regia</i> , ECR: <i>Cedrela odorata</i>	60
Figura 10. Concentración de MDA de muestras provenientes de la prueba de efecto hipocolesterolémico	61
Figura 11. Imágenes de la técnica del cometa de leucocitos de ratón administrados al grupo control negativo.	66
Figura 12. Imágenes de la técnica del cometa de leucocitos de ratón administrados con <i>J. regia</i> (400 X) a dosis de 100 y 200 mg/kg.	66
Figura 13. Imágenes de la técnica del cometa (400 X) de leucocitos de ratón con daño inducido con CPA.	67
Figura 14. Imágenes de la técnica del cometa de leucocitos de ratón administrados con <i>C. odorata</i> (400 X) a dosis de 100 y 200 mg/kg.	67

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de los Flavonoides	13
Cuadro 2. Nombre común, nombre científico, familia, parte de la planta y lugar de colecta de las nueve especies de estudio	33
Cuadro 3. Determinación de FT, F y P de plantas de estudio	47
Cuadro 4. Actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH en las especies de estudio	48
Cuadro 5. Actividad antioxidante mediante las técnicas β caroteno, NO y ABTS	50
Cuadro 6. Área Bajo la Curva (AUC) a partir de la Figura 7.	56
Cuadro 7. Niveles de Glucemia durante el tiempo de estudio (10 días) en Ratas Wistar	57
Cuadro 8. Niveles de MDA en muestras provenientes de la evaluación del efecto hipoglucémico	62
Cuadro 9. Evaluación de daño a DNA de los extractos de <i>Juglans regia</i> y <i>Cedrela odorata</i> mediante la técnica del cometa	64

Lista de acrónimos

AA	Activad antioxidante
ABTS	Radical ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzoline-6-sulfónico
Ac	Absorbancia del control
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
Am	Absorbancia de la muestra
ARL	Atrapamiento de radicales libres
AUC	Área bajo la curva
CAT	Catalasa
CF	Compuestos fenólicos
CPA	Ciclofosfamida
CT	Colesterol total
DPPH	Radical 2,2'-difenilo-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EC ₅₀	Concentración efectiva media
ECV	Enfermedad cardiovascular
ERN	Especies nitrógeno reactivas
ERO	Especies de oxígeno reactivas
F	Flavonoides
FT	Fenoles totales
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutation reducido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Kg	Kilogramos
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potasio
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mA	Miliamperes
MDA	Malondialdehido

Min	Minutos
mg	Miligramos
Mm	Milimol
M	Molar
ONOO-	Peroxinitrito
P	Proantocianidinas
ppm	Partes por millón
RL	Radicales libres
SNP	Nitroprusiato de sodio
SOD	Superoxido dismutasa
TBAR	Ácido tiobarbiturico
TBARs	Método del ácido tiobarbiturico
TCA	Ácido tricloroacetico
Tx	Tiloxapol
V	Voltios
Vol	Volumen

1. Resumen

En el presente trabajo de investigación se realizó el estudio de compuestos fenólicos (CF) y su relación con las propiedades antioxidantes, hipoglucémicas e hipocolesterolémicas de nueve especies de plantas provenientes de residuos agroforestales. Con el propósito de aprovechar y dar un valor agregado a estos subproductos, de los cuales se conoce su uso en medicina tradicional en diversos países, sin embargo el estudio de sus propiedades antioxidantes y biológicas en México es limitado. **Materiales y Métodos:** El material de estudio incluyó la cáscara de *Nephelium lappaceum* (rambutan), *Garcinia mangostana* (mangostan) y *Punica granatum* (granada), las hojas de *Arctostaphylos pungens* (pingüica) y *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) así como las cortezas de *Mangifera indica* L. (mango) Var. *Manila* y Var. *Tommy Atkins*, *Juglans regia* (Nogal) y *Cedrela odorata* L. (cedro rojo). Se obtuvieron extractos fenólicos utilizando como solventes agua, etanol 96%, etanol 70% y acetato de etilo. La evaluación de CF se realizó mediante la evaluación de fenoles totales (FT), flavonoides (F) y proantocianidinas (P). La actividad antioxidante (AA) se evaluó por cuatro métodos diferentes; 1) DPPH (2,2'-difenilo-1-picrilhidracilo), 2) Método de decoloración del β -caroteno, 3) Método del Óxido Nítrico (NO) y 4) ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzoline-6-sulfónico). El efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico de los extractos de plantas se realizó en dos modelos murinos por las pruebas curva de tolerancia a la glucosa y tiloxapol respectivamente. Los extractos que mostraron mayor actividad hipoglucemiante en la curva de tolerancia a la glucosa fueron *Juglans regia* (Nogal) y *Cedrela odorata* L. (cedro rojo) y posteriormente se evaluó su efecto en ratas Wistar con diabetes tipo I, inducida previamente con estreptozotocina, se administró el extracto en una dosis de 200 mg/kg de peso durante 10 días, monitoreando los niveles de glucosa y comparando contra un grupo control. 3) Efecto hipocolesterolémico se midió con extractos con mayor actividad hipoglucemiante y con *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo), se probaron en modelo de ratones macho (NIH CD1) con hipercolesterolemia inducida por tiloxapol, la dosis del extracto fue de 100 mg/kg por vía oral. Se evaluó el perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos), comparando con un grupo testigo. El efecto genotóxico se midió

mediante la técnica del cometa, el cual es un método que determina el nivel de daño al ADN.

Resultados: Se obtuvieron valores de FT en el rango de 86.3 ± 21.1 a 577.3 ± 24.9 mg EAG/ g de extracto, que corresponden el valor menor al extracto de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) y el valor mayor al extracto de *Juglans regia* (nogal). De acuerdo al análisis de varianza realizado se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre los valores de FT con respecto al método de extracción y a la especie de estudio. Se encontró correlación significativa ($p < 0.05$) entre los FT y la AA mediante los cuatro métodos evaluados, para todos los extractos. Las especies que mostraron mayor actividad hipoglucemiante fueron *Juglans regia* (Nogal) y *Cedrela odorata* L. (cedro rojo), al obtener los valores más bajos de Área Bajo la Curva AUC 88.8 ± 5.8 y 94.3 ± 17.2 (g/L min), obtenidos a partir de graficar glucosa contra tiempo.

En cuanto al efecto hipocolesterolémico los resultados mostraron que los extractos bajaron los niveles de colesterol total (CT) al mismo nivel de los animales, que no se les administró tiloxapol (grupo control), y sus valores de CT fueron significativamente diferentes del grupo con tiloxapol ($p < 0.05$). Para los niveles de triglicéridos y colesterol HDL no se observó ninguna diferencia contra los grupos control (con y sin tiloxapol). Con el objeto de ver la relación entre el efecto hipoglucemiante con la concentración de FT y AA se realizó una correlación entre FT y AUC, FT y CT, AUC y AA, el coeficiente de correlación no fue significativo. Por otra parte se evaluó el efecto genotóxico de los extractos que mostraron tener propiedades farmacológicas *in vivo* y se encontró que los dos extractos evaluados (*C. odorata* y *J. regia*) no provocaron daño a nivel de ADN en células de ratones administradas las dosis probadas fueron 100 y 200 mg/kg de los dos extractos.

2. Abstract

In this research the study of phenolic compounds (CF) and its relationship with the antioxidant, hypoglycemic and hypocholesterolemic properties of nine species of plants from agro-forestry waste is made. In order to take advantage and give added value to these products, which use in traditional medicine in different countries is known, however the study of active compounds and properties in Mexico is limited.

Materials and Methods: The study material included peel *Nephelium lappaceum* (rambutan), *Garcinia mangostana* (mangosteen) and *Punica granatum* (pomegranate), the leaves of *Arctostaphylos pungens* (Pingüica) and *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) and barks of *L. Mangifera indica* (mango) Var. *Manila* and Var. *Tommy Atkins*, *Juglans regia* (Walnut) and *Cedrela odorata* L. (red cedar). Phenolic extracts were obtained using as solvents water, 96% ethanol, 70% ethanol and ethyl acetate. The CF evaluation was performed by evaluating total phenols (FT), flavonoids (F) and proanthocyanidins (P). The antioxidant activity (AA) was evaluated by four different methods; 1) DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), 2) Method of β -carotene bleaching, 3) Method of Nitric Oxide (NO) and 4) ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid). The effect hypoglycemic and hypocholesterolemic of plant extracts effect was conducted in two murine models for the testing curve glucose tolerance and tyloxapol respectively. The extracts showed greater hypoglycemic activity in the curve of glucose tolerance were *Juglans regia* (walnut) and *Cedrela odorata* L. (red cedar) and later its effect was evaluated in Wistar rats with type I diabetes, previously induced with streptozotocin, administered in a dose of 200 mg / kg for 10 days, monitoring glucose levels and comparing against a control group. 3) Hypocholesterolemic effect was measured with extracts that showed more hypoglycemic activity and *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo), were tested in model of male mice (NIH CD1) with hypercholesterolemia induced by tyloxapol, extract dose was 100 mg / kg orally administered. Was evaluated the lipid profile (total cholesterol, HDL and triglycerides, compared to a control group). The genotoxic effect was measured by comet assay, which is a method that determines the level of DNA damage.

Results: FT values were obtained in the range of 86.3 ± 21.1 to 577.3 ± 24.9 mg EAG / g of extract, corresponding to the lowest value *Eryngium heterophyllum* extract (hierba del sapo) and greater value to *Juglans regia* extract (walnut). According to the variance analysis it performed ($p < 0.05$) between the values of FT on the method of extraction and the kind of study found. Significant correlation ($p < 0.05$) was found between the FT and AA by the four methods evaluated for all extracts. The species that showed higher hypoglycemic activity were *Juglans regia* (Walnut) and *Cedrela odorata* L. (red cedar), to obtain the lowest values of area under the curve AUC 88.8 ± 5.8 and 94.3 ± 17.2 (g / L min) obtained by plotting glucose versus time. As for the hypocholesterolemic effect the results showed that the extracts lowered levels of total cholesterol (TC) at the same level of animals, which are not administered tyloxapol (control group), and CT values were significantly different from group tyloxapol ($p < 0.05$). For triglyceride and HDL cholesterol it was observed no difference against the control groups (with and without tyloxapol). In order to see the relationship between blood glucose lowering effect with the concentration of FT and FT AA correlated and AUC, FT and CT, AUC and AA performed the correlation coefficient was not significant. Moreover the genotoxic effect of extracts shown to have pharmacological properties *in vivo* and found that the two extracts tested (*C. odorata* and *J. regia*) level did not cause damage to DNA in mouse cells was evaluated administered doses tested were 100 and 200 mg / kg.

3. Introducción

Desde la época prehistórica las plantas han sido la base para las terapias medicinales, así como en la actualidad para la elaboración de medicamentos sintéticos (Alves *et al.*, 2014; Matić, *et al.*, 2013). El beneficio de las plantas está relacionado a los metabolitos secundarios que éstas producen, los cuales les sirven como defensa contra infecciones y lesiones. Este efecto preservativo de las plantas, vegetales, frutas y especies se debe a la presencia de constituyentes antioxidantes y antimicrobianos en sus tejidos. En un gran número de estudios se ha reportado que estos compuestos tienen beneficios para la salud. Por lo que se ha incrementado considerablemente el interés en encontrar antioxidantes naturales para uso en alimentos o en medicamentos para reemplazar el uso de antioxidantes sintéticos, los cuales han sido restringidos debido a que producen efectos secundarios (Rababah *et al.*, 2010).

Las Industrias agro-forestal generan subproductos y residuos, los que están constituidos principalmente por los tallos, raíces, hojas, cortezas, cáscaras, semillas u otras partes de las plantas que no son utilizadas en los procesos y que plantean graves problemas ambientales. La valorización de estos residuos es reconocida como una opción para la reducción de la carga contaminante de los materiales y una oportunidad para el desarrollo de nuevos productos naturales. Una de las opciones de mayor valor es la recuperación eficiente de los fitoquímicos fenólicos bioactivos, que se producen ampliamente en estos residuos (Amyrgialak *et al.*, 2014; Balasundram *et al.*, 2006; Gañan *et al.*, 2004; Kadirvelu *et al.*, 2003; Reed y Williams, 2003; Schieber *et al.*, 2001; Shah, *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos en las plantas son una parte esencial de la dieta humana, y son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos poseen un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo y sus estructuras pueden variar desde la de una molécula fenólica sencilla a la de un polímero de alto peso molecular compleja. Muchas plantas contienen grandes cantidades de polifenoles, los cuales juegan un papel importante en la adsorción y neutralización de radicales libres o en la descomposición de peróxidos. Estos compuestos han

sido estudiadas y propuestas para la protección contra la oxidación y estrés oxidativo (Lin & Weng, 2006; Rababah *et al.*, 2010).

Para el control de la sobreproducción de ROS, las células se protegen contra el estrés oxidativo mediante mecanismos antioxidantes de desintoxicación dentro del mismo organismo, los cuales incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como las vitaminas A, C y E (Vieira *et al.* 2011). Así mismo se ha reportado que la ingesta de compuestos activos de plantas disminuye los efectos causados por las ERO.

En el presente trabajo de investigación se evaluó la concentración de polifenoles, incluyendo fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas en nueve especies vegetales, tres de ellas provenientes de frutos: cáscaras de *Nephelium lappaceum* (rambutan), *Garcinia mangostana* (mangostan) y *Punica granatum* (granada), cuatro cortezas: *Mangifera indica* L. (mango) Var. *Manila* y *Mangifera indica* L. (mango) Var. *Tommy Atkins*, *Juglans regia* (Nogal) y *Cedrela odorata* L. (cedro rojo), así como las hojas de *Arctostaphylos pungens* (pingüica) y *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo). Se evaluó su actividad antioxidante, el efecto hipoglucémico, efecto hipocolesterolémico y genotóxico de sus extractos polifenólicos, con la finalidad de investigar y/o verificar sus propiedades biológicas, así como sugerir su aprovechamiento al tratarse de subproductos sin uso actual. Lo anterior nos permitirá generar conocimiento científico acerca de las propiedades benéficas de estos productos agroforestales y un valor agregado a estos materiales.

4. Antecedentes

4.1 Plantas

4.1.1 Usos medicinales de plantas

Las plantas son reconocidas universalmente como una parte vital del mundo, son suministro de nuestras necesidades básicas como alimentos, fibras, combustible, y muchos medicamentos importantes (Suaib *et al.*, 2009). Las plantas han sido utilizadas por la medicina desde tiempos inmemorables debido a que ellas han suplido las necesidades personales, ya que son de fácil acceso y económicas (Thakur *et al.*, 2010).

Los sistemas tradicionales de la medicina de varios países dependen de las plantas medicinales para su preparación. La búsqueda para tratamientos médicos basados en medicina alternativa se ha incrementado significativamente, haciendo así el conocimiento de plantas usadas comúnmente en medicina folklórica extremadamente importante (Matić *et al.*, 2013). La medicina herbal ha empleado por siglos para el tratamiento de varias enfermedades de humanos y animales (Alves *et al.*, 2014; Thakur *et al.*, 2010).

Actualmente se busca que los tratamientos médicos sean menos invasivos y más profilácticos, por lo que se están haciendo estudios para obtener fuentes alternativas para la obtención de moléculas terapéuticas. Dado que los fármacos convencionales a menudo no son preventivos, la medicina alternativa y complementaria ha sido reevaluada por profesionales médicos como terapias potenciales. Los estudios clínicos de la medicina herbaria como medicina alternativa demuestran las pruebas que apoyan su eficacia empírica. Hoy en día se ha reportado que la ingesta de compuestos bioactivos a partir de diferentes alimentos funcionales o nutracéuticos que contienen partes o extractos de plantas pueden aliviar o prevenir enfermedades (Shoji & Nakashima, 2004).

Basados en el conocimiento etnofarmacológico antiguo, los médicos alemanes recetan medicamentos a base de hierbas para tratar enfermedades comunes (Wagner 1999). Japón, China, Corea del Sur e India son líderes en el uso y en la investigación de alimentos funcionales y el uso de plantas, en los países mediterráneos, como Grecia, Italia, Francia, España y Portugal, las tradiciones nutricionales han sido asociadas con una vida saludable y para contrarrestar el envejecimiento (Ferrari, 2004).

En México se tiene una gran diversidad botánica y un amplio uso de medicina tradicional basada en herbolaria, más del 90% de la población general usan plantas medicinales en prácticas comunes para el tratamiento empírico de varias enfermedades (Castro *et al.*, 2011).

Las plantas juegan un papel importante en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos y han recibido mucha atención por ser fuente de sustancias biológicas activas, que incluyen agentes con propiedades antioxidantes (Bansal *et al.*, 2012, Nithiyantham *et al.*, 2013, Badami *et al.*, 2003), anticancerígenas (Fisher *et al.*, 2011; Pavanato *et al.*, 2007); hipoglucémicas (Yamini Dixit y Anand Kar 2010; Rauter *et al.*, 2010) e hipolipidémicas (Bansal *et al.*, 2012).

Las propiedades terapéuticas son principalmente atribuidas al metabolismo secundario que producen las plantas (Nithiyantham *et al.*, 2013). La protección de plantas medicinales contra enfermedades es atribuida a fitonutrientes naturales; como los polifenoles, flavonoides, fenilpropanoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferol y carotenoides (Yi *et al.*, 2006).

Los polifenoles constituyen sustancias activas encontradas en la mayoría de las plantas medicinales. Estos modulan la actividad de un amplio rango de enzimas y receptores celulares. Estas moléculas son metabolitos secundarios de plantas y generalmente están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta y agresión por patógenos (Manach *et al.*, 2013).

4.1.2 Metabolitos secundarios de plantas

Las plantas destinan una cantidad importante del carbono asimilado y de su energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas conocidos como metabolitos secundarios. Estos compuestos se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, por lo general su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Avalos y Pérez-Urria, 2009). De esta manera, algunos metabolitos secundarios tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, que actúan como repelentes, proporcionan a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por las modificaciones químicas a una estructura básica originada por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, epoxidación, metilación, malonización, esterificación y glucosilación. Esta variedad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales, estos tienen un importante valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica y agroquímica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, entre otros. Los metabolitos secundarios ofrecen algunos beneficios muy importantes para la salud y tratamiento de enfermedades de los humanos (Avalos y Pérez, 2009; Rababah *et al.*, 2010). Hasta la fecha, se han identificado más de 100,000 metabolitos secundarios en plantas (Dixon, 2001). Sin embargo, se considera que el potencial que ofrece el reino vegetal como fuente de compuestos potencialmente útiles no ha sido suficientemente aprovechado, ya que sólo un

limitado porcentaje de las 270.000 especies de plantas superiores conocidas han sido investigadas en cuanto a sus compuestos activos. Los metabolitos secundarios de las plantas se pueden clasificar en cuatro grupos principales, en base a sus orígenes biosintéticos y su composición química (Rao y Rafishankar, 2002; Taiz *et al.*, 2006):

- 1) Terpenos: en los que se encuentran aceites esenciales y hormonas
- 2) Compuestos fenólicos o polifenoles, como flavonoides, lignina y taninos
- 3) Glicósidos, como saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos
- 4) Compuestos que contienen nitrógeno o alcaloides.

4.2 Compuestos Polifenólicos

4.2.1 Definición y clasificación

Los compuestos fenólicos se encuentran de forma natural en plantas (Lule y Xia, 2005), los cuales tienen diversas funciones entre las que incluyen la pigmentación de hojas y frutas, para atraer o repeler insectos y para la protección de las plantas contra herbívoros, además contribuyen a los atributos sensoriales de plantas y frutas (Poyrazoglu *et al.*, 2002).

Las plantas, frutas, vegetales, hojas, semillas, flores y raíces son una rica fuente de compuestos fenólicos (Nichenametla *et al.*, 2006).

Los fenólicos son un grupo de compuestos orgánicos con uno o más grupos carboxilos sobre un anillo y/o anillos aromáticos. Estos compuestos son clasificados en varios grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales (Manach *et al* 2013). Su rango es desde un simple fenol, hasta compuestos complejos conocidos como polifenoles. Existen dos principales grupos de polifenoles, los flavonoides y los no flavonoides. El grupo de los flavonoides comprenden los compuestos con una estructura C6-C3-C6: flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, antocianidinas, isoflavonas y proantocianidinas. El grupo de los no flavonoides se clasifica de acuerdo al número de carbonos que poseen y comprenden los siguientes subgrupos: fenoles simples,

ácidos benzoicos, taninos hidrolizables, acetofenonas, ácidos fenilacéticos y cinámicos, coumarinas, benzofenonas, xantonas, estilbenos, chalcones, lignanos y secoiridoides (De la Rosa *et al.*, 2010).

4.2.2. Flavonoides

Los flavonoides son el grupo más abundante presente en el reino vegetal constituidos típicamente de un heterociclo de seis miembros. Los flavonoides tienen tres anillos A-, B- y C, y típicamente se representan con el anillo A en el lado izquierdo Figura 1, (Vermerris & Nicholson 2006). Los flavonoides son componentes importantes de la dieta humana. La ingesta de flavonoides puede variar entre 50 y 800 mg / día, dependiendo del consumo de verduras y frutas (Seyoum *et al.*, 2006).

