



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Tamarindus indica : ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD  
HIPOGLUCEMIANTE Y AISLAMIENTO DE  
ANTIOXIDANTES EN LA CASCARA DE LA  
SEMILLA DE TAMARINDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :  
JANETH GARCIA VALLE



MEXICO D.F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Prof. Martha Albores Velasco.
Vocal	Prof. Andrés Guillermo Martínez Casas.
Secretario	Prof. Alfonso Sebastián Lira Rocha.
1er. Suplente	Prof. Julieta Sandoval Guillén.
2º. Suplente	Prof. Enrique Martínez Manrique.

## **SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

*Departamento de química orgánica edificio "B" laboratorio 202. División de estudios de posgrado UNAM*

Asesor



Dra. Martha Albores Velasco

Sustentante



Janeth García Valle

¿Cómo puedes enfrentar a  
la vida, si al menor pesar te  
desanimas?

J.J. Rousseau

Nuestra gloria más grande no  
consiste en nunca caer, sino en  
levantarnos cada vez que  
caemos.

Confucio

El éxito es a prender a ir de  
fracaso en fracaso sin  
desesperarse.

Churchill Winston

Mientras más grande es la  
dificultad más grande será la  
gloria.

Cicerón

Gracias **Dios** por ser mi guía, por escuchar mis oraciones y por permitirme vivir cada día.

Gracias a mi **Madre** por todos los sacrificios que a hecho por mi, para ser una persona de bien.

Gracias a mi **Hermana Ivonne** por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

Gracias a mi hermano **Juan y mi padre**, por los buenos momentos, no te desanimes hermano y échale ganas a la vida.

Gracias a mis amigos, **Lorena, Martha, Cecilia, Gisela, Cometa, Cucho, Mariana, Brenda, Mimonchas, Maricela, Jostin, Monse, Paty, Sol, Nelson, Paco, Alejandro, Hayde, Viny, Guerito, Karinas, Richard, Sergio, Juanita, Chino** y a todos los del **Sadapi 18** que no he mencionado, por los buenos momentos que hemos vivido juntos, gracias por su ayuda y comprensión.

Gracias a mis amigos del laboratorio, por su ayuda y consejos **Rubén, Elvia, Paco, Adrián, David y Fabiola**.

Gracias a la **Dra. Martha Albores** por haberme aceptado en su laboratorio y haberme tenido paciencia en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme estudiar en sus instalaciones.

**ÍNDICE:**

<b>CAPITULO 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPITULO 2</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	3
2.1 El Tamarindo	3
2.1.1 Descripción Botánica y Morfológica	3
2.1.2 Distribución y usos del Tamarindo en México	4
2.1.3 Usos del Tamarindo en otros Países	5
2.2 Diabetes Mellitus	5
2.2.1 Medicamentos para el Tratamiento de la Diabetes mellitus y sus Limitaciones	7
2.2.2 Plantas Antidiabéticas	8
2.3 Antioxidantes	10
2.3.1 Antioxidantes Sintéticos	11
2.3.2 Antioxidantes Naturales	11
2.4 Técnicas de Evaluación para el Análisis de Rancidez Oxidativa	14
<b>CAPITULO 3</b>	
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>CAPITULO 4</b>	
<b>OBJETIVOS</b>	16
4.1 Objetivos Generales	16
4.1.2 Objetivos Particulares	17

**CAPITULO 5**

<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>18</b>
5.1 Preparación de Extractos para la Determinación del Efecto Hipoglucemiante de la Semilla Completa y Fraccionada	18
5.1.1 Material Biológico	18
5.1.2 Tratamiento de la Muestra	18
5.1.3 Fraccionamiento de la Semilla	18
5.2 Preparación de un Extracto Metanólico Desengrasado a partir de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo	20
5.2.1 Tratamiento de la Muestra	20
5.3 Preparación Directa de un Extracto Metanólico	21
5.4 Determinación del Efecto Hipoglucemiante en Ratones Normales "Bioensayos	22
5.4.1 Material Biológico	22
5.4.2 Material de Laboratorio	22
5.5 Determinación del Efecto Hipoglucemiante de la Semilla Completa y la Cáscara sin Fraccionar	23
5.6 Obtención de Antioxidantes de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo	23
5.6.1 Tratamiento de la Muestra	23
5.7 Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antioxidante de los Extractos de Acetato de Etilo y Metanólico	24
5.7.1 Material/Reactivos	24
5.7.2 Índice de Peróxidos	25
5.7.3 Índice de Kreis	26
5.8 Fraccionamiento Cromatográfico	26
5.8.1 Tratamiento de la Muestra	26
5.9 Pruebas Analítica del fraccionamiento Cromatográfico del Extracto de Acetato de Etilo	27
5.10 Determinación de la Composición Química de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo	27
5.10.1 Material /Reactivos	27
5.10.2 Humedad	28
5.10.3 Proteína Cruda	28
5.10.4 Grasa Cruda	29



5.10.5 Fibra Cruda	29
5.10.6 Cenizas (método cenizas totales)	30
5.10.7 Carbohidratos Asimilables	30
5.11 Determinación de Azúcares Reductores y no Reductores por ácido 3,5-dinitrosalicílico	31
5.11.1 Reactivos	31
5.