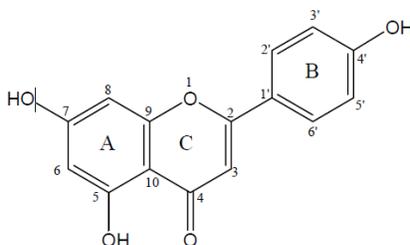


Figura 1. Estructura típica de los flavonoides

Los flavonoides en plantas usualmente se encuentran en forma glicosilada con glucosa o ramnosa pero otros azucares también están involucrados (xilosa, galactosa, arabinosa, ácido glucorónico). El número de grupos glicosilo varia de uno a tres unidades principalmente (De la Rosa *et al.*, 2010). Pueden dividirse en 6 subclases como una función del heterociclo involucrado Cuadro 1. (Manach *et al.*, 2013):

- Flavonoles
- Flavonas
- Isoflavonas
- Flavanonas
- Antocianidinas
- Flavanoles (catequinas y proantocianidinas)

Los flavonoles son los principales flavonoides en los alimentos, la quercetina y el Kaempferol son los más representativos (Figura 2), generalmente se encuentran en un rango de 15-30 mg/kg de fruta fresca, las principales fuentes son las cebollas, brócoli y arándanos. El vino tinto y el té contienen arriba de 45 mg de flavonoles/L. Los flavonoles se acumulan en tejidos aéreos (piel y hojas) debido a que su biosíntesis es estimulada por la luz. Las flavonas son menos comunes en frutas y vegetales. Los flavonoles consisten principalmente de glucósidos de luteolina y apigenina. Los cereales como avena y trigo contienen C-glicosidos de flavones. La cascara de frutas cítricas contienen grandes cantidades de flavones polimetoxilados: tangeretina, nobiletina y sinensetina.

En fuentes de alimentos, las flavanonas son encontradas en tomates y ciertas plantas aromáticas como menta, y están presentes en grandes concentraciones solo en frutas cítricas. Las flavanonas son generalmente glicosiladas por disacáridos en posición 7, como neohesperidina, la cual imparte un mejor sabor por ejemplo naringinina en toronjas (Manach *et al.*, 2013).

Es difícil conocer el número exacto de flavonoides, sin embargo se han reportado entre 2,000 y 6,500. Estos compuestos han estado bajo investigación activa en años recientes por sus posibles efectos benéficos a los humanos (De la Rosa *et al.*, 2010).

Muchos estudios han sugerido que los flavonoides presentan actividades biológicas que incluyen las siguientes antialérgicas, antivirales, anti-inflamatorias, hepatoprotectoras, antioxidantes, antitrombóticas, vasodilatadoras y actividades anticancerígenas. Sin embargo la de mayor interés es su actividad antioxidante, debido a su capacidad para reducir la formación y eliminación de radicales libres (Seyoum *et al.*, 2006). Se ha reportado un efecto sinérgico entre los flavonoides y algunas vitaminas, sin embargo hay pocos estudios enfocados sobre las interacciones flavonoide-flavonoide en términos de actividad antioxidante (Hidalgo *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Clasificación de Flavonoides

Subgrupos	Principales Flavonoides
Flavonas	Luteolina-5- <i>O</i> -glucosido (5- <i>O</i> -glucosido,7,3',4'-OH) Luteolina (5,7,3',4'-OH) 7,8-Dihydroxyflavona (7,8-OH) 8-Hidroxiacetina (5,7,8-OH, 4'-OMe) Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido (7- <i>O</i> -glu, 5, 3',4'-OH) Cosmosiina (7- <i>O</i> -glucoside-5,4'-OH) 8-Hidroxiflavona (8-OH) Vicenin-2 (6,8- <i>C</i> -glucoside,5,7,4'-OH) 4'-Metoxi-3,6,8-tricloro-5,7-dihidroxiflavona (3,6,8-Cl,5,7-OH, 4'-OMe) 5,7-Dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona (5,7-OH,3',4'-OMe) Diosmina (7- <i>O</i> -rutinoside,5,30-OH,4'-OMe) Apigenina (5,7,4'-OH) Diosmetina (5,7,3'-OH,4'-OMe) Acacetin (5,7-OH,4'-OMe) 5-Hidroxi-3',4',7-trimethoxiflavona (5-OH,7,3',4'-OMe) 7-Hidroxi-5-metil-4'-methoxiflavona (5-Me,7-OH,4'-OMe) 3',4'-Dimethoxi-5-hidroxi-7-metilflavona (5-OH,7-Me,3',4'-OH) 6-Hidroxiflavona (6-OH) 7-Hidroxiflavona (7-OH)
Flavanonas	Taxifolina (3,5,7,3',4'-OH) Hesperetina (5,7,30-OH,4'-OMe) Hesperidina (7- <i>O</i> -rutinoside, 5,3'-OH,4'-OMe) Naringenina (5,7,4'-OH) Naringina (5,4'-OH,7- <i>O</i> -neoesperidosida) 4'-Methoxy-3,6,8-tricloro-5,7-dihidroxiflavanona (3,6,8-Cl,5,7-OH,4'-OMe)
Flavonoles	Quercetagetina (3,5,6,7,30,4'-OH) Rutina (3-rutinoside,5,7,30,4'-OH) Isoquercetrina (3- <i>O</i> -glucoside,5,7,3',4'-OH) Hiperósido (3- <i>O</i> -galactoside,5,7, 3',4'-OH) Quercetina (3,5,7,30,4'-OH) Robinetin (3,7,3',4',5'-OH) Ramnetina (3,5,3',4'-OH,7-OMe) Fisetina (3,7,3',4'-OH) Quercetina 3,5-di- <i>O</i> -glucoside (3,5- <i>O</i> -glucoside,7,3',4'-OH) Morin (3,5,7,2',4'-OH) Kaempferol (3,5,7,4'-OH) Galangina (3,5,7-OH) Quercetina 3,7,3',4'-tertar methyl eter (5,-OH,3, 7,3',4'-OMe) Kaempferol 3,5-di- <i>O</i> -glucoside (3,5- <i>O</i> -glucoside,7,4'-OH) 3-Hidroxiflavona (3-OH) Pentametoximorin (3,5,7,2',4'-OH) Pentametoiquercetina (3,5,7,3',4'-OMe)

Isoflavonas	Daidzeína 7-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4H- 1-benzopiran-4-ona Genisteína 5,7- dihidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4H- 1-benzopiran-4-ona
Antocianinas	Cianidina 3,5,7,3',4'-Pentahidroxi-2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-1-Benzopirilium Delfinidina 2-(3,4,5-trihidroxifenil) chromenilium-3,5,7-triol Malvidina 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hidroxi- 3,5-dimethoxifenil) cromenium Pelargonidina 2-(4-Hydroxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol Peonidina 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)cromenilium-3,5,7-triol Petunidina 2-(3,4-dihidroxi-5-metoxifenil)-3,5,7-trihidroxicromenilium
Flavan-3-ol	(-)-Epicatequina (3,5,7,3',4'-OH) (+)-Catequina (3,5,7,3',4'-OH)
Flavonoles/ Proantocianidinas	Esteres de ácido gálico monómeros , dimeros (procianidina B1 y B2) y oligómeros

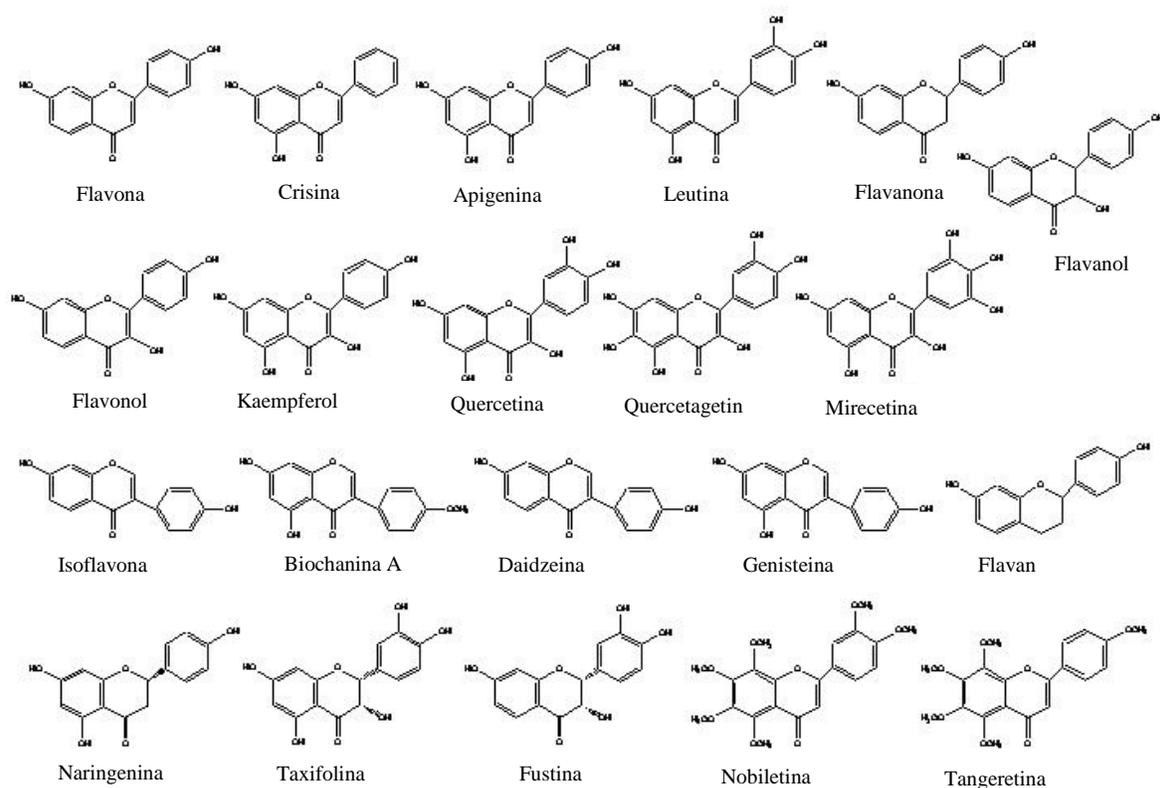


Figura 2. Estructuras químicas de flavonoides.

4.2.3 No Flavonoides

Son fenoles simples (C6) y el grupo más simple, se forma con un anillo aromático sustituido con un alcohol en una o más posiciones, ya que pueden tener algunos grupos sustituyentes, tales como cadenas alcohólicas en su estructura. La nomenclatura *ortho*, *meta* y *para* se refiere a un patrón de sustitución del anillo de benceno 1,2-, 1,3- y 1,4-, respectivamente, donde en este caso uno de los grupos funcionales es el grupo hidroxilo (Vermeris & Nicholson, 2006).

Los ácidos fenólicos (C6-C1) con la misma estructura que los fenoles simples tienen un grupo carboxilo enlazado al benceno (De la Rosa *et al.*, 2010). Dos clases de ácidos fenólicos pueden ser distinguidos: derivados de ácido benzoico y derivados de ácido cinámico (Manach *et al.*, 2013).

Los ácidos hidroxicinámicos están incluidos en el grupo de los fenilpropanoides (C6-C3). Se forman con un anillo aromático y una cadena de tres carbonos. Hay cuatro estructuras básicas: los ácidos cumárico, cafeíco, ferúlico y ácidos sináptico. En la naturaleza se asocian generalmente con otros compuestos como el ácido clorogénico, que es el enlace entre el ácido cafeíco y el ácido quínico (De la Rosa *et al.*, 2010; Vermerris & Nicholson, 2006). Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzóicos y consisten principalmente en ácidos p-coumáricos, cafeícos, ferúlicos y sinápticos. Los tipos de frutas que contienen la mayor cantidad de estos compuestos son arándanos, kiwis, cerezas y manzanas que contienen de 0.5-2.0 g de ácidos hidroxicinámicos/ kg de peso fresco (Manach *et al.*, 2013).

Las cumarinas pertenecen a un grupo de compuestos conocidos como los benzopironas, que consisten en un anillo de benceno unido a una pirona. También se pueden encontrar en la naturaleza, en combinación con azúcares, como glucósidos. Se pueden clasificar como furanocoumarinas simples, piranocoumarinas y cumarinas sustituidos en el anillo pirona. Hay numerosas cumarinas, muchas de las cuales desempeñan un papel en la resistencia a enfermedad y a las plagas, así como tolerancia a la luz UV.

4.3 Propiedades Biológicas de Compuestos Bioactivos

La correlación entre la ingesta de compuestos fenólicos y los efectos en la salud ha sido reportada en diversos estudios epidemiológicos (Arai *et al.*, 2000; Artés *et al.*, 2000; Boker *et al.*, 2002, Nithiyanantham *et al.*, 2013).

Numerosos estudios han sugerido que estos compuestos tienen efectos protectores contra enfermedades crónicas y degenerativas (Heinonen *et al.*, 1993; Record *et al.*, 2001; Nithiyanantham *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos, tienen la habilidad para actuar como antioxidantes, lo cual afecta a los radicales libres y a la peroxidación los cuales están relacionados

con inflamaciones crónicas, aterosclerosis y cáncer (Lule & Xia, 2005), también pueden inhibir la mutagénesis y la carcinogénesis (Nichenametla *et al.*, 2006; Tzulker, *et al.*, 2007)

Los flavonoides como otros compuestos fenólicos son excelentes eliminadores de RL debido a que son altamente reactivos como donadores de hidrógenos y electrones. Diversos estudios acerca de la relación entre la actividad de eliminación de RL y la estructura química han señalado la importancia del número y la ubicación de los grupos OH presentes para la efectividad de eliminación de RL. Se ha observado un incremento en la actividad de atrapamiento de radicales libres (ARL) que depende principalmente sobre la ubicación y/o patrón de hidroxilación más que del número de grupos OH. Este efecto de los sustituyentes hidroxilo sobre la actividad de eliminación de RL, podría ser debido a uno o ambos de los siguientes fenómenos cinéticos o termodinámicos:

- 1) Como fuente de átomos de hidrogeno en la neutralización de radicales
- 2) Alteración de la estabilidad de un radical flavonoide formado por la abstracción de un átomo de hidrógeno de otro grupo hidroxilo

Un ejemplo de la efectividad de ARL ocurre cuando los grupos catecol se encuentran en el anillo A como en el caso de 7,8-dihidroxi flavona y 8-hidroxiacetina. También se puede ver claramente que en flavonoides glicosidados, la ARL es debido a las partes agliconas y la presencia de azúcares (tanto cualitativa como cuantitativamente). Así mismo las altas y cercanas ARL de los flavonoides con ciertas características similares como son grupos 3-OH, 3',4'-diOH, 3',4',5'-triOH ó 7,8-diOH se tomó como una indicación de que el sitio principal de la actividad podría ser asignada a alguna parte de la estructura flavonoide. En otras palabras los flavonoides con un sitio activo similar podrían exhibir al menos un cierto rango de variación que no afecta a su actividad significativamente. Por ejemplo la rutina, hiperosida, isoquercitrina, luteolina, luteolina 5-O-glucosido, luteolina 7-O-glucosido, (+)-catechin, (-)-epicatequina, taxifolina y quercetina 3,5-di-O-glucosido son altamente activas y tienen una cosa en común, la cual es 3',4'-

diOH, sin embargo su anillo A y/o C muestran variaciones considerables. Otra observación similar es en valores de IC₅₀ relativamente altos y estrechos de 7,8-dihidroxi flavona y 8- hidroxiaacetina, que poseen el grupo 7,8-diOH en común (Seyoum *et al.*, 2006).

4.3.1 Propiedades Antioxidantes de Compuestos Fenólicos y Modulación de Estrés Oxidativo

El Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencia define a un “antioxidante” como una sustancia en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de especies reactivas como son especies de oxígeno y nitrógeno reactivas, sobre las funciones fisiológicas normales (Seeram, *et al.*, 2008).

El estrés oxidativo es causado por un balance desfavorable entre especies reactivas de oxígeno ERO y las defensas antioxidantes endógenas (Vieira *et al.*, 2011; Dalle *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2010). Las ERO son generadas durante el metabolismo celular, como resultado de varios factores medioambientales, así como también de procesos patológicos (Vieira *et al.*, 2011; Badami *et al.*, 2003). El metabolismo del cuerpo y uso normales de oxígeno, tal como la respiración, y algunas funciones inmunes mediadas por células producen continuamente ERO (Chang *et al.*, 2012). Estas especies juegan importantes funciones fisiológicas y puede causar extenso daño celular. El balance entre las funciones fisiológicas y el daño es determinado por velocidades relativas de formación y eliminación de ERO. Este desequilibrio puede afectar componentes celulares mayores que incluyen lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN, este fenómeno está asociado al desarrollo de enfermedades (Dalle *et al.*, 2011). Por ejemplo el papel de los ERO en la patogénesis del cáncer es que estas especies reaccionan con el ADN que resulta en un mal funcionamiento celular (Khonkarn *et al.*, 2010). Los niveles altos de radicales libres causa daño en proteínas celulares en la membrana y en los lípidos y eventualmente muerte de la célula (Tabak *et al.*, 2011). Otras especies que facilitan al estrés oxidativo son los

radicales libres RL, los cuales poseen en el último orbital un electrón no apareado, por lo que son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en componentes altamente reactivos y oxidantes.

Para equilibrar la respuesta oxidante, el organismo vivo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato incluyendo lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN. De éstos podemos destacar a las enzimas antioxidantes intracelulares superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT); así como diversos componentes plasmáticos como: glutatión oxidado y reducido, bilirrubina, ácido úrico y albúmina, además de las vitaminas antioxidantes A, C y E, los minerales selenio y zinc, y las hormonas, melatonina, dehidroepiandrosterona y estrógenos (Tabak *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2004).

En condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de ERO en la célula y su actividad es precisamente regulada, de aquí que el equilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo.

Se han propuesto una gran variedad de marcadores biológicos para evaluar el estrés oxidativo, cuyos indicadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por RL o la generación de RL *in vivo*, dentro de los cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y ADN oxidados. Estas técnicas son ampliamente aplicadas en la investigación clínica y epidemiológica (Sánchez *et al.*, 2004).

La generación de ERO, como el ion superóxido, el radical hidroxilo y peróxido de hidrogeno, es un fenómeno que ocurre durante el metabolismo aeróbico en los organismos vivos. Las ERO pueden provocar estrés oxidativo, el cual es el principal causante de muchas enfermedades crónico degenerativas. La generación de ERO puede controlarse mediante una serie de sistemas antioxidantes endógenos y exógenos, los cuales incluyen a las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), al tripeptido glutatión (GSH), y algunas vitaminas. Si el balance entre las

defensas de los sistemas antioxidantes y la generación de ERO se interrumpen, se presenta el estrés oxidativo. Si este es persistente y prolongado causa lipoperoxidación, daño en ADN y en proteínas, eventualmente produce desórdenes fisiológicos y biológicos que incluyen enfermedades neurodegenerativas, disfunción inmune y cáncer (Vieira F., *et al.*, 2011; Mahdavi *et al.*, 2009; Wiseman *et al.*, 1996).

Por lo que la oportunidad para la aplicación clínica de antioxidantes naturales continúa incrementándose como medida preventiva y terapéutica, debido a que las enfermedades causadas por el estrés oxidativo son más comunes. Hay una tendencia mundial hacia el uso de fitoquímicos de compuestos fenólicos que se encuentran en frutas, verduras, semillas oleaginosas, plantas y hierbas como antioxidantes y alimentos funcionales (Baek *et al.*, 2011).

4.3.2 Efecto Hipoglucémico de plantas

Existe gran interés en los compuestos bioactivos de plantas, como una posible fuente de agentes hipoglucémicos (Bansal *et al.*, 2012), los mecanismos de actividad hipoglucémica de varias plantas medicinales han sido estudiadas ofreciendo un descubrimiento de nuevas drogas antidiabéticas (Chen *et al.*, 2012). La diabetes mellitus DM es una enfermedad en la cual los niveles de glucosa en la sangre están arriba de lo normal (Dixit & Kar 2010; Yang *et al.*, 2012). Existen tres principales tipos de diabetes tipo I (diabetes juvenil), diabetes tipo II y diabetes gestacional. En la diabetes tipo I las células β del páncreas no producen suficiente insulina. La diabetes tipo II es la forma más común de la diabetes (90-95 % de los casos). Esta forma usualmente inicia con la insensibilidad a la insulina, una condición en la cual los músculos, hígado y células grasas no responden propiamente a la insulina. El páncreas eventualmente pierde la habilidad para producir insulina en respuesta a la ingesta alimenticia. La diabetes gestacional es causada por cambios hormonales en el embarazo o por insuficiencia de insulina (Hui *et al.*, 2009).

La diabetes es una enfermedad humana compleja caracterizada por la sobreproducción de glucosa por el hígado y su infrautilización por otros órganos. La enfermedad es causada por insuficiente de insulina por las células de los islotes de Langerhans del páncreas y resistencia a la insulina deteriorada (Patel *et al.*, 2012), lo que conduce a la hiperglucemia y resultando en la entrada alteración de la glucosa en las células, lo que dificulta la utilización de glucosa. El grupo aldehído del exceso de glucosa puede reaccionar *in vivo* con los grupos amino de las proteínas funcionales y estructurales, como la hemoglobina y colágeno formando productos de glicación de Maillard que contribuyen a la patogénesis de la diabetes y otras enfermedades. Los niveles de aductos de hemoglobina en la sangre pueden servir como un indicador de la gravedad de la enfermedad. Estas reacciones son análogas al calor inducido por el pardeamiento no enzimático en alimentos. No se sabe si aductos de hemoglobina-acrilamida relacionados contribuyen a las consecuencias adversas de la diabetes. La diabetes no tratada se caracteriza por el metabolismo anormal de la glucosa, presumiblemente porque los niveles de insulina son demasiado bajos y los niveles de glucagón son demasiado altos. Los niveles sanguíneos de glucosa en humanos normales van de 80 a 120 mg / 100 ml. La patogénesis de la destrucción de las células β autoinmune que contribuye a las causas de la diabetes no se entiende bien. El tratamiento incluye el control de la hiperglucemia con insulina y drogas sintéticas (Yang *et al.*, 2012).

La diabetes mellitus (DM) en los humanos es una manifestación de disturbancias metabólicas debido a la ingesta de carbohidratos y lípidos en exceso. La hiperglicemia y la hiperlipidemia son factores de riesgo importantes en el desarrollo de enfermedades cardiovascular y desordenes metabólicos.

Durante el comienzo y desarrollo de la diabetes tipo II, el balance de carbohidratos y metabolismo de lípidos es afectado, lo cual produce niveles elevados de glucosa postprandial en la sangre. Un aprovechamiento terapéutico en el tratamiento de la diabetes es disminuir la hiperglicemia postprandial retardando la absorción de glucosa a través de la inhibición de enzimas hidrolizadoras de carbohidratos como

la α -glucosidasa y α -amilasa en el tracto digestivo. La hiperglicemia prolongada con DM produce a la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) los cuales están involucrados en la generación de ERO y causa daño oxidativo. Lo que contribuye al desarrollo y progresión de varias complicaciones diabéticas como neuropatía periférica, cataratas, problemas de cicatrización, daño vascular, rigidez de la pared arterial y disminución de la distensibilidad miocárdica (Palanisamy ., 2011).

Así mismo la diabetes mellitus es definida como una manifestación clínica hiperglicémica debido a la disfunción de sistemas metabólicos (metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas) y es uno de los trastornos endocrinos más comunes. Factores genéticos, sociales y medioambientales (obesidad, dieta impropia, sedentarismo) juegan un papel importante en esta etiopatogénesis (NirmlaDevi *et al.*, 2011). Globalmente la incidencia de diabetes es estimada a un incremento del 4% en 1995 a 5.4% en el año de 2025 (Fatima *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2008)

Actualmente están disponibles medicinas tradicionales para el control o manejo de la diabetes que incluyen un gran número de plantas medicinales (Hui *et al* 2009). Diversos estudios han mostrado que ciertas plantas y fitoquímicos tienen propiedades que mejoran el estado de la diabetes (Giordani *et al.*, 2015).

Los flavonoides son compuestos ampliamente distribuidos en la dieta y extractos de plantas y la medicina moderna ha incrementado su estudio por su posible valor terapéutico para tratar enfermedades comunes. Las propiedades antidiabéticas de los flavonoides pueden ser explicadas por una amplia variedad de mecanismos, la capacidad antioxidante de este grupo de compuestos naturales juega un papel importante en la prevención de hiperglicemia y las complicaciones relacionadas. Las células pancreáticas exhiben una sensibilidad particular al estrés oxidativo y como los antioxidantes, los flavonoides tienen la capacidad para prevenir el daño progresivo de la función de las células β del páncreas, regenerar el daño y estimular la secreción de insulina (Rauter *et al.*, 2010).

Dentro de los mecanismos también están incluidos la influencia inhibitoria sobre glucogénesis (Dixit & Kar, 2010) y la glicación avanzada (Ahmad *et al.*, 2012; Rauter

et al., 2010). Las medicinas convencionales para regular la diabetes producen efectos secundarios (Dixit & Kar, 2010) y desventajas como son el costo, hipoglucemia, ganancia de peso, desordenes gastrointestinales y toxicidad en el hígado, por lo que concierne a buscar un aprovechamiento alternativo para tratar la diabetes.

Los principales medicamentos occidentales hipoglucemiantes actúan como suplementadores de insulina, mejorando la sensibilidad a la insulina, aumento de la secreción de insulina del páncreas y / o la captación de glucosa por las células del tejido. En condiciones normales, las células β - pancreáticos secretan insulina suficiente para mantener la concentración de glucosa en sangre dentro de un rango estrecho (72 a 126 mg / dL). La estimulación de la insulina seguida por la cascada de señalización aumenta la ingesta de glucosa, la utilización y el almacenamiento en diversos tejidos. En pacientes diabéticos, el cuerpo pierde la capacidad de producir insulina como resultado de la apoptosis de las células β - del páncreas o insensibilidad a la insulina. Las citocinas, lipotoxicidad y gluco-toxicidad son tres grandes estímulos para la apoptosis de las células β . Existen varios tipos de medicamentos hipoglucemiantes, incluyendo secretagogos de insulina (sulfonilureas, meglitinidas), sensibilizadores de la insulina (biguanidas, tiazolidinedionas, metformina), α -glucosidasa inhibidores (miglitol, acarbosa). Nuevos análogos peptídicos, como exenatida, liraglutida y los inhibidores de la DPP-4, aumentan GLP-1 la concentración sérica y retrasan el vaciado gástrico. La mayoría hipoglucemiante drogas, sin embargo, estos medicamentos pueden tener efectos adversos, como la hipoglucemia severa, acidosis láctica, la lesión celular hepática idiosincrásica, déficit neurológico permanente, molestias digestivas, dolor de cabeza, mareos e incluso la muerte (Hui *et al.*, 2009).

Algunos de los medicamentos para el tratamiento para bajar la glucosa en la sangre se incluyen; secretadores de insulina (sulfonilureas, meglitinidas), sensibilizadores a la insulina (biguanidas, metforminas, tiazolidinedionas) e inhibidores de α -glucosidasa (miglitol, acarbosa) (Hui *et al.*, 2009), algunos de estos medicamentos y sus mecanismo se muestran en la Figura 3.

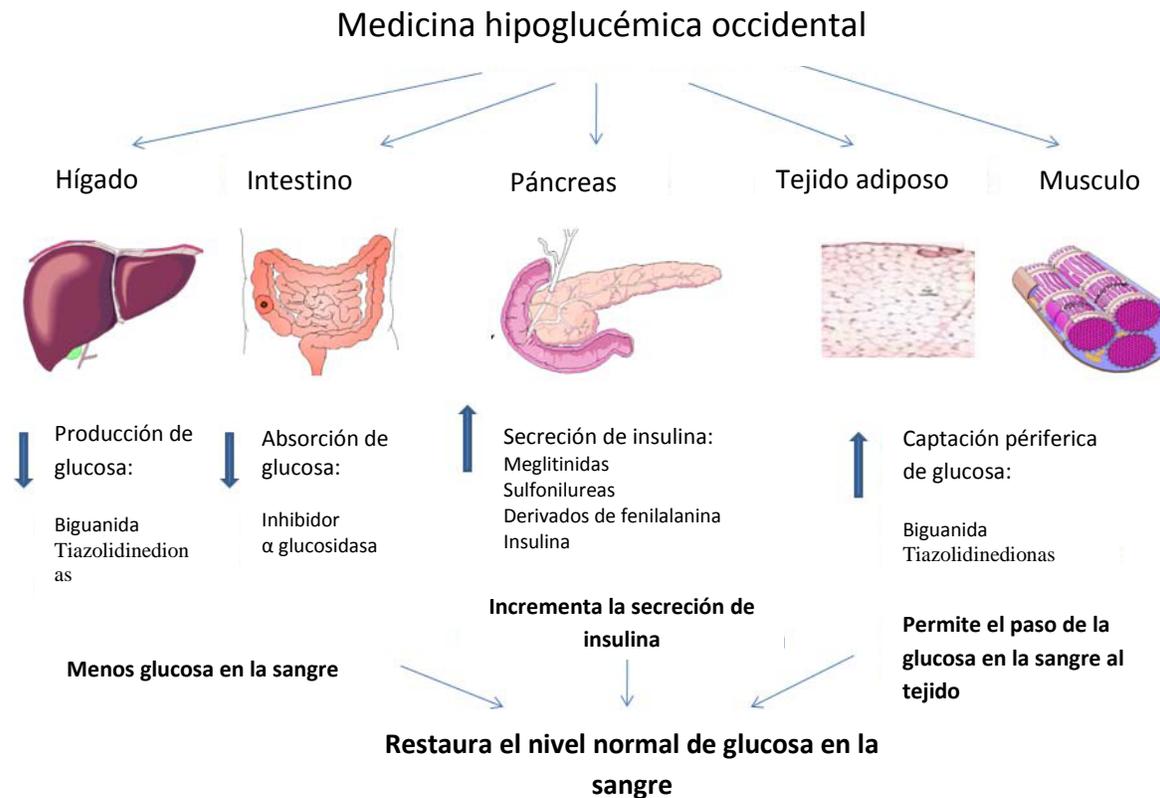


Figura 3. Principales sitios activos y mecanismos de los fármacos antidiabéticos.

La información etnobotánica sugiere cerca de 800 plantas que poseen potencial antidiabético (Patel *et al.*, 2012). Sin embargo, pocos medicamentos a base de hierbas se han caracterizado bien y demostrado la eficacia en ensayos clínicos sistemáticos como los de los fármacos occidentales (Hui *et al.*, 2009). Los compuestos activos en las plantas actúan por mecanismos diferentes entre ellos podemos ver que los flavonoides tienen actividad inhibitoria a la glicación, extractos ricos en apigenina o derivados tienen propiedades de inhibición de la α -glucosidasa y disminución de la glucosa en la sangre, el ejercicio disminuye la glucosa en el plasma, incrementa los niveles de insulina y el estatus antioxidante, disminuyendo los productos de la lipoperoxidación e incrementando los antioxidantes enzimáticos

y no enzimáticos. La genisteina presentó actividad antihiper glucémica protegiendo significativamente a animales diabéticos contra lesiones hepáticas y renales. Esta isoflavona fue reportada para promover la supervivencia de las células β (Rauter *et al.*, 2010).

En la Figura 4 se muestran algunos sitios y mecanismos de acción de plantas antidiabéticas. En México, se han documentado al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias que se utilizan como agentes hipoglucémicos (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005).

Las plantas medicinales o la fitomedicina para tratar enfermedades en base a experiencias pasadas se han utilizado en muchas partes del mundo. Hoy en día se ha incrementado el uso de plantas para tratar distintas enfermedades, como la diabetes (Edem, 2009; Iweala & Oludare, 2011).

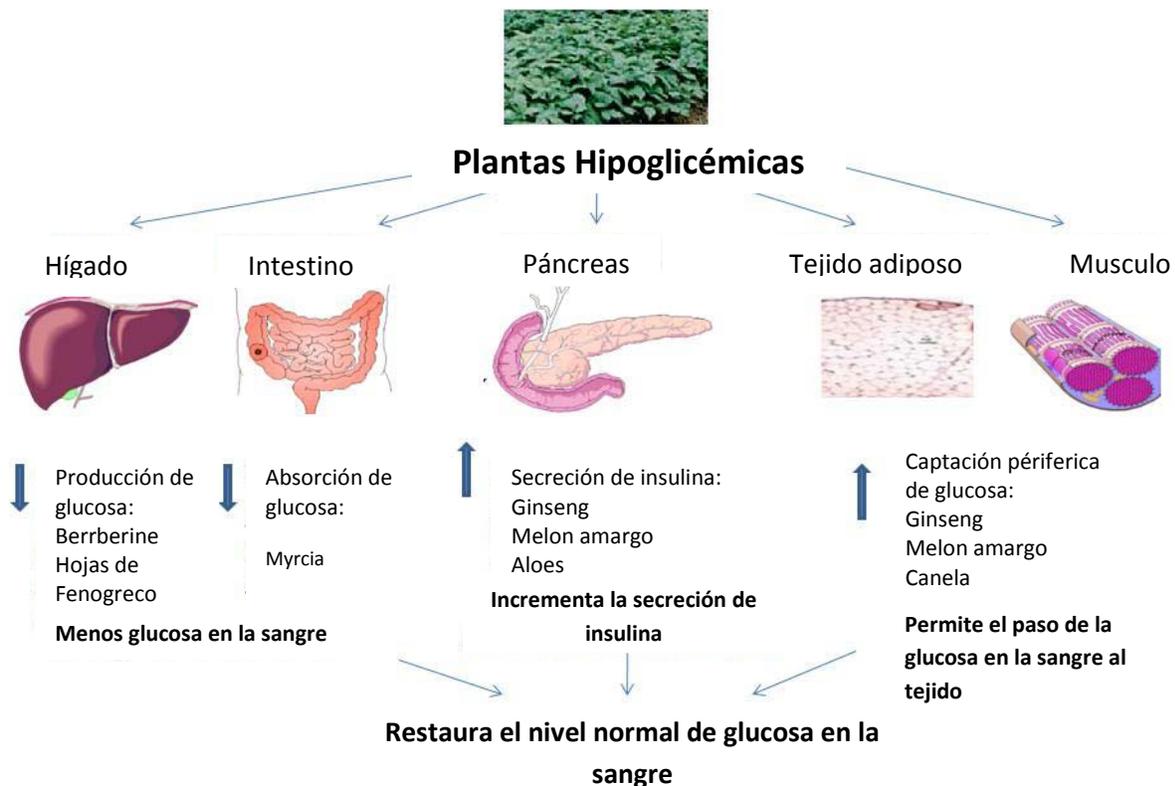


Figura 4. Principales sitios y mecanismos de acción de plantas antidiabéticas.

4.3.3 Efecto Hipocolesterolémico de plantas

La hiperlipidemia (principalmente niveles incrementados de colesterol, triglicéridos y/o lipoproteínas de baja densidad) contribuye significativamente a la manifestación y desarrollo de aterosclerosis y enfermedades coronarias, las cuales son la mayor causa de muertes en el mundo, aproximadamente 12 millones de personas mueren al año alrededor del mundo. La hipercolesterolemia es uno de los factores de riesgo más importantes para la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares ECV (Steinberg D., 2002). ECV son la principal causa de morbilidad y mortalidad cardiovascular en todo el mundo, y dos terceras partes de todas las muertes cardiovasculares ocurren en países en desarrollo. La hipercolesterolemia provoca

un mal funcionamiento del hígado, que aparentemente se produce a través de la estenosis micro vesicular debido a la acumulación intracelular de los lípidos. Una dieta rica en colesterol causa hipercolesterolemia, aumenta la producción de radicales libres, y por lo tanto eleva peróxidos lipídicos. La hipercolesterolemia se asocia con aumento de la producción de radicales de oxígeno y el aumento de la oxidación del colesterol LDL, esto conduce a la lesión endotelial y lesión de los tejidos mediante la inducción de modificaciones oxidativas en lípidos, proteínas y ADN.

El estrés oxidativo, un estado que resulta de la interrupción del delicado equilibrio entre oxidativo y los procesos antioxidantes, se cree que juega un papel importante en la patogénesis de la aterogénesis hipercolesterolémica. Por lo tanto, en animales de experimentación alimentados con colesterol a menudo se ha utilizado para elevar los niveles de colesterol en suero o tejido para estudiar la etiología de los trastornos metabólicos relacionados con la hipercolesterolemia.

Muchas plantas medicinales contienen grandes cantidades de antioxidantes, tales como polifenoles, que desempeñan un papel importante en la abstracción y la neutralización de los RL o en la descomposición de peróxidos. Se ha reportado que en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol polifenoles de semilla de uva (proantocianidinas) tienen un efecto hipocolesterolémico. La suplementación de agua potable con el vino desalcoholizado, el jugo de granada y quercetina redujeron el tamaño de estas lesiones en ratones deficientes de apolipoproteína E. Estos efectos se asocian con la absorción reducida de colesterol LDL por los macrófagos y la disminución de la susceptibilidad de las LDL a la agregación. Los polifenoles del té verde han mostrado fuertes efectos quimiopreventivos quimioterapéuticos contra varias condiciones patológicas relacionadas con la hiperglicemia (Alshatwi *et al.*, 2011).

Los medicamentos para disminuir el colesterol (fibratos, estatinas ácidos secuestrantes, etc.) regulan el metabolismo de los lípidos por diferentes mecanismos, sin embargo estos producen efectos secundarios. Por lo que se han desarrollado medicinas de fuentes naturales como una mejor opción. El

conocimiento tradicional e histórico sobre medicina juega un papel importante en el descubrimiento de plantas medicinales.

El efecto hipocolesterolémico de plantas consiste en la supresión de la síntesis del colesterol, aumento de la actividad de macrófagos, disminución de triglicéridos y prevención la oxidación de lipoproteínas (Fuhrman *et al*, 1997).

4.4 Genotoxicidad

Cuando se demuestran las propiedades farmacológicas de extractos de plantas, como son propiedades antidiabéticas, hipoglucémicas, hipocolesterolémicas, analgésicas, antioxidantes y anti-tumoríticas es necesario realizar un estudio toxicológico o genotóxico (Rodeiro *et al.*, 2013, Matic *et al.*, 2013). Debido a que hay poco conocimiento de la seguridad relativa de la medicina herbal. Las pruebas toxicogenéticas son técnicas diseñadas para detectar compuestos que inducen daño al ADN directa o indirectamente. El daño puede resultar en mutaciones genéticas, pérdida de heterocigosidad, aberraciones cromosomales, entre otros (Alves *at al.*, 2014; Tice *et al.*, 2000).

Los seres humanos están expuestos continuamente a una variedad de productos químicos perjudiciales (genotóxicos) y beneficiosos (antioxidantes). Asimismo el estilo de vida puede hacer que los individuos sean susceptibles a cáncer, ya sea debido a exposiciones peligrosas o por la ingesta insuficiente de compuestos preventivos de cáncer (frutas y verduras). Por lo que hay una necesidad de ensayos validados para detectar compuestos genotóxicos en la evaluación de riesgos. Hoy en día la genotoxicidad en sistemas de plantas ha sido evaluada con un número de técnicas que incluyen: micronúcleos, la prueba de Ames, electroforesis alcalina en gel de células individuales, entre otras (Petriccione & Ciniglia 2012).

La electroforesis alcalina en gel de células individuales (ensayo cometa) es ampliamente utilizada hoy en día para la detección de genotoxicidad (Peter Møller 2006).

4.4.1 Electroforesis alcalina en gel de células individuales o Ensayo cometa

La técnica del cometa o ensayo cometa es muy sensible y simple para detectar daño en ADN, como rompimiento simple y doble de cadena, generación de sitios lábiles y cambios en la estructura cromosomal (Chen *et al.*, 2013; Cabarkapa *et al.*, 2013; Xio *et al.*, 2014).

Ostling y Johanson [1984] fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis en microgel para detectar daños en el ADN a nivel de la célula individual. Posteriormente, Singh *et al.* (1988) introdujo una técnica que involucra electroforesis bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) para la detección de daño en el ADN en las células individuales. (Tice *et al.*, 2000).

Este ensayo consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para eliminar todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrogeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras. Al someter el ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, los fragmentos de ADN cargados negativamente o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo, para formar un halo, apreciándose una estructura parecida a la de un cometa al teñir el ADN después de la electroforesis. Las células con un aumento de su ADN dañado muestran un incremento de la migración microsomal del ADN, siendo las rupturas de doble cadena las causantes de mayor frecuencia de migración del material genético. Por otra parte las células controles tienen un bajo número de rupturas, estas exhiben cometas de nivel 0 de acuerdo con la clasificación del grado de daño al ADN, pero existiendo siempre cierta migración, encontrándose un 10% de este en la cola. Para detectar y cuantificar el daño al ADN este puede ser teñido con diferentes agentes como el nitrato de plata siendo más frecuentemente usados los agentes fluorescentes (Arencibia & Rosario, 2010). Usualmente los cometas son visualizados y evaluados con manchas de ADN fluorescentes, tales como yoduro de propidio o bromuro de etidio (carcinógenos potenciales) (Nadin *et al.*, 2001).

5. Justificación

Los sistemas de salud soportan un incremento en la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas y cáncer. Por este motivo, cada vez es más frecuente el uso de tratamientos alternativos basados en plantas medicinales, que sean menos invasivos y que disminuyan los efectos secundarios que se presentan en la mayoría de los tratamientos, basados en medicinas sintéticas. En México, más del 90% de la población general utilizan plantas medicinales en prácticas comunes para el tratamiento empírico de varias enfermedades. Su composición química consiste de agentes biológicamente activos y con propiedades benéficas para la salud humana, conocidos como compuestos fenólicos o polifenoles, los cuales están presentes en la cáscara, semilla, raíz, corteza, hojas y frutos de las plantas, que se les confieren propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas, entre otras. Es necesario conocer de forma científica las propiedades farmacológicas de dichas plantas medicinales y validar el efecto biológico atribuido a la medicina herbal. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluaron las propiedades biológicas, antioxidantes y genotóxicas de subproductos agroforestales, que en la mayoría de los casos son desechos que no tienen algún uso comercial. Lo anterior nos permitirá generar conocimiento científico acerca de las propiedades benéficas de los productos agroforestales y un valor agregado a estos compuestos.

Hipótesis

Los polifenoles presentes en subproductos agroforestales de *N. lappaceum*, *G. mangostana*, *P. granatum*, *A. pungens*, *E. heterophyllum*, *M. indica* L. Var. *Manila* y Var. *Tommy Atkins*, *J. regia* y *C. odorata* L., tienen propiedades antioxidantes, hipoglucémicas e hipocolesterolémicas, sin presentar efecto genotóxico.

6. Objetivo

Evaluar las propiedades farmacológicas de extractos etanólicos, acuosos y de acetato de etilo de subproductos agro forestales que incluyen extractos de cáscaras de *Nephelium lappaceum* (rambutan), *Garcinia mangostana* (mangostan), *Punica granatum* (granada), cortezas de *Mangifera indica* L. (mango) Var. *Manila* y *Mangifera indica* L. (mango) Var. *Tommy Atkins*, *Juglans regia* (Nogal) y *Cedrela odorata* L. (cedro rojo), así como las hojas de *Arctostaphylos pungens* (pingüica) y *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo), en base a su composición de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, inhibición de estrés oxidativo y al efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico, así como el efecto genotóxico de los extractos.

6.1 Objetivos específicos

- a) Obtener extractos vegetales alcohólicos, acuosos y de acetato de etilo de las plantas *Nephelium lappaceum* (rambutan), *Garcinia mangostana* (mangostan), *Punica granatum* (granada), *Mangifera indica L.* (mango) Var. *Manila* y *Mangifera indica L.* (mango) Var. *Tommy Atkins*, *Juglans regia* (Nogal), *Cedrela odorata L.* (cedro rojo), *Arctostaphylos pungens* (pingüica) y *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) y evaluar el efecto del solvente de extracción.
- b) Determinar la concentración de fenoles en los extractos (fenoles totales, flavonoides y proantocianinas).
- c) Determinar la actividad antioxidante de los extractos *in vitro* mediante la determinación de la actividad de eliminación de los radicales DPPH y ABTS, Método de decoloración del β -caroteno y del NO
- d) Evaluar el efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico de los extractos en modelo murino.
- e) Determinar el efecto antioxidante de los extractos mediante el Método de lipoperoxidación hepático, evaluando la concentración de MDA en hígado mediante el método TBARS.
- f) Evaluar la genotoxicidad de extractos que hayan presentado propiedades biológicas en leucocitos de ratón.

7. Materiales y Métodos

7.1 Materia prima

Las nueve especies de plantas que se muestran en el Cuadro 2, se seleccionaron como material de estudio, algunas de las cuales se han utilizado como medicina tradicional o tienen reportes bibliográficos acerca de sus propiedades antioxidantes y/o medicinales. La colecta de la materia prima se realizó en diversos municipios del estado de Durango (Durango, Cuencamé y Nombre de Dios) y de Veracruz (El Palmar, Tezonapa y Cotaxtla).

La materia prima se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente fue molida en molino de laboratorio y tamizada con tamiz malla 60.

Cuadro 2. Nombre común, nombre científico, familia, parte de la planta y lugar de colecta de las nueve especies de estudio.

Nombre común	Nombre científico	Familia	Parte de la planta	Lugar de colecta
Pingüica	<i>Arctostaphylos punges</i>	Ericaceae	Hojas	Mpio. Durango
Cedro rojo	<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	Corteza	Tezonapa, Ver.
Hierba del sapo	<i>Eryngium eterophyllum</i>	Apiaceae	Planta entera	Mpio. Durango
Mangostán	<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae	Cáscara	Tezonapa, Ver.
Nogal	<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae	Corteza	Mpio. Cuencamé
Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiáceas	Corteza	Cotaxtla, Ver.
Var. Manila y Var. Tommy Atkins			Corteza	Cotaxtla, Ver.
Rambután	<i>Nephelium lappaceum</i>	Sapindaceae	Cáscara	Cotaxtla, Ver
Granada	<i>Punica granatum</i>	Lythraceae	Cáscara	Mpio. Nombre de Dios

7.2 Extracción de compuestos polifenólicos

Para la extracción se pesaron 10 g de material seco de cada especie de planta y cada uno se dejó macerar de forma independiente con 100 ml de los siguientes solventes: agua, etanol 96° y etanol-agua 70:30 v/v, durante 48 h. Los extractos se filtraron mediante papel filtro. Los extractos etanólicos se concentraron utilizando un rota evaporador con vacío para recuperar el solvente. Posteriormente se secaron

en una campana de extracción. Los extractos acuosos se secaron por liofilización. De la fracción concentrada de los extractos con etanol-agua 70:30 v/v, se le realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (purificación primaria), la fracción soluble en acetato se concentró en rotavapor hasta sequedad.

7.3 Determinación de Fenoles Totales (FT)

La concentración de fenoles totales de cada uno de los extractos se realizó mediante el método de Folín-Ciocalteu, como lo proponen Waterman y Mole (1994), el cual determina la concentración de fenoles solubles, es un método eficiente para estimar la capacidad reductora de la muestra, Vermerris & Nicholson, (2006). Se realizó una curva de calibración con ácido gálico como estándar a diferentes concentraciones. A un 0.1 ml de extracto se le adicionaron 0.6 ml de agua desionizada y 0.5 ml del reactivo Folín-Ciocalteu 2 N. A un tiempo posterior de entre 1-8 min de agregar el reactivo se adicionaron 1.5 ml de una solución de carbonato de calcio (Na_2CO_3) al 20 %, posteriormente se aforó a 10 ml y se dejó reposar durante 2 h. Se leyó la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco (mg EAG/ g de extracto).

7.4 Determinación de Flavonoides (F)

Se utilizó el método colorimétrico descrito por Heimler . (2005). A 0.25 ml de muestra diluida (1000 mg/L de extracto con los cuatro solventes) se le adicionaron 75 μl de una solución de NaNO_2 al 5%, 0.150 ml de una solución fresca de AlCl_3 al 10% y 0.5 ml de NaOH 1M. Se ajustó el volumen a 2.5 ml con agua desionizada y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 510 nm utilizando blanco. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por g de extracto (mg EC/ g de extracto), mediante una curva de calibración de catequina con un rango de concentraciones entre 50 a 250 $\mu\text{g/ml}$.

7.5 Determinación de Proantocianidinas (P)

Se siguió el procedimiento propuesto por Heimler . (2005). A una muestra de 50 μ l de extracto se le adicionaron 3 ml de una solución al 4% de vainillina en metanol y 1.5 ml de HCl concentrado. La muestra se dejó reposar durante 15 min y se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco de metanol. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por g de extracto seco (mg EC/ g de extracto), utilizando una curva de calibración de catequina con un rango de concentraciones entre 100 a 500 μ g/ml.

7.6 Determinación de la Actividad Antioxidante (AA)

7.6.1 Determinación de AA mediante la Técnica de Eliminación del Radical DPPH (2,2'-difenilo-1-picrilhidracilo).

Se siguió el procedimiento propuesto por Brand Williams, (1995), con algunas modificaciones propuestas por Rosales-Castro, (2011). Se preparó una solución del radical DPPH a concentración de 2.4 mg/100 ml (6.09×10^{-5} M), disuelta en metanol. Se elaboró una solución stock de los extractos (5 mg en 10 ml de metanol absoluto) y se hicieron diluciones a 100, 200, y 300 μ g/ml. Se adicionaron en un tubo de ensayo 50 μ l de extracto y 1950 μ l de la solución DPPH, se agitó y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 515 nm, tanto de la muestra (Am) como de un control (Ac), este último se prepara solamente con el reactivo DPPH y metanol absoluto.

Posterior a este procedimiento calculó la concentración efectiva media (EC_{50}), la cual corresponde a la concentración de extracto que estabiliza el radical en un 50%.

7.6.2 Determinación de AA por el Método de Decoloración del β -Caroteno

Esta determinación se realizó según Rosales-Castro (2011), se disolvió 0.6 mg de β -caroteno en 5 ml de cloroformo y esta solución se adicionó a un recipiente que contenía 20 mg de ácido linoléico y 100 mg de Tween 40. Se preparó una emulsión

(A) retirando el cloroformo de la mezcla por evaporación y se añadieron 50 ml de agua destilada, agitándose vigorosamente. Posteriormente se preparó la emulsión (B) con 20 mg de ácido linoléico, 100 mg de Tween 40 y 50 ml de agua. En un tubo de ensayo se colocaron 0.2 ml de etanol y 5 ml de la emulsión B y se utilizó como blanco en el espectrofotómetro. Se prepararon mezclas de 0.2 ml de extracto y/o estándar disuelto en etanol y se adicionó 5 ml de la emulsión A. Se agitaron las mezclas y se midió la absorbancia a 470 nm inmediatamente. Posteriormente se calentó a 50°C durante 2 h. Después a este tiempo se dejó enfriar en agua a 20°C y se leyó la absorbancia final. La concentración final de los extractos y estándares en la mezcla de reacción fue de 20 µg/ml. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición relativo al control que se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% AA = ((A_{m(120)} - A_{c(120)}) / (A_{c(0)} - A_{c(120)})) \times 100$$

7.6.3 Determinación de AA mediante el Método del Óxido Nítrico (NO)

El NO se generó a partir de nitroprusiato de sodio (SNP) y se midió mediante la reacción de Griess. Se siguió el procedimiento propuesto por Rajan (2011), el NO se generó del SNP, el cual a pH fisiológico liberará ácido nítrico. Este ácido nítrico se convertirá a ácido nitroso y en otras formas de iones nitrito (NO₂), las cuales diazotizan con ácido sulfanílico y con el reactivo Griess, produciendo un color rosa, el cual puede ser medido a 546 nm. SNP (10 mM, 2 mL) en buffer de fosfato salino se incubó a temperatura ambiente por 30 min con la muestra a diferentes concentraciones. Después de los 30 min, a 0.5 mL de la solución incubada se le añadió 1 mL del reactivo Griess y se midió la absorbancia a 546 nm. La actividad de atrapamiento de radicales libres se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% ARL = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}} \times 100.$$

7.6.4 Determinación de AA Mediante la Eliminación del Radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzoline-6-sulfónico)

Se realizó según la metodología propuesta por Rosales-Castro (2011), con algunas modificaciones. El radical ABTS se obtuvo mediante la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2.45 mM, posteriormente aforar con agua a un volumen de 10 ml e incubar a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) con agitación y en la oscuridad durante 16 h. Formado el radical ABTS se colocó en viales de 1 ml y se guardó en congelación a $-7^\circ C$. Posteriormente se diluyó 1ml del ABTS con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.1) a una longitud de onda de 754 nm. Las muestras se prepararan a una concentración de 100 ppm diluidas en etanol excepto la hierba del sapo que se preparó a 500 ppm. En una celda de plástico se depositó 80 μl de muestra y 1820 μl de ABTS, se agitaron y se leyó la absorbancia de la muestra (A_m) y del control (A_c) a 754 nm, al tiempo cero, 1 y 6 min.

Los resultados se expresaron como porcentaje de atrapamiento del radical, los cuales se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(\% \text{ ARL}) = (A_c) - (A_m) / (A_c) \times 100$$

7.7 Evaluación del efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico *in vivo* en modelo murino

7.7.1 Animales de estudio

Los animales experimentales se obtuvieron del Bioterio (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN), los cuales se encontraban en condiciones de temperatura controlada entre de $22 \pm 1^\circ C$ y con ciclos de 12 h de luz/oscuridad y con alimento y agua y ad libitum. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de

Cuidado de Animales de (ENCB-IPN) y se llevaron a cabo de conformidad con la Norma Oficial Mexicana Estándar (NOM-062-200-1999) de las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

7.7.2 Evaluación de las propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas

7.7.3 Actividad hipoglucemiante

A partir de las pruebas de obtención FT y AA se eligió un extracto de cada planta (9 plantas) con el solvente con el cual se obtuvo la mejor AA en relación a la concentración de FT. La actividad hipoglucemiante se obtuvo realizando una curva de tolerancia a la glucosa en ratas macho Wistar (3 animales por extracto) con un peso promedio de 300 g. Las ratas de estudio estuvieron en ayuno 12 h antes de la prueba. Para conocer el nivel de glucosa total de los animales, se obtuvo una muestra de sangre mediante un pequeño corte en la cola de la rata y se midieron los niveles de glucosa basal. La dosis fue de 200 mg/kg de extracto la cual se administró vía oral en el tiempo 0. Después de 15 min a los animales se les administró glucosa al 35% (0.1 mL /kg de peso) vía intraperitoneal. Al grupo control sólo se le administró glucosa. La concentración de glucosa en sangre fue monitoreada en los tiempos 0, 30, 60 90 y 120 min en cada grupo experimental y se generó una tabla de resultados para analizar la respuesta de tolerancia a la glucosa en las ratas como respuesta a la administración de los extractos.

Una vez graficado los valores se determinó el área bajo la curva (AUC) usando el método de la "regla trapezoidal": la curva se divide en secciones que se aproximan a trapecios en su forma y se calcula el área de cada una de ellas mediante la fórmula siguiente:

$$\text{AUC (g/ L min)} = \{(G_{t_{x+1}} + G_{t_x}) * [(t_{x+1}) - t_x]\} / 2$$

Dónde:

G_{t_x} = valores de glucosa en g/L al tiempo cero (t_x = min)

$G_{t_{x+1}}$ = valores de glucosa en g/L al tiempo t_{x+1} (min)

$$[(t_{x+1}) - t_x] = (t_1-t_0), (t_2-t_0), (t_3-t_0)\dots(t_n-t_0)$$

La grafica de AUC está basada en el cálculo de las áreas bajo la curva de absorción, es decir, aquella área delimitada por el gráfico obtenida al representar la concentración plasmática en función del tiempo.

Diseño experimental:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + Co + T + e_{ijk}$$

$T = \text{Tiempo}$

$i = 1,2$

$1 = \text{gpo con extracto}, 2 = \text{gpo control}$

$Co = \text{covariable glucosa basal}$

$E_j = \text{extractos}$

$K = \text{repeticiones}$

7.7.4 Efecto hipoglucémico

Para el efecto hipoglucémico se probaron solo los extractos de *Juglans regia* y *Cedrela odorata*, debido a que fueron los extractos que tuvieron mayor actividad hipoglucemiante según la AUC. Estos se probaron en ratas Wistar (hembra) 5 ratas/ dosis de extracto, con diabetes tipo I inducida previamente con estreptozotocina. La estreptozotocina fue preparada en solución amortiguadora de citratos a pH 4.4, y administrada vía intraperitoneal en una dosis de 65 mg/kg de rata. Después de 24 h se comprobó la diabetes en los animales mediante medición de glucosa en sangre. Posteriormente se administró el extracto en una dosis de 200 mg/kg de rata durante 10 días, y se estuvieron monitoreando los niveles de glucosa y comparando contra un grupo testigo todos los días o con qué frecuencia (sanos).

7.7.5 Efecto hipocolesterolémico

Los extractos con mayor actividad hipoglucemiante se probaron en modelo de ratones macho (NIH CD1) con hipercolesterolemia inducida por tiloxapol (4 ratones/dosis de extracto). Se les administró una dosis de 100 mg/kg por vía oral de extracto y una h después se les administró una dosis de 40 mg/ml de tiloxapol vía intraperitoneal. Después de 24 h se les volvió a administrar la misma dosis de extracto, y dos horas después se tomó muestra de sangre mediante una punción retro orbital, de la que se obtuvo el suero mediante centrifugación a 1000 rpm/10 min. En esta muestra se evaluó el perfil lipídico con un Kit comercial (Marca RANDOX) y se determinó colesterol total, colesterol-HDL y triglicéridos. Estos resultados fueron comparados con muestras de un grupo testigo al cual no se administró extracto ni tiloxapol y contra un grupo control de tiloxapol, el cual no recibió tratamiento de extracto.

7.8 Evaluación de Estrés Oxidativo *in vivo*

7.8.1 Método de Lipoperoxidación Hepático

El estrés oxidativo se evaluó mediante la concentración de malonaldehído MDA en hígado mediante el método del ácido tiobarbiturico (TBARS). Esta determinación se realizó con los extractos de Cedro Rojo, Nogal y Hierba del Sapo, provenientes de las muestras obtenidas de los animales que se utilizaron en la prueba del efecto hipocolesterolémico e hipoglucémico.

Varios marcadores disponibles de estrés oxidativo se han utilizado para evaluar el nivel de daño en el organismo causado por la oxidación, como son los hidroperóxidos lipídicos (LH) y las sustancias reactivas del ácido tiobarbiturico, el cual ha sido usado extensivamente como marcador de lipoperoxidación Vieira ., (2011).

El nivel de lipoperoxidación en hígado se midió según Rivera R., ., (2011). Se pesó una fracción del hígado (50 mg), el cual fue homogenizado con 0.5 mL de buffer

salino de fosfato (pH= 7), a 0.5 mL de esta solución se le agrego 1 mL del reactivo TBARS el cual está conformado por ácido tricloro acético (TCA), ácido tiobarbiturico (TBA) y ácido clorhídrico (15% (w/v), 0.375% (w/v), y 0.25 N, respectivamente). Posteriormente se colocaron las muestras a baño maría a temperatura de ebullición durante 1 h, se dejó enfriar y se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, se separó el sobrenadante y posteriormente se leyó su absorbancia a 532 nm. Se utilizó un blanco sin muestra. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en MMol MDA/g tejido.

7.9 Evaluación de Genotoxicidad

Se realizó en ratones NIH con peso de 25-30g, los cuales se dividieron en seis grupos experimentales de seis animales cada uno. Los extractos de *Juglans regia* y *Cedrela odorata* fueron suspendidos en 1% solución acuosa de Tween 80 y administrados vía gástrica (0.3mL) a dosis de 100 y 200 mg/kg de peso corporal. Los extractos y las dosis para esta prueba se escogieron en base a la actividad farmacológica de los extractos de estudio. El grupo control negativo recibió solamente Tween 80 al 1% y al grupo control positivo se le indujo daño a DNA mediante una inyección intraperitoneal de Ciclofosfamida (CPA) a 50 mg/kg de peso corporal.

7.9.1 Ensayo Cometa

El ensayo cometa se llevó a cabo por el método descrito por Čabarkapa *et al.*, 2014 y Alves *et al.*, 2014, con algunas modificaciones. Una muestra de sangre de los animales de estudio, obtenida mediante punción retroorbital se recogió a las 4 y 24 h después del tratamiento. Una alícuota de 30 μl de sangre heparinizada se mezcló con 140 μl de agarosa de bajo punto de fusión (1.5 %) a 37°C y se extendió rápidamente sobre portaobjetos, previamente recubiertas con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1.5%. Después de solidificar se retiraron los cubreobjetos y los portaobjetos se colocaron en solución de lisis fría (NaCl 2.5 M,

2.5 M EDTA, Tris 10 mM, succinato de sodio, 1% de Triton X100 y 10% de dimetilsulfóxido, a pH 10.5 ajustado con NaOH) durante 3 h a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de lisis se sacó los portaobjetos y se sumergieron en la solución de electroforesis (0,4 M NaOH y EDTA 200 mM) durante 20 min. La electroforesis se realizó durante 20 min a 300 mA y 25V. Los portaobjetos se lavaron entonces con la solución de neutralización (Tris-HCl 0.4 M, pH 7.5), se secaron a temperatura ambiente y se fijaron con una solución de etanol y solución de neutralización (50:50) durante 10 min. Los portaobjetos fueron secados y almacenados antes de la tinción con bromuro de etidio. El alcance y la distribución del daño del ADN se evaluaron mediante la selección de 100 células seleccionadas al azar (50 células por portaobjetos codificados) por animal en un análisis ciego (seis ratones por grupo). Estas células se identificaron visualmente, y se dividieron según el tamaño de la cola, en las cuatro clases siguientes: Clase 0 - sin cola; Clase 1 - cola más corta que el diámetro de la cabeza (núcleo); Clase 2 – cola de 1 a 2 veces el diámetro de la cabeza; y la Clase 3 - longitud de la cola más de dos veces el diámetro de la cabeza. Esta clasificación fue propuesta por Alves *et al*, 2014. El número total de cometas se calculó con la siguiente ecuación propuesta por Matic *et al*, 2004: (% De las células en la clase 0 × 0) + (% de las células en la clase 1 × 1) + (% de las células en la clase 2 × 2) + (% de las células en clase 3 × 3).

7.10 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una y dos vías y posteriormente mediante una prueba de diferencias de medias mínimas significativas de (Fisher-LSD por sus siglas en inglés), se observó diferencia significativa ($p < 0.05$). La relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas se realizó mediante una correlación de Pearson. Utilizando el programa Statistica ver 7.0.

Para la determinación de FT y AA se usó un diseño experimental factorial de: $9 \times 4 \times 2 = 72$ tratamientos; donde son 9 plantas x 4 solventes de extracción x duplicado.

$$Y_{ijl} = \mu + P_i + S_j + PS_{ij} + e_l$$

P = plantas

S= solvente de extracción

PS= intersección

i= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9

j= 1, 2, 3 y 4 (etanol 96°, agua, etanol-agua 70:30 v/v y acetato de etilo)

8. Resultados y Discusión

8.1 Determinación de la concentración de FT

Las plantas (frutas, vegetales, hierbas medicinales, etc.) contienen una amplia variedad de moléculas encargadas de eliminar radicales libres, como son los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre otros, los cuales son ricos en actividad antioxidante (Cai 2004; Badami *et al.*, 2003; Bor *et al.*, 2006). Estos compuestos son considerados fisiológicamente y morfológicamente importantes en las plantas Ignat (2011). Además los polifenoles son sustancias activas encontradas en muchas plantas medicinales, modulan la actividad de gran número de enzimas y de receptores celulares.

Los CF en las nueve especies de estudio se muestran en el Cuadro 3. El rango de FT fue de 86.3 ± 21.1 a 577.3 ± 24.9 mg EAG/ g de extracto, el valor menor corresponde al extracto de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) y el mayor al extracto de *Juglans regia* (nogal). Mediante una prueba ANOVA (n=4), seguida por una prueba LSD de grupos homogéneos se observó diferencia (P<0.05) entre las nueve especies de estudio y entre los cuatro solventes de extracción determinando que los valores mayores de CF se obtuvieron utilizando el solvente de acetato de etilo. El efecto concentrador sobre los compuestos fenólicos del acetato de etilo se ha reportado anteriormente por Yen *et al.*, (2001), quienes mencionan que esto se debe básicamente a la polaridad del solvente.

Se ha reportado que los extractos de hojas, fruta y corteza de *Juglans regia*, poseen compuestos fenólicos de importancia biológica (Zhang, 2009; Kiran, 2009; Pereira, 2008; Oliveira, 2008) como son juglonas, 3,3'-bisjuglona, cyclotrijuglona (trisjuglona), aricularina (quercetiina-3-arabinoside), hiperina, ácido elágico, taninos (Jung ., 2011; Cai 2004; Kiran ., 2009).

Se obtuvo un coeficiente de correlación significativo entre fenoles totales FT y flavonoides F (Figura 5). Los flavonoides son un grupo de compuestos que pertenecen a los fenoles, por lo que muchos de los fenoles de las plantas en estudio corresponden a compuestos flavonoides. Algunos ejemplos de estos son catequina, quercetina y kamferol. Químicamente los flavonoides e isoflavonoides son donadores de electrones (Sun ., 2011). De acuerdo a un ANOVA el extracto de *Mangifera indica L.* y el extracto de *Juglans regia* fueron los que contienen la mayor concentración de F.

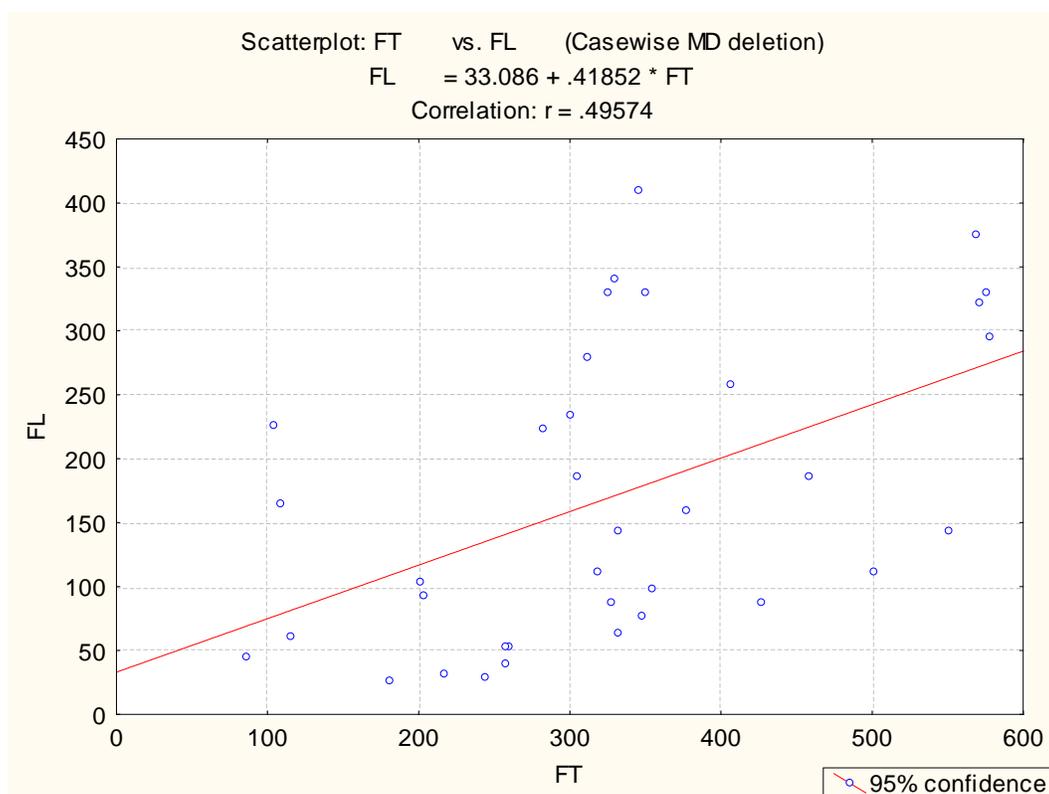


Figura 5. Correlación entre FT y F, N= 36

Los resultados en cuanto a la concentración de F en *M. indica L.*, en ambas variedades, concuerdan con otros reportados anteriormente, en los que se ha encontrado que la corteza de mango es una rica fuente de CF y mencionan también que la mangiferina es el mayor componente de la corteza Benites *et al.*, (2010). Con respecto a los CF presentes en la corteza de *M. indica L.*, la mayor información

proviene de Cuba, donde se comercializa un producto llamado Vimang, el cual es un extracto preparado a partir de corteza de ciertos cultivares de *M. indica* L. Éste extracto contiene los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, metil galato, epicatequina, catequina y mangiferina Barreto *et al.*, (2008).

Los resultados de las concentraciones de Proantocianidinas (P) se muestran en la Cuadro 3, los cuales nos indican que el mejor extracto fue de *Juglans regia*, seguido de *Nephelium lappaceum* y *Cedrela odorata*. Mediante un ANOVA, se observó que no existe diferencia significativa entre los solventes de extracción etanol 96°, etanol-agua (70:30 v/v) y de acetato de etilo, por el contrario el extracto acuoso fue el único que mostró diferencia estadística, y con el que se observó una menor concentración de P.

Estos compuestos son un tipo de flavonoides llamados flavonoles, los cuales existen en forma monomérica (catequinas) y en la forma polimérica P (Manach ., 2004.) De acuerdo con nuestros resultados, los extractos de *Juglans regia*, *Cedrela odorata* y *Nephelium lappaceum* pueden ser considerados como una fuente accesible de polifenoles, los cuales coinciden con estudios previos donde se han reportado altas cantidades de compuestos fenólicos en extractos de corteza de *Juglans regia* (Zhang *et al.*, 2009), *Cedrela odorata* y en la cáscara de *Nephelium lappaceum* (Thitilertdecha ., 2008).

Cuadro 3. Determinación de FT, F y P de plantas de estudio

EXTRACTO	Solvente	FT mg EAG/ g de extracto	F mg EC/ g de extracto	PA mg EC/ g de extracto
<i>Punica granatum</i>	1	215.7 ± 19.8	32.1 ± 5.1	40.2 ± 7.0
	2	179.7 ± 4.0	26.8 ± 3.7	44.6 ± 5.5
	3	243.7 ± 14.0	29.7 ± 4.9	50.7 ± 10.6
	4	501.0 ± 17.4	111.7 ± 17.5	101.0 ± 9.4
<i>Nephelium lappaceum</i>	1	347.2 ± 11.1	77.2 ± 3.3	95.7 ± 11.8
	2	353.7 ± 15.1	97.6 ± 14.9	98.2 ± 4.1
	3	426.0 ± 13.3	88.5 ± 3.7	90.2 ± 11.3
	4	575.0 ± 16.5	128.2 ± 19.7	115.2 ± 4.5
<i>Garcinia mangostana</i>	1	201.8 ± 14.6	104.9 ± 6.1	174.6 ± 14.0
	2	328.1 ± 18.8	107.0 ± 15.1	294.7 ± 5.3
	3	318.4 ± 11.5	112.5 ± 11.5	244.9 ± 23.7
	4	458.2 ± 16.2	186.6 ± 17.3	299.7 ± 9.3
<i>Cedrela odorata</i>	1	203.2 ± 18.0	94.3 ± 10.3	144.6 ± 16.1
	2	332.4 ± 10.9	144.3 ± 10.3	180.0 ± 9.1
	3	549.6 ± 20.7	144.6 ± 10.5	266.7 ± 10.7
	4	304.9 ± 12.1	186.4 ± 19.7	313.2 ± 11.3
<i>Arctostaphylos punges</i>	1	257.2 ± 8.2	40.5 ± 3.0	101.0 ± 8.6
	2	332.4 ± 19.3	64.0 ± 9.2	86.2 ± 22.8
	3	260.3 ± 9.8	53.8 ± 1.6	142.7 ± 34.8
	4	256.1 ± 15.1	52.1 ± 7.5	171.2 ± 16.5
<i>Mangiferina indica L</i> <i>Var manila</i>	1	299.1 ± 17.2	235.9 ± 10.2	105.7 ± 7.1
	2	348.8 ± 22.5	330.0 ± 37.1	150.3 ± 37.1
	3	330.2 ± 15.9	341.6 ± 14.3	148.5 ± 35.8
	4	346.1 ± 14.7	410.6 ± 28.8	172.3 ± 6.6
<i>Mangiferina indica L</i> <i>Var Tommy A.</i>	1	282.7 ± 16.2	223.0 ± 11.1	99.8 ± 3.4
	2	103.1 ± 10.6	227.7 ± 14.2	135.3 ± 36.9
	3	312.0 ± 18.5	280.8 ± 18.5	123.3 ± 21.9
	4	325.6 ± 10.9	330.8 ± 8.6	144.0 ± 12.1
<i>Juglans regia</i>	1	405.7 ± 23.0	257.4 ± 17.0	198.7 ± 2.7
	2	577.3 ± 24.9	296.5 ± 10.0	538.9 ± 72.6
	3	570.3 ± 13.4	321.2 ± 15.8	548.7 ± 59.0
	4	568.7 ± 15.3	374.8 ± 7.6	443.0 ± 24.0
<i>Eryngium heterophyllum.</i>	1	86.3 ± 21.1	46.2 ± 5.6	ND
	2	115.6 ± 6.1	61.9 ± 2.5	ND
	3	107.4 ± 7.0	165.4 ± 17.5	ND
	4	376.7 ± 20.6	158.9 ± 21.6	ND

Solvente: (1) agua, (2) etanol 96°, (3) etanol-agua 70:30 y (4) acetato de etilo. Los resultados son la media (n=4) ± SD. ND= no detectado

8.2 Determinación de la Actividad Antioxidante (AA)

8.2.1 Determinación de AA mediante la Técnica de Eliminación del DPPH

Mediante esta técnica los antioxidantes reaccionan con el DPPH y lo convierten en 1,1-difenil-2-(2, 4, 6-trinitrofenil) hidracina, el cual produce un color amarillo que se detecta a 515 nm y se compara contra un color inicial púrpura oscuro, Mukherjee ., (2009), los resultados se reportan en IC₅₀ (µg/ml) en el Cuadro 4. Se observó una correlación negativa entre los valores de FT y DPPH ($r^2=0.43$, $p<0.05$, $n=36$). La correlación fue negativa debido a que los valores se reportan como IC₅₀, la cual representa la cantidad de extracto o muestra requerido para atrapar el 50% de radicales libres, por lo tanto una IC₅₀ menor representa una mayor actividad antioxidante.

Cuadro 4. Actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH en las especies de estudio

Planta	IC ₅₀ (µg/ml)			
	Solvente			
	1*	2**	3**	4***
<i>Punica granatum</i> ^c	841.5 ± 3.6	880.6 ± 16.6	696.5 ± 13.0	261.7 ± 15.5
<i>Nephelium lappaceum</i> ^a	385.1 ± 0.5	428.1 ± 8.1	391.0 ± 6.0	244.5 ± 13.3
<i>Garcinia mangostana</i> ^d	1135.7 ± 3.0	986.2 ± 56.4	986.4 ± 66.3	536.0 ± 30.1
<i>Cedrela odorata</i> ^{cd}	1385.4 ± 31.8	645.5 ± 22.0	654.2 ± 21.9	739.1 ± 54.4
<i>Arctostaphylos punges</i> ^b	743.9 ± 20.5	519.3 ± 38.7	553.6 ± 2.0	490.9 ± 43.4
<i>M. indica Var manila</i> ^b	603.6 ± 7.9	515.4 ± 5.2	597.3 ± 10.9	522.3 ± 31.2
<i>M. indica Var tommy</i> ^b	604.5 ± 10.4	604.5 ± 10.4	502.6 ± 14.0	544.5 ± 22.5
<i>Juglans regia</i> ^a	517.7 ± 12.2	323.2 ± 4.0	373.8 ± 4.9	331.2 ± 4.7
<i>Eryngium heterophyllum</i> ^e	2992.3 ± 189.5	2748.8 ± 50.4	2316.9 ± 81.8	1255.1 ± 0.2

Solvente: (1) agua, (2) etanol 96°, (3) etanol-agua 70:30 y (4) acetato de etilo. Los valores representan la media de las determinaciones por duplicado ± SD, las letras diferentes después de cada planta representa diferencia significativa ($P < 0.05$), al igual que el número de * después del tipo de solvente, mediante una prueba Fisher LSD de grupos homogéneos.

De acuerdo al análisis de varianza realizado para medir AA mediante DPPH se observó que con el solvente de acetato de etilo se obtuvo una mayor AA en comparación con los otros solventes ($P < 0.05$). Cabe mencionar que la concentración de FT también fue mayor con dicho solvente. Al-Laith, (2010), reportó anteriormente que una mayor eliminación del radical DPPH se ve influenciado cuando la estructura química de fenoles y flavonoides posee grupos hidroxilo en posición orto en los anillos aromáticos, así como también con un mayor número de estos grupos.

Los extractos de nogal y de rambután mostraron la mejor capacidad antioxidante mediante la técnica de atrapamiento del DPPH.

Palanisamy *et al.*, (2008) reportaron anteriormente que la cáscara de rambután, la cual normalmente es desechada por ser un residuo agroforestal contiene una actividad antioxidante extremadamente alta al ser probada por varios métodos. Lo cual coincide con los resultados encontrados en este trabajo de investigación. La cáscara de rambután podría ser una fuente de antioxidantes naturales y aprovechar tecnológicamente este desecho agroforestal.

8.2.2 Determinación de la AA mediante el Método de decoloración del β -caroteno

En cuanto a los resultados de la capacidad antioxidante mediante la técnica de β -caroteno (cuadro 5), se pudo ver que el mejor extracto para inhibir en un mayor grado la oxidación fue el extracto de Rambután, a diferencia de los otros extractos (valor de p), y al igual que en los resultados anteriores, el solvente con el que se observó mayor actividad fue el acetato de etilo ($p < 0.05$). Es importante mencionar que entre los otros tres solventes de extracción no se encontró ninguna diferencia significativa. Mediante esta técnica se mide la habilidad para minimizar la oxidación

del complejo ácido linoléico y β -caroteno en un sistema acuoso emulsificado Mukherjee ., (2009).

Cuadro 5. Actividad antioxidante mediante las técnicas β caroteno, NO y ABTS

Planta	Solvente	β caroteno % AA	NO % ARL	ABTS % ARL
<i>Punica granatum</i>	1	6.4 \pm 1.4	57.4 \pm 2.0	38.7 \pm 4.3
	2	6.3 \pm 1.6	61.7 \pm 1.3	30.7 \pm 2.8
	3	7.4 \pm 0.7	56.8 \pm 1.7	44.4 \pm 1.8
	4	24.1 \pm 5.0	57.6 \pm 4.9	98.9 \pm 1.1
<i>Nephelium lappaceum</i>	1	58.8 \pm 17.9	51.0 \pm 9.2	71.8 \pm 6.7
	2	44.3 \pm 9.3	55.2 \pm 2.9	75.9 \pm 7.8
	3	48.4 \pm 12.1	56.9 \pm 1.4	71.6 \pm 7.2
	4	91.3 \pm 0.3	50.6 \pm 3.8	97.0 \pm 3.1
<i>Garcinia mangostana</i>	1	10.7 \pm 3.3	23.2 \pm 2.1	38.2 \pm 1.2
	2	18.0 \pm 6.0	54.3 \pm 7.6	44.1 \pm 1.1
	3	12.9 \pm 4.3	50.6 \pm 13.2	37.1 \pm 1.4
	4	19.7 \pm 5.6	57.9 \pm 1.8	68.0 \pm 2.4
<i>Cedrela odorata</i>	1	7.1 \pm 0.5	23.9 \pm 1.5	26.8 \pm 2.8
	2	9.5 \pm 0.5	51.0 \pm 4.2	52.6 \pm 5.2
	3	10.4 \pm 0.3	58.1 \pm 2.1	50.9 \pm 3.8
	4	9.5 \pm 0.5	59.7 \pm 3.1	54.2 \pm 6.6
<i>Arctostaphylos punges</i>	1	11.7 \pm 2.4	50.1 \pm 10.3	50.7 \pm 4.7
	2	9.9 \pm 2.6	52.2 \pm 6.3	59.9 \pm 5.6
	3	11.6 \pm 1.7	54.4 \pm 5.3	59.6 \pm 7.0
	4	11.8 \pm 1.5	52.9 \pm 7.2	63.9 \pm 7.9
<i>M. indica Var manila^b</i>	1	8.9 \pm 2.0	42.6 \pm 5.8	50.1 \pm 5.0
	2	8.9 \pm 0.4	57.3 \pm 1.7	55.6 \pm 4.5
	3	9.7 \pm 2.2	62.0 \pm 3.3	56.9 \pm 3.4
	4	9.0 \pm 1.6	62.1 \pm 4.3	53.4 \pm 2.1
<i>M. indica Var tommy^b</i>	1	9.2 \pm 0.7	39.6 \pm 7.8	46.7 \pm 4.0
	2	8.5 \pm 3.0	55.5 \pm 2.0	43.9 \pm 5.5
	3	7.1 \pm 1.7	59.0 \pm 3.9	58.7 \pm 6.2
	4	7.1 \pm 2.1	59.3 \pm 4.1	62.9 \pm 4.9
<i>Juglans regia</i>	1	14.0 \pm 3.8	42.5 \pm 10.5	62.8 \pm 8.5
	2	13.4 \pm 1.4	56.7 \pm 1.1	88.5 \pm 8.0
	3	12.5 \pm 0.9	54.7 \pm 2.5	69.1 \pm 8.5
	4	14.1 \pm 1.0	54.4 \pm 2.7	85.1 \pm 10.5
<i>Eryngium heterophyllum</i>	1	8.7 \pm 3.9	9.4 \pm 5.2	37.0 \pm 2.1
	2	5.3 \pm 4.1	20.3 \pm 6.0	46.0 \pm 3.1
	3	6.2 \pm 4.3	15.3 \pm 5.3	50.0 \pm 3.2
	4	6.3 \pm 3.3	32.5 \pm 5.1	93.4 \pm 1.5

Solvente: (1) agua, (2) etanol 96°, (3) etanol-agua 70:30 y (4) acetato de etilo. Los valores representan la media de n=4 \pm SD.

8.2.3 Determinación de la AA mediante Método del Óxido Nítrico (NO)

La capacidad de eliminación del NO de las especies de estudio se muestra en el Cuadro 5. Mediante un ANOVA con una prueba de LSD-Fisher se observaron diferencias entre las especies de estudio. En cuanto a los solventes de extracción, solamente el solvente acuoso fue estadísticamente diferente de los otros tres extractos ($P < 0.05$). El extracto de granada fue el que demostró un mejor efecto en esta determinación con un promedio de 58.4% ARL Rajan ., (2011) reportó anteriormente que la granada tiene una gran actividad de eliminación del NO con un 73.03% ARL en un extracto alcohólico. Al hacer una correlación con FT y NO se encontró un coeficiente de correlación significativo ($R^2 = 0.25$), lo que nos indica que este efecto está relacionado a los CF encontrados en la cáscara de granada. ¿Por qué en las mediciones anteriores de AA no realizaste esta misma correlación con FT mostrada en amarillo?

Recientes estudios han demostrado que las especies de nitrógeno reactivas (ENR), como el óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO^-) y dióxido de nitrógeno (NO_2) tienen un rol importante en el proceso inflamatorio y posiblemente en carcinogénesis. Lansky & Newman 2007 reportaron que la granada contiene CF como Catequinas, Epicatequina y Epigallocatequina-3-galato, compuestos a los cuales se les atribuyen propiedades antioxidantes capaces de inhibir la producción del NO. Chan, ., (1997), encontraron que la epigallocatequina galato puede inhibir la actividad de la enzima *óxido nítrico sintasa* y la expresión de su mRNA en macrófagos LPS activados.

8.2.4 Determinación de AA Mediante la Eliminación del Radical ABTS

El ABTS es uno de los radicales generalmente usado para las pruebas preliminares de actividad de eliminación de radicales de un compuesto o de un extracto de planta. El radical $ABTS^{\circ+}$, generado a partir de la oxidación del ABTS por el persulfato de potasio, es una excelente herramienta para determinar la capacidad antioxidante de los donadores de hidrógenos (eliminadores de radicales en fase acuosa) y de antioxidantes que cortan reacciones en cadena (eliminadores de radicales peroxil lipídicos) Nithiyantham *et al.*, (2013). Los porcentajes de atrapamiento del radical (% ARL) ABTS se pueden observar en el cuadro 5. Se encontró mediante un ANOVA que los extractos de nogal y de rambután mostraron un mayor % ARL (76.4% y 79.1%, respectivamente) y son estadísticamente diferentes a las otras especies de estudio ($p < 0.05$).

Así mismo, se observó que hubo diferencia significativa entre los solventes de extracción, el mejor fue el acetato de etilo (valor de $p?$), y el solvente acuoso mostró la menor actividad de eliminación del radical ABTS.

Los coeficientes de correlación de FT y AA se muestran en la Figuras 6 y 6-1, en la que se observó una correlación significativa ($p < 0.05$) entre FT y los cuatro métodos que se utilizaron para medir AA. Éste resultado concuerda con lo reportado anteriormente acerca de las sustancias fenólicas que poseen efectos biológicos, atribuidos principalmente a sus AA de atrapamiento de radicales libres, inhibición de peroxidación, quelación de metales de transición, entre otras (Bahman ., (2007).

El factor por el cual los CF poseen un alto potencial de eliminación de RL puede ser explicado gracias a su habilidad de donar un átomo de hidrógeno de sus grupos hidroxilo (Thitilertdech ., 2008).

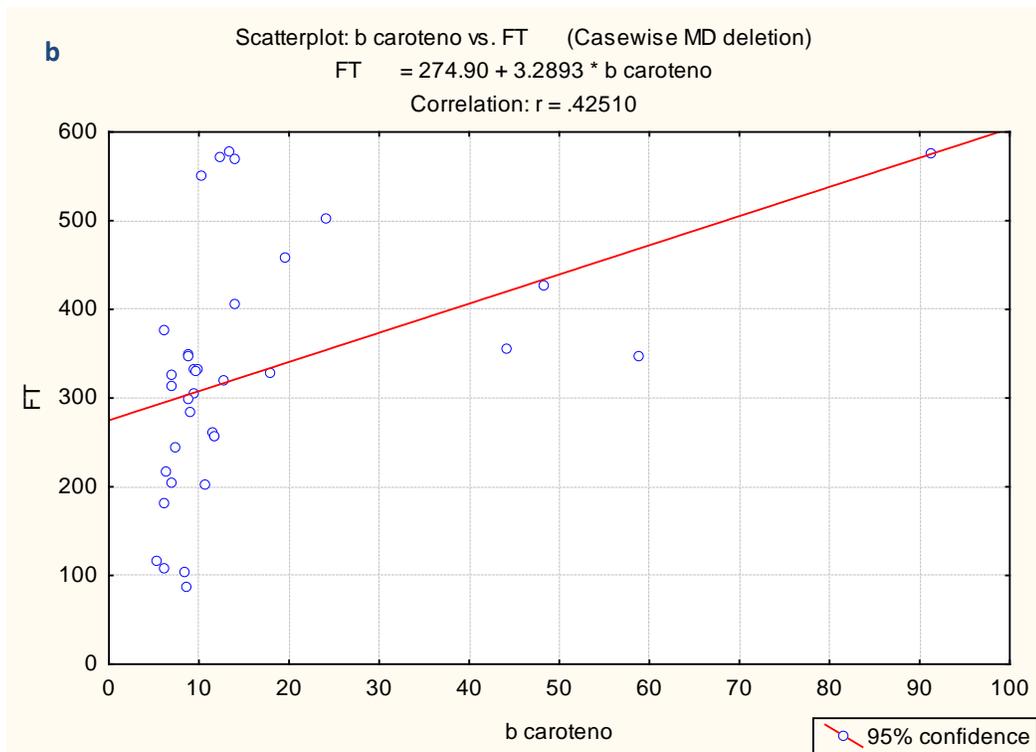
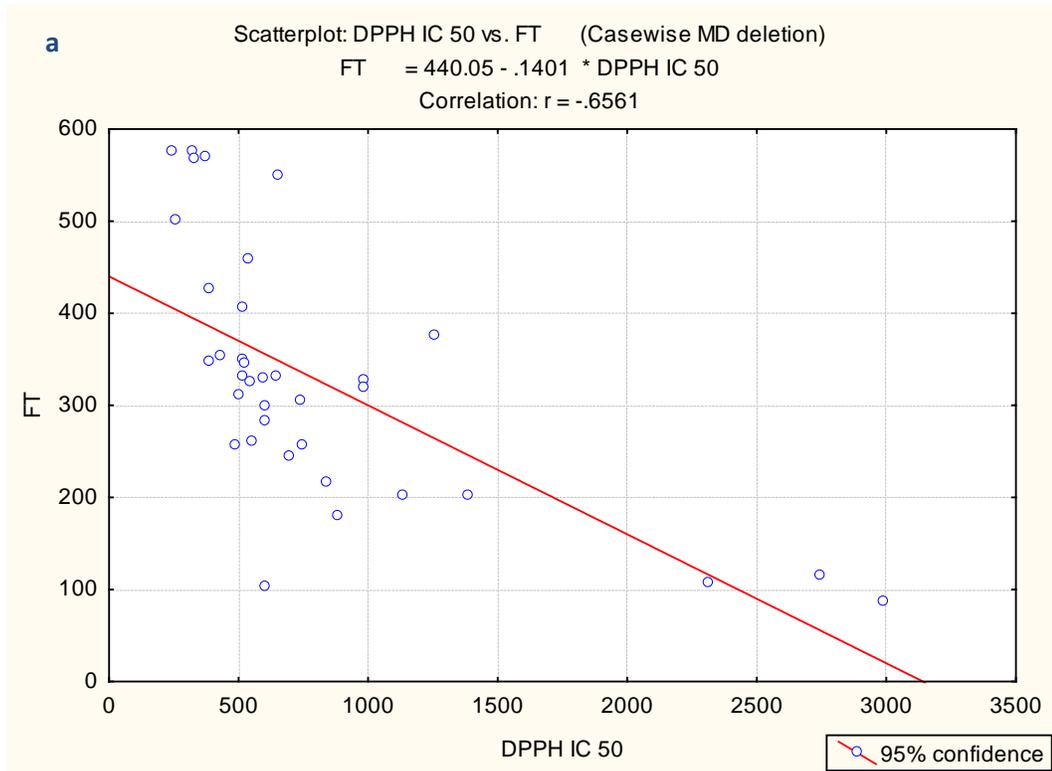


Figura 6. Correlación entre Fenoles Totales (FT) y Actividad Antioxidante; a) DPPH-FT ($r^2=0.43$, $p<0.05$, $n=36$), b) β caroteno-FT ($r^2=0.18$, $p<0.05$, $n=36$)

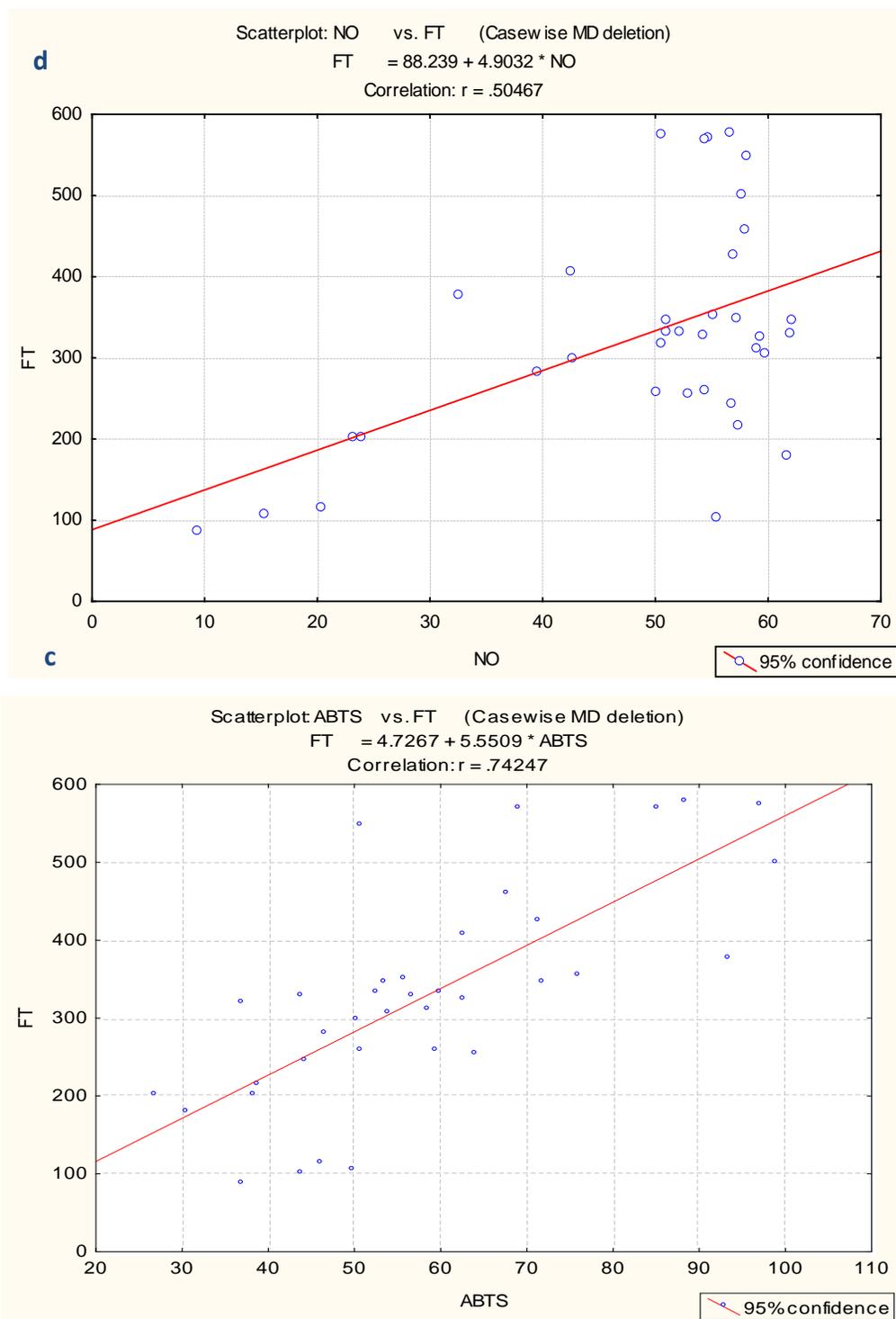


Figura 6-1. Correlación entre Fenoles Totales (FT) y Actividad Antioxidante;
 a) ABTS-FT ($r^2=0.55$, $p<0.05$, $n=36$), b) NO-FT ($r^2=0.25$, $p<0.05$, $n=36$)

8.3 Evaluación del Efecto hipoglucémico

8.3.1 Actividad hipoglucemiante

Para medir la actividad hipoglucemiante se probaron 9 extractos de los 36 iniciales, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a los resultados de fenoles totales y actividad antioxidante. Se eligió un extracto de cada planta obtenido solo con el solvente de extracción que mostró mejores resultados. Con estos 9 extractos se realizó una curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar (macho) con un peso promedio de 300 g, los niveles de glucosa fueron monitoreados una vez de haber administrado el extracto y la glucosa al 35%. Estos valores se pueden observar en la Figura 7. Una vez graficados los valores de glucosa se determinó el área bajo la curva y se realizó una prueba de ANOVA (Cuadro 6).

De acuerdo al análisis de varianza realizado en los valores de AUC correspondiente a la actividad hipoglucemiante de los extractos, se pudo observar que *Juglans regia* y *Cedrela odorata* mostraron el mejor efecto hipoglucemiante al obtener los valores más bajos de AUC 88.8 ± 5.8 y 94.3 ± 17.2 (g/L min), respectivamente, y se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo al cual no se le administró ningún extracto.

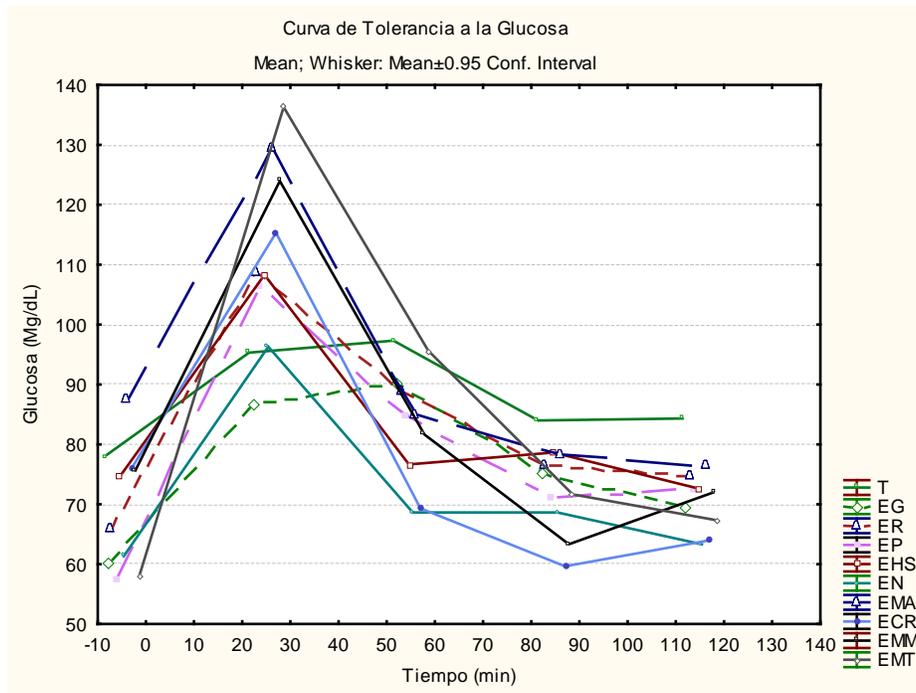


Figura 7. Curva de tolerancia a la glucosa de los extractos de estudio

Cuadro 6. Área Bajo la Curva (AUC) a partir de la Figura 7.

Planta	AUC (g/L min)
Testigo	107.3 ± 3.0 a
<i>Punica granatum</i>	95.1 ± 7.4 ab
<i>Nephelium lappaceum</i>	103.3 ± 14.1 ab
<i>Garcinia mangostana</i>	110.6 ± 14.1 a
<i>Cedrela odorata</i>	94.3 ± 17.2 b
<i>Arctostaphylos punges</i>	98.3 ± 4.3 ab
<i>M. indica Var manila</i>	102.8 ± 1.8 ab
<i>M. indica Var tommy</i>	109.9 ± 6.0a
<i>Juglans regia</i>	88.8 ± 5.8b
<i>Eryngium heterophyllum</i>	101.2 ± 12ab

Los valores representan la media ± SD. Letras diferentes representan diferencia significativa (P<0.05) mediante una prueba Fisher.

8.3.2 Efecto hipoglucémico

El efecto hipoglucémico de los extractos se muestra en el Cuadro 6. Donde se muestran los niveles de glucemia en los días 1, 2, 3 y 10 de los animales tratados con extracto, y de los grupos testigo con/sin estreptozotocina. Se puede ver las propiedades hipoglucémicas de los extractos, ya que se obtuvo diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante un ANOVA para datos incompletos, mediante una prueba de LSD-Fisher al compararla contra el grupo de animales a los que se les indujo diabetes con la estreptozotocina, cabe mencionar que se realizó este tipo de análisis debido a que durante el periodo de estudio murieron algunos animales, un animal en cada una de los grupos que recibieron extracto y dos animales en el grupo que no recibió tratamiento esto debido al efecto tan dañino que provocó la estreptozotocina. Los resultados mostraron que el extracto de *Juglans regia* fue el que tuvo el mejor efecto hipoglucemiante (valor de p).

Cuadro 7. Niveles de Glucemia durante el tiempo de estudio (10 días) en Ratas Winstar

Muestra	Día 1	Día 2	Día 3	Día 10
	Glicemia (mg/dL)	Glicemia (mg/dL)	Glicemia (mg/dL)	Glicemia (mg/dL)
Testigo ^a	90.6 ± 17.0	95.4 ± 5.5	89.0 ± 7.8	73.0 ± 35.3
Testigo c/estreptozotocina ^b	411.4 ± 35.2	434.4 ± 37.9	440.8 ± 35.2	456.6 ± 34.4**
<i>Cedrela odorata</i> ^{ab}	386.3 ± 75.1**	428.0 ± 52.6*	415.8 ± 42.2	447.6 ± 30.0*
<i>Juglans regia</i> ^c	360.2 ± 36.0	390.2 ± 57.0	426.0 ± 22.7	446.3 ± 3.05**

Los valores representan la media de n=5, *n=4, **n=3 ± SD, (n cambia debido a que en algunos casos el valor supero la escala máxima en el glucómetro y/o porque murió un animal). Las letras indican la diferencia ($P < 0.05$), mediante una prueba LSD-Fisher para datos incompletos (ortogonal)

Los resultados obtenidos acerca de las propiedades hipoglucémicas de *J. regia* y *C. odorata* soportan investigaciones realizadas anteriormente donde se ha encontrado que *J. regia* es un agente de antiglicación, proceso mediante el cual ayuda a prevenir la glicación y oxidación, factores involucrados en la progresión de complicaciones de la diabetes (neuropatías, nefropatías, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis), por lo que el extracto de *J. regia* puede tener efecto terapéutico para el tratamiento de las complicaciones de diabetes (Ahmad, 2012). Así mismo Gioardani *et al.*, (2015), concluyeron que extractos de *C. odorata* pueden ser efectivos reduciendo la hiperglicemia postprandial y daño por estrés oxidativo debido a los altos niveles de glucosa en sangre. Estos resultados tomados en conjunto justifican el empleo en etnomedicina de esta planta en el tratamiento de la diabetes, estos autores demostraron que en ensayos *in vitro* de inhibición de la α -glucosidasa extracto de *C. odorata* tuvo un potente efecto inhibitor sobre estas enzimas. La inhibición de la α -glucosidasa intestinal retrasa la digestión y absorción de los hidratos de carbono y en consecuencia suprimen la hiperglicemia postprandial y puede ayudar a explicar el efecto anti-perglicémico.

8.4 Evaluación del Efecto hipocolesterolémico

De acuerdo al análisis del perfil lipídico se obtuvieron los resultados de los niveles séricos de Colesterol Total (CT) que se muestran en la Figura 8. No se encontró diferencia significativa en los niveles de CT entre el testigo que no recibió tiloxapol y las muestras de los animales que recibieron el extracto. Por el contrario, el testigo con tiloxapol (niveles de CT?) es significativamente diferente a todos ($p < 0.05$). Estos resultados mostraron que los extractos de *Juglans regia*, *Cedrela odorata* y de *Eryngium heterophyllum* bajaron los niveles de CT al nivel de los animales que no se les alteró el metabolismo de los lípidos mediante tiloxapol.

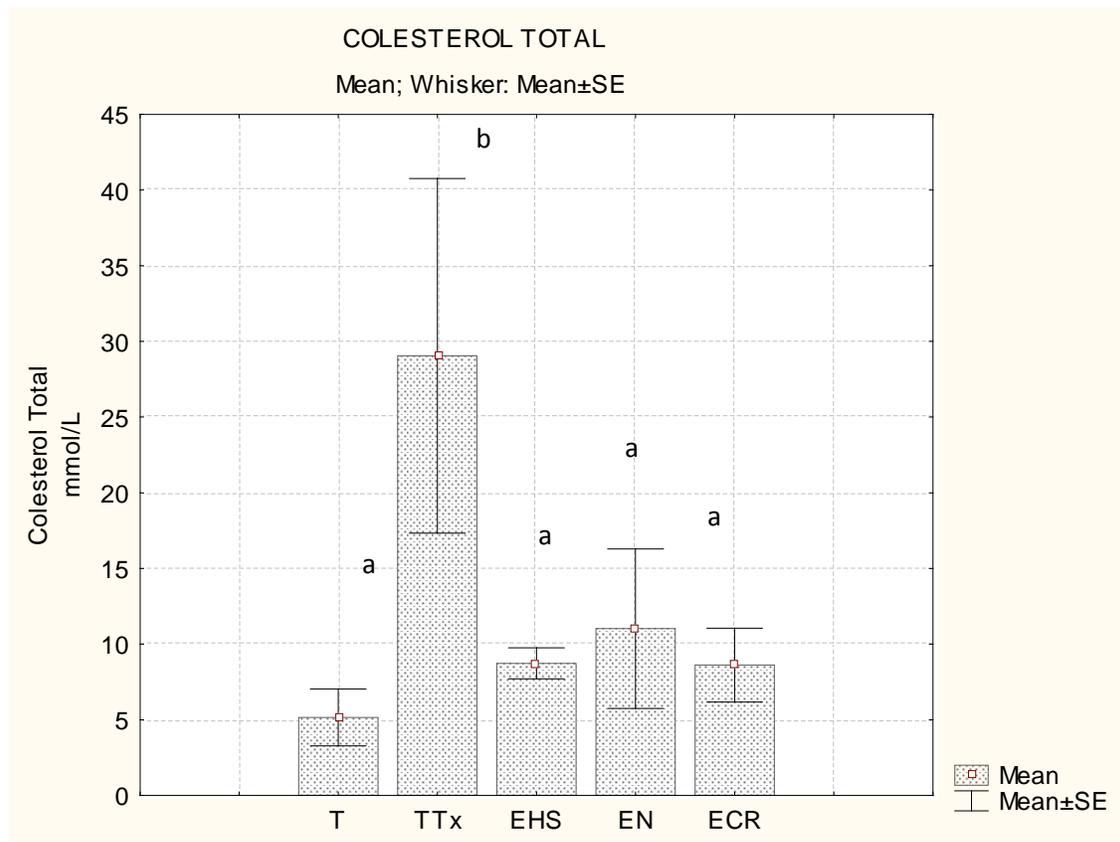


Figura 8. Concentración de colesterol total. T: testigo; TTx: Testigo con Tiloxapol; EHS: *Eryngium heterophyllum*; EN: *Juglans regia*, ECR: *Cedrela odorata*. Diferente letras muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los niveles de Triglicéridos y de colesterol HDL se muestran en la Figura 9. En donde por el contrario no se encontró ninguna diferencia entre el grupo control y el grupo tratado.

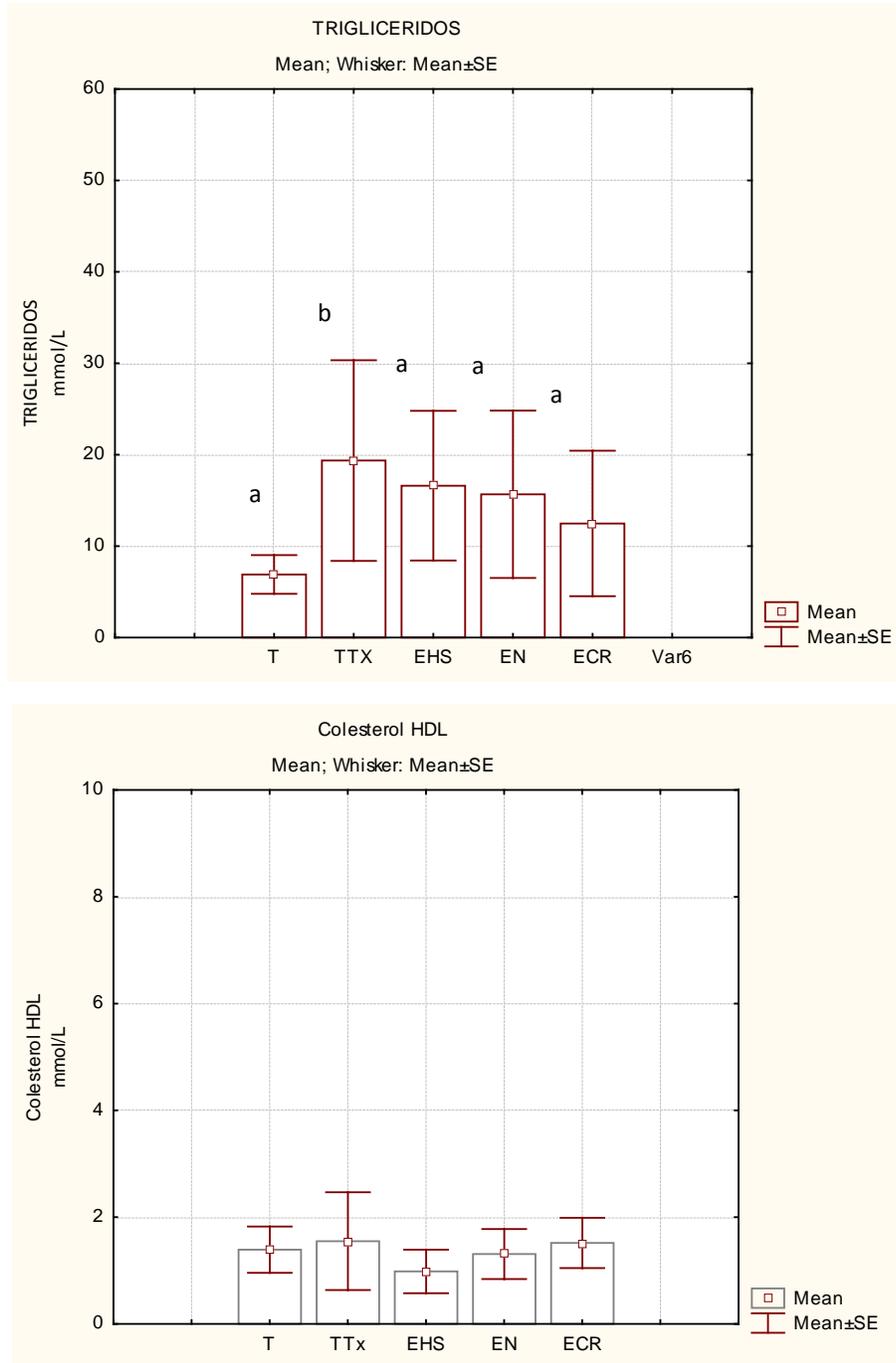


Figura 9. Concentración de triglicéridos y colesterol HDL. T: testigo; TTx: Testigo con Tiloxapol; EHS: *Eryngium heterophyllum*; EN: *Juglans regia*, ECR: *Cedrela odorata*

8.5 Evaluación del Estrés oxidativo *in vivo*

Se observó el nivel de MDA en el hígado de los animales que recibieron extracto y se comparó contra dos grupos control que no recibieron extracto y se les administró tiloxapol o estreptozotocina. El efecto protector de los extractos evaluados se puede observar en la Figura 10.

Mediante una prueba de Fisher se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de MDA de los animales tratados con los extractos y los grupos control y el grupo de animales que recibieron el fármaco correspondiente.

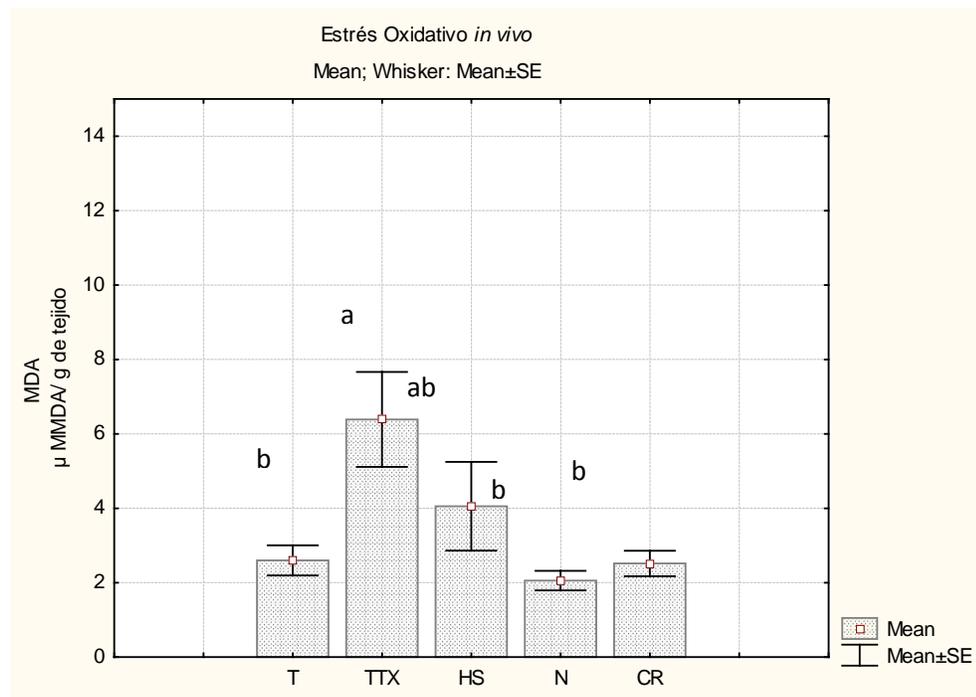


Figura 10. Concentración de MDA de muestras provenientes de la prueba de efecto hipocolesterolémico. T: testigo; TTx: Testigo con Tiloxapol; HS: *Eryngium heterophyllum*; N: *Juglans regia*, CR: *Cedrela odorata*

Mediante esta prueba se pudo comprobar el efecto antioxidante de los extractos de las especies de estudio, ya que los niveles de MDA en el hígado de los animales que recibieron extracto fueron menores.

Es conocido que la lipoperoxidación juega un papel crucial en la inflamación, cáncer y en varias enfermedades cardíacas. Una dieta rica en colesterol resulta en un incremento en la lipoperoxidación por la inducción de la producción de radicales libres, seguido de una hipercolesterolemia, se ha reportado anteriormente la correlación entre la lipoperoxidación y la hiperlipidemia (Alshatwi . (2011). En este estudio se evidenció esta relación ya que los niveles de colesterol total y de lipoperoxidación fueron estadísticamente diferentes entre los animales que recibieron extracto, de los que no recibieron tratamiento.

En las muestras provenientes de la evaluación del efecto hipoglucémico se realizó un ANOVA para datos incompletos (ortogonal) y se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) para los niveles de MDA, esto se puede observar en el Cuadro 8. El extracto de cedro rojo fue el que tuvo el mejor efecto protector contra la lipoperoxidación en hígado, y con el que se observaron niveles menores de MDA, en comparación con los testigos con y sin fármaco.

Cuadro 8. Niveles de MDA en muestras provenientes de la evaluación del efecto hipoglucémico.

Muestra	MDA (mMMDA/g tejido)
<i>Cedrela odorata</i>	4.7 a
<i>Juglans regia</i>	7.0 ab
Testigo con Estreptozotocina	8.8 b
Testigo	11.6 c

Los valores muestran la media (n=4), letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.6 Evaluación de Genotoxicidad

El efecto genotóxico se evaluó en los extractos que mostraron tener propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas y en los cuales se vio efecto inhibitorio de estrés oxidativo. Los extractos fueron de *Juglans regia* (acetato de etilo) y *Cedrela odorata* (etanol agua 70:30 v/v). Existe muy poca o nula información acerca de la genotoxicidad en las cortezas de ambas plantas, de ahí la importancia de realizar esta parte de la investigación, ya que mostraron tener propiedades farmacológicamente importantes. Los resultados del ensayo cometa son ilustrados en el Cuadro 8, donde se demostró que la exposición *in vivo* de extracto de *Juglans regia* a dosis de 100 y 200 mg/kg no inducen daño al ADN en leucocitos de ratón ya que no se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control negativo y el grupo administrado con *Juglans regia*. El total de cometas de clase 0 fue predominante, lo que nos indica que el nivel de daño fue muy bajo así como el número total de cometas. Los núcleos de células provenientes del control negativo se ilustran en la figura 11.

Cuadro 9. Evaluación de daño a DNA de los extractos de *Juglans regia* y *Cedrela odorata* mediante la técnica del cometa

Tratamientos	Total de cometas	Clase Cometa			
		0	1	2	3
Muestras de sangre (4h)*					
Control negativo	40.50 ± 21.41 ^a	77.00 ± 9.38 ^a	10.66 ± 4.08 ^a	7.16 ± 5.60 ^{ab}	5.16 ± 3.54 ^a
CPA 50 mg/kg	170.16 ± 12.31 ^c	5.00 ± 2.28 ^c	39.0 ± 7.01 ^d	36.83 ± 5.52 ^d	19.16 ± 3.12 ^b
<i>J. regia</i> 100 mg/kg	64.00 ± 52.44 ^a	60.8 ± 25.4 ^a	20.8 ± 6.83 ^b	12.00 ± 11.22 ^{ab}	6.40 ± 8.29 ^a
<i>C. odorata</i> 100 mg/kg	31.83 ± 8.93 ^a	73.33 ± 6.56 ^a	19.83 ± 3.86 ^b	5.50 ± 5.24 ^a	0.33 ± 0.18 ^a
<i>J. regia</i> 200 mg/kg	58.66 ± 20.83 ^a	65.50 ± 8.07 ^a	15.50 ± 5.00 ^{ab}	13.83 ± 9.97 ^b	5.16 ± 3.60 ^a
<i>C. odorata</i> 200 mg/kg	109.50 ± 30.48 ^b	39.16 ± 10.94 ^b	25.66 ± 4.67 ^c	21.66 ± 3.26 ^c	13.5 ± 9.28 ^b
Muestras de sangre (24h)					
Control negativo	15.00 ± 3.79 ^a	87.83 ± 3.37 ^a	9.83 ± 3.54 ^a	1.8 ± 0.75 ^{ab}	0.50 ± 0.83 ^a
CPA 50 mg/kg	96.83 ± 8.93 ^c	29.5 ± 5.08 ^c	47.33 ± 7.14 ^c	20.00 ± 4.56 ^c	3.16 ± 1.94 ^b
<i>J. regia</i> 100 mg/kg	9.4 ± 7.53 ^a	90.8 ± 7.25 ^a	8.60 ± 6.54 ^a	0.40 ± 0.89 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
<i>C. odorata</i> 100 mg/kg	12.33 ± 4.17 ^a	88.83 ± 3.43 ^a	10.00 ± 2.96 ^a	1.16 ± 1.16 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^a
<i>J. regia</i> 200 mg/kg	11.83 ± 4.40 ^a	89.16 ± 3.86 ^a	9.83 ± 3.48 ^a	1.00 ± 0.89 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^a
<i>C. odorata</i> 200 mg/kg	29.33 ± 15.88 ^b	74.66 ± 11.96 ^b	21.16 ± 8.95 ^b	3.83 ± 3.86 ^b	0.16 ± 0.40 ^a

Los resultados se expresan como la media ± error estándar. Letras diferentes entre los grupos en cada columna corresponden a diferencias significativas a 4 y 24 horas $P < 0.5$. Se realizó un ANOVA de una vía y una prueba de Fisher LSD, comparando de los tratamientos por separado a las 4 y 24 horas.

En lo que concierne al extracto de *Cedrela odorata* se observó un ligero daño a dosis de 200 mg/kg el cual fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al control negativo, sin embargo el nivel de daño a DNA no alcanzó el nivel de daño inducido con CPA (Figura 13), donde se observó diferencia significativa entre ambos grupos. El comportamiento del extracto de *Cedrela odorata* a dosis de 100 mg/kg no mostró tener ningún efecto genotóxico, ya que no se encontró diferencia significativa con el grupo control negativo. Las imágenes se muestran en la Figura 14. La mayoría de los cometas observados fue del tipo 0 en ambos extractos, lo cual nos sugiere que no se observó daño a nivel de DNA, mediante la técnica del cometa a las dosis empleadas en este estudio.

La búsqueda de tratamientos médicos basados en la medicina alternativa ha aumentado considerablemente y un mayor conocimiento sobre las plantas de uso común en la medicina popular es extremadamente importante. Algunas actividades

antimutagénicas se han correlacionado con la presencia de ciertas sustancias fitoquímicas como compuestos flavonoides. Una relación se ha informado entre estructura y actividad, tanto para la actividad mutagénica y para la protección del material genético. La mayoría de estos efectos benéficos para la salud se cree que derivan de las propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres, así como la capacidad de regular muchas funciones enzimáticas celulares (Matić *et al.*, 2013).

Los biomarcadores son medidas que cuantifican más o menos la exposición específica, el efecto biológico temprano, y la susceptibilidad de un extracto. El ensayo cometa es un biomarcador de exposición. Los marcadores de exposición abarcan: productos químicos o metabolitos de los mismos, de proteínas y de aductos de ADN, incluyendo tipos de lesiones del ADN detectados por el ensayo de cometa. El ensayo cometa es un ensayo biomarcador de exposición que proporciona información de la dosis biológicamente efectiva. Los biomarcadores de efecto biológico temprano ejemplo aberraciones cromosómicas y la frecuencia de micronúcleos detectan una etapa de la carcinogénesis, que es temporalmente más tarde de la etapa detectada por los biomarcadores de exposición (Peter Møller, 2006). Los biomarcadores deben ser rigurosamente validados antes de que se apliquen como herramientas en la evaluación del riesgo de las enfermedades causadas por agentes ambientales u otras exposiciones. De ahí la importancia de realizar un ensayo de este tipo para detectar el efecto biológico de los extractos evaluados.

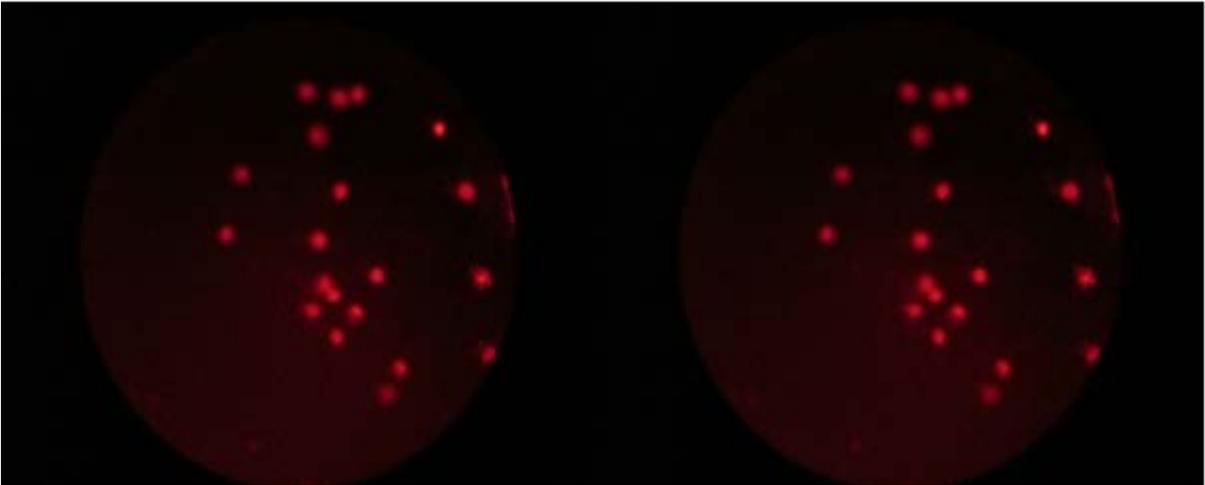


Figura 11. Imágenes de la técnica del cometa de leucocitos de ratón administrados al grupo control negativo.

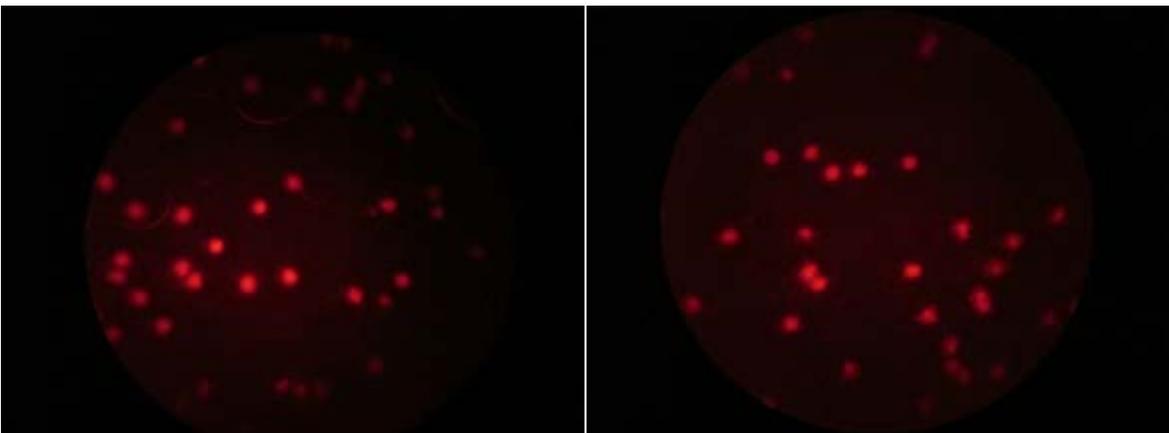


Figura 12. Imágenes de la técnica del cometa de leucocitos de ratón administrados con *J. regia* (400 X) a dosis de 100 y 200 mg/kg.

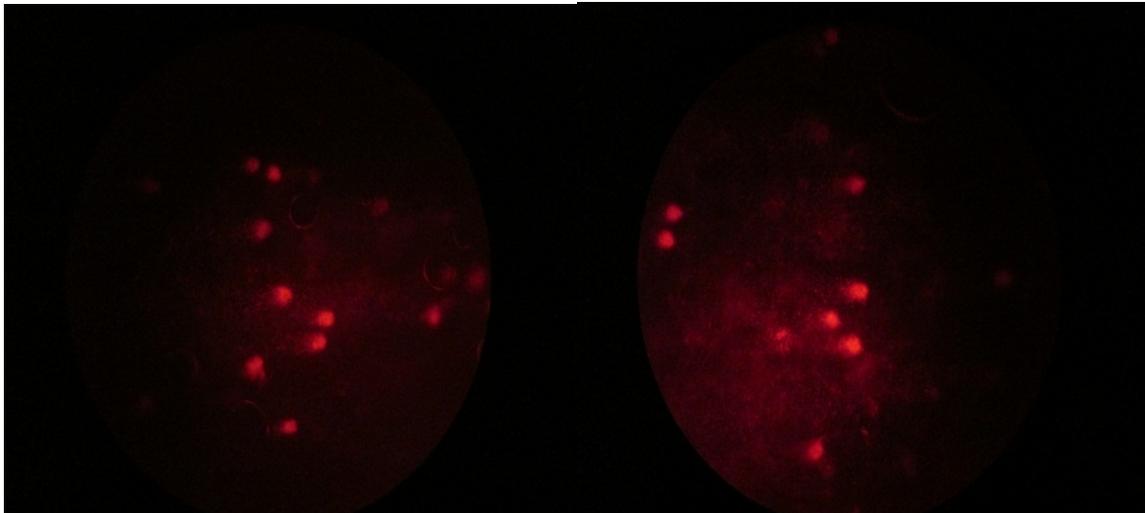


Figura 13. Imágenes de la técnica del cometa (400 X) de leucocitos de ratón con daño inducido con CPA.

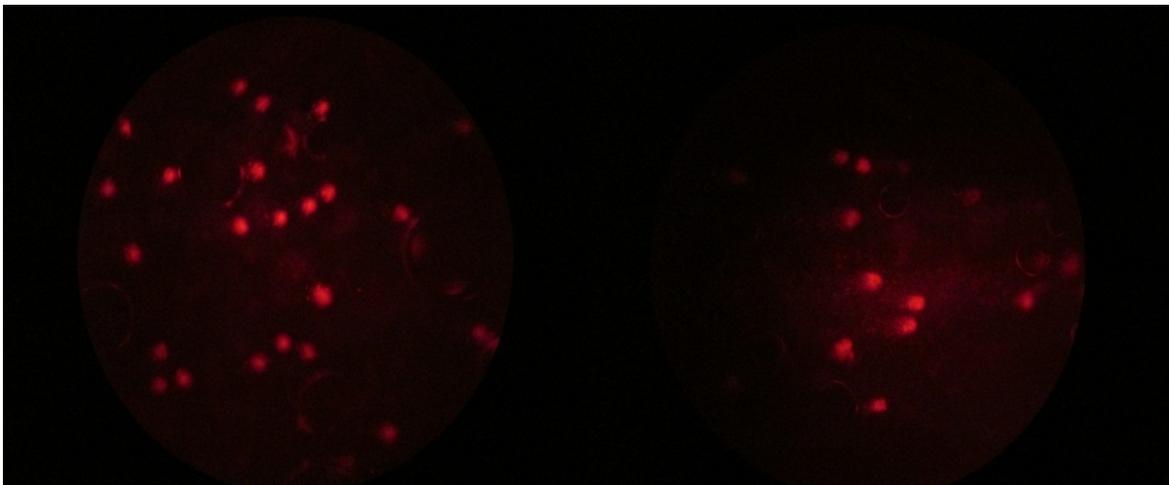


Figura 14. Imágenes de la técnica del cometa de leucocitos de ratón administrados con *C. odorata* (400 X) a dosis de 100 y 200 mg/kg.

No hay evidencia científica donde se haya evaluado el efecto genotóxico de los extractos de cortezas de *J. regia* y *C. odorata*. Este estudio es el primero en el que se probó que estos extractos no son agentes genotóxicos en las dosis evaluadas.

Contrariamente Zaid & Saad, 2013 en un estudio realizado de extractos de hojas de *J. regia* demostraron que dichos extractos protegen contra la toxicidad celular y reducen la toxicidad bioquímica inducida por la ciclofosfamida.

Con los resultados obtenidos se puede asegurar el posible uso de *Juglans regia* en el desarrollo de nuevos fármacos para el control de hiperglucemia e hipercolesterolemia.

9. Conclusiones

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, las especies de estudio demostraron propiedades antioxidantes que están relacionadas significativamente con la presencia de los compuestos fenólicos. Al evaluar la concentración de CF (FT, F y P), se observó que el extracto de Nogal (*Juglans regia*) fue el que mostró las concentraciones más altas en las determinaciones.

Debido a que las reacciones múltiples que participan para estimar antioxidantes involucran varias características y mecanismos de reacción, un simple método para evaluar capacidad antioxidante no podría reflejar con precisión todos los antioxidantes en un sistema mixto debido a la naturaleza compleja de los fitoquímicos. Por lo que en este trabajo de investigación se emplearon diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante de las especies en estudio y efectivamente se observó que el mecanismo antioxidante varía entre cada planta. Mediante la técnica de DPPH el mejor efecto lo mostraron los extractos de Nogal y Rambután, y en el método de β -caroteno fue Rambután, con la técnica de NO el extracto de Granada expuso un % ARL mayor en comparación a las otras especies, y por último en cuanto al % de atrapamiento del radical ABTS los extractos de Nogal y de Rambután fueron estadísticamente mejores.

Sin embargo la relación entre los compuestos fenólicos y las propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas no mostró significancia alguna, por lo cual es importante seguir investigando, cuáles compuestos son los que determinan estas últimas propiedades. De acuerdo a nuestros resultados, tanto el extracto de nogal como el de cedro rojo poseen propiedades biológicamente importantes, y posiblemente éstas están determinadas por compuestos específicos de naturaleza diferente a los compuestos fenólicos en general. Se ha reportado anteriormente que los extractos de cedro rojo y nogal contienen quercetina, un compuesto flavonoide al cual se le atribuyen propiedades antidiabéticas, carcinostáticas, antivirales, supresoras de la proliferación celular, de protección contra la oxidación de LDL, entre otras, Pavanato ., (2007); Omar ., (2010).

El extracto de nogal mostró un mayor efecto hipoglucémico y el cedro rojo mostró el mejor efecto hipocolesterolémico.

El ensayo cometa aplicado para evaluar la genotoxicidad de los extractos que exhibieron propiedades biológicas, demostró que no son agentes genotóxicos en leucocitos de ratón administrados con extractos de *C. odorata* y *J. regia*.

Es importante destacar que los compuestos activos de las plantas con propiedades antioxidantes, hipoglucémicas e hipocolesterolémicas pueden provenir de residuos agroforestales, los cuales podrían considerarse para un aprovechamiento tecnológico y/o médico, en virtud de sus propiedades farmacológicas probadas en este trabajo de investigación.

10. Referencias

Ahmad H, Khan I, Wahid A. 2012. "Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing," J Tradt Chin Med, vol. 32, No. 3, 411–414.

Ali A, Alshatwi & Manal A, Al Obaaid & Sahar A, Al Sedairy & Elango, Ramesh & Kai Y. 2011. Lei Black and green tea improves lipid profile and lipid peroxidation parameters in Wistar rats fed a high-cholesterol diet. J Physiol Biochem, 67, 95-104.

Alves A, Souzados R, S Calil, Niero R, Silva J, Perazzo F, Pires P, Faloni S, Cechinel-Filho V, Maistro E. 2014. Genotoxic assessment of *Rubusimperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. J of Ethnopharmacol, 153, 694–700.

Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., & Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. Industrial Crops and Products, 59, 216-222.

Araujo T, Alencar N, Cavalcanti de Amorim E, Paulino de Albuquerque U. 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. J Ethnopharmacol, 120, 72–80.

Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LA. 2010. Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means of the comet assay. Ars Pharm, Vol. 51 No 1, 49-56.

Artés F., Tudela J. A., Villaescusa R. 2000. Thermal postharvest treatments for improving pomegranate quality and shelf life. *Postharvest Biol. Technol*, 18, 245-251.

Avalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, Serie Fisiología Vegetal 2(3): 119-145.

Badami S, Gupta MK, Suresh B. 2003. Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Strigaoro banchioides*. *J Ethnopharmacol*, 85, 227–230.

Bahman N, Mohammed K, Hamidreza I. 2007. *In vitro* free radical scavenging activity of five salvia species. *Pak. J. Pharm. Sci*, 20, 291–294.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.

Bansal P, Paul P, Mudgal J, Nayak P, Pannakal S, Priyadarsini K, Unnikrishnan M. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pileamicrophylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 64, 651– 658.

Barreto J., Trevisan M., William E. Hull W., Erben G., Edy de Brito, Pfundstein B., Würtele G., Spiegelhalder B., Owen R. 2008. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica*L.) *J. Agric. Food Chem*, 56, 5599–5610.

Benites Vílchez, J., López Vivar, J., Kusch Fuschlocher, F., Gajardo Solari, S., Jorquera Arancibia, G., Salazar Rodríguez, G., & Rojas Arredondo, M. (2010). Antioxidant, antibacterial and analgesic activities of *Mangifera indica* L. extracts. *Biofarbo*, 18, 10.

Benzie I.F. & Strain, 1999. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. The Frap assay. *Anal. Biochem*, 239, 70-76.

Bor J, Chen H, Yen G. 2006. Evaluation of Antioxidant Activity and Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production of Some Common Vegetables. *J. Agric. Food Chem*, Vol. 54, No. 5, 1680-1686.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss.u-Technol*. 28, 25-30.

Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74, 2157–2184.

Čabarkapa A, Živković L, Žukovec D, Djelić N, Bajić V, Dekanski D, Spremo-Potparević B. 2014. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using *in vitro* comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicol in Vitro*, 28, 451–456.

Chan, M. M. Y., Fong, D., Ho, C. T., & Huang, H. I. 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallo catechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol*, 54, 1281–1286.

Chang C, Lin C, G. 2012. Phytochemical Characteristics, Free Radical Scavenging Activities, and Neuroprotection of Five Medicinal Plant Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*, Article ID 984295, 8 pag.

Cheng N, Wang Y, Gao H, Yuan J, Feng F, Cao W, Zheng J. 2013. Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 59, 709–714.

Dalle-Done I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2005. Proteins as Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress In Diseases: The Contribution Of Redox Proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 24, 55–99.

De la Rosa L, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar G. 2010. Fruit and Vegetable Phytochemicals Chemistry, Nutritional Value, and Stability. Blackwell Publishing, Chapter 6, 155-176.

Dixit & Kar A. 2010. Protective Role of Three Vegetable Peels in Alloxan Induced Diabetes Mellitus in Male Mice. *Plant Foods Hum Nutr*, 65, 284–289.

Dixon, R. A., (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843–847

Dorta E, González M, Lobo M, Sánchez-Moreno C, De Ancos B. 2014. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Res Int* 57, 51–60.

Edem D.O. 2009. Hypoglycemic Effects of Ethanolic Extracts of Alligator Pear Seed (*Persea Americana Mill*) in Rats. *Eur J Sci Res*, Vol.33 No.4, 669-678.

Emeka E.J. Iweala, Funmilaya D. Oludare. 2011. Hypoglycemic Effect, Biochemicals and Histological Changes of *Spondias mombin Linn.* And *Parinaripolyandra Benth.* Seeds Ethanolic Extracts in Alloxan-induced Diabetic Rats. *J Pharmacol Toxicol*, 62, 101-112.

Ferrari Carlos K. B. 2004. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, 5, 275–289.

Fischer U, Carle R, Kammerer D. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS. *Food Chem*, 127, 807–821.

Giordani M, Collicchio T, Ascêncio S, Martin B , Balogun S , Costa Bieski I, DaSilva L , Colodel E , LopesdeSouza R, Pereira de Souza D, Aparecida de França S, Balbinotti C, Kawashita N. 2015. Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. *J Ethnopharmacol*, 162, 352–361.

Gupta S, Kim JH, Prasad S, Aggarwal B, 2010. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metast Rev*, 29, 405–434.

Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, De Pascual-Teresa S. 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem* 121, 691–696.

Heimler D, Vignolini P, Dini M, Romani A. 2005. Rapid test to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry beans. *J. Agric. Food Chem*, 53, 8, 3053-3056.

Hui H, Tang G, Go V. 2009. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chinese Med*, 4-11.

Ignat I, Irina Volf I, Popa V. 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*, 126, 1821–1835.

Jin-A Baek, Young-Ok Son, Minghao Fang, Young Jae Lee, Hyung-Kwon Cho, Wan KyunnWhang, Jeong-Chae Lee. 2011. Catechin-7-*O*- β -*D*-Glucopyranoside Scavenges Free Radicals and Protects Human B Lymphoma BJAB Cells on H₂O₂-mediated Oxidative Stress. *Food Sci. Biotechnol*, 20, 1, 151-158.

Jung-chi Lien, Lin-min Lien, Wang R., Jeffrey Wang J. 2011. Phytochemical Analysis of Medicinal Plants with Kidney Protective Activities. Chinese J Int Tradit Western Med Press, 1-11.

Kiran B., Kumar S., Rao N., Udupa N., SatishRao. 2009. Juglone, a Naphthoquinone from Walnut, Exerts Cytotoxic and Genotoxic Effects Against Cultured Melanoma Tumor Cells. Cell Biol Int, 33, 1039-1049.

Khonkarn R, Okonogi S, Ampasavate C, Anuchapreeda S. 2010. Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. Food Chem Toxicol 48, 2122–2129.

Lanski, Ephraim P., Newman Robert A. 2007. Review of *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol, 109, 177–206.

Liang Chen, Peng Sun, Ting Wang, Kaixian Chen, Qi Jia, Heyao Wang, Yiming Li. 2012. Diverse Mechanisms of Antidiabetic Effects of the Different Procyanidin Oligomer Types of Two Different Cinnamon Species on db/db Mice. J. Agric. Food Chem, 60, 9144–9150.

Lin J, Weng M. 2006. Flavonoids as Nutraceuticals. The Science of Flavonoids, Book Chapter, 213-238.

Lule, S.U., Xia, W. 2005. Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. Food Rev Int, 21, 367–388.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 79, 727–747.

Matić, S, Stanić S, Bogojević D, Vidaković M, Grdović N, Dinić S, Solujić S, Mladenović M, Stanković N, Mihailović M. 2013. Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop, and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutat Res*, 755, 81– 89.

Mukherjee K, Kumar N., Rai S., Mukherjee P. 2009. Evaluation of Herbal Medicinal Products. Perspectives on quality, safety and efficacy. Pharmaceut Press. Ch. 19, 261-281.

Nadin S, Vargas–Roig L, Ciocca D. 2001. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *J Histochem Cytochem Volume* 49, 9, 1183–1186.

Nichenametla S.N., Taruscio T. G. 2006. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Crit Rev Food Sci Nut*, 46, 161–183.

Nirmala Devi T, Apraj V, Bhagwat A, Mallya R, Sawant L, Pandita N. 2011. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. Bark. *Pharmacognosy J*, 3, 25, 39-43.

Nithiyantham S, Siddhuraju P, Francis G. 2013. A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts. *Ind Crop Prod* 43, 261– 269.

Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. 2012. An Overview On Antidiabetic Medicinal Plants Having Insulin Mimetic Property. *Asian Pac J Trop Biomed*, 320-330.

Palanisamy U, Ming C, Masilamani T, Subramaniam T, Teng L, Radhakrishnan A. 2008. Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chem* 109, 54–63.

Palanisamy U, Manaharan T, Teng L, Radhakrishnan A, Subramaniam T, Masilamani T. 2011. Rambutan rind in the management of hyperglycemia. *Food Res Int*, 2278–2282.

Pavanato M, Marroni N, Marroni C, Llesuy S. 2007. Quercetin Prevents Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *Dig Dis Sci*. 52, 2616–2621.

Peter Møller. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic Clinical Pharmacol Toxicol*, 98, 336–345.

Oliveira I, Sousa A, Ferreira I, Bento A, Estevinho L, Pereira J. 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem Toxicol*, 46, 2326–2331.

Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas J. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chemical Toxicol* 46, 3227–3239.

Pereira J., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I., Bento A., Estevinho L. 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol* 46, 2103–2111.

Petriccione M, Ciniglia C. 2012. Comet Assay to Assess the Genotoxicity of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Husks with Statistical Evaluation. *Bull Environ Contam Toxicol* 89, 166–171.

Poyrazoglu, E., Gokmen, V., Artik, N., 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J. Food Comp Anal*, 15, 567-575.

Rajan S, Mahalakshmi S, Deepa VM, Sathya K, Shajithas S, Thirunalasundari T, 2011. Antioxidant potentials of *punica granatum* fruit rind extracts. Int J Pharm Sci, Vol 3, Issue. 3, 82-88.

Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances, 20(2), 101-153.

Rauter A, Martin A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes B, Justino J. 2010. Antihyperglycaemic and Protective Effects of Flavonoids on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Phytother Res, 24, S133–S138.

Rivera-Ramírez F, Escalona-Cardoso G, Garduño-Siciliano L, Galaviz-Hernández C, Paniagua-Castro N. 2011. "Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonora* in mice fed a high-fat diet with fructose. J Biomed Biotechnol, Article ID 968984, 6 pages.

Rodeiro I, Delgado R, Garrido G. 2014. Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation- induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells. Cell Prolif, 47, 48–55.

Rosales-Castro M, González-Laredo R, Rocha-Guzmán N. 2011. "Chromatographic analysis of bioactive proanthocyanidins from *Quercus durifolia* and *Quercus eduardii* barks," Acta Chromatographic, vol. 23, No. 3, 521–529.

Rosales-Castro M, González-Laredo R, Rocha-Guzmán N, Gallegos-Infante J, Peralta-Cruz J, Karchesy J. 2009. Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. Madera y Bosques 15, 3, 87-105.

Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. 2003. J. Agric Food Chem, 51, 3, 571-581.

Sánchez-Rodríguez M, Edelmiro Santiago-Osorio E, Luis Alberto Vargas L, Mendoza-Núñez V. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica Volumen 29 No. 3*, 81-90.

Sarkar F, Li Y, Wang Z, Kong D. 2010. The role of nutraceuticals in the regulation of Wnt and Hedgehog signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 29, 383–394.

Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.

Seeram N, Aviram M, Zhang Y, Henning S, Feng L, Dreher M, Heber D. 2008. Comparison of Antioxidant Potency of Commonly Consumed Polyphenol-Rich Beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem*, 56, 1415–1422.

Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., & Rocha, S. M., (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana Fitopatología*, 21, 355-363.

Seyoum A, Asres K, El-Fiky F. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochem*, 67, 2058–2070.

Shoji y Nakashima. 2004. Nutraceuticals and Delivery Systems. *J Drug Target*, Vol. 12, 6, 385-391.

Si C, Xu J, Lu Y, Su Z, Su Y, Bae Y. 2011. Hydrolysable tannins from *Juglans sigillata* stem barks. *Biochemical Systematics and Ecology* 39 (2011) 225–227.

Steinberg D. 2002. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 8,1211–1217.

Suaib L, Kaushik S, Srivastava S, Kumar R, Bawankule D, Pal A, Darokar M, Suman Khanuja S. 2009. Protective effect of medicinal plant extracts on biomarkers of oxidative stress in erythrocytes. *Pharm Biol*, 47, 6, 483–490.

Suvarnakuta P, Chaweerungrat C, Devahastin S. 2011. Effects of drying methods on assay and antioxidant activity of xanthenes in mangosteen rind. *Food Chem*, 125, 240–247.

Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H. y Uzun H. 2011. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med*; 34, 3, E163-E171.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology*, 4, 315-344.

Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-22.

Thakur G, Pal K, Mitra A, Mukherjee S, Basak A, Rousseau D. 2010. Some Common Antidiabetic Plants of The Indian Subcontinent. *Food Rev Int*, 26, 364–385.

Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. 2007. Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *J. Agric. Food Chem*, 55, 9559–9570.

Vieira F, Di Pietro P, Boaventura B, Ambrosi C, Rockenbach G, Fausto M, Crippa C, Da Silva E. 2011. Factors associated with oxidative stress in women with breast cancer. *Nutr Hosp.* 26 3, 528-536.

Vermerris W, Nicholson R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer. Chapter 4. p 152.

Waterman, P., Mole, S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites: Methods in Ecology*. Blackwell Scientific Publications. Boston. p 238.

Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313, 17-29.

Xiao M, Helsing A, Lynch P, El-Naggar A, Alegre M, Robison R, O'Neill K. 2014. DNA damage caused by inorganic particulate matter on Raji and HepG2 cell lines exposed to ultraviolet radiation. *Mut Res*, 771, 6–14.

Yao Y, Chen F, Wang M, Wang J, Ren G. 2008. Antidiabetic Activity of Mung Bean Extracts In Diabetic Kk-Ay Mice. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8869–8873.

Yang J, Kang M, Nam S, Friedman M. 2012. Antidiabetic Effects of Rice Hull Smoke Extract in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *J. Agric. Food Chem*, 60, 87–94.

Yen, Gow-Chin, Lai, Hsi-Huai, Chou, Hsin-Yi. 2001. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of Urariacrinita root. *Food Chem*, 74, 471–478.

Yi B, Yin C, Chin G. 2006. Evaluation of Antioxidant Activity and Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production of Some Common Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1680-1686.

Zaid H, Saad B. 2013. State of the Art of Diabetes Treatment in Greco-Arab and Islamic Medicine. Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes. Elsevier Inc, 327-337.

Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z. 2009. "Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.)". Food Chem, vol. 113, No. 1, 160–165.

Ahmad H, Khan I, Wahid A. 2012. "Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing," J Tradt Chin Med, vol. 32, No. 3, 411–414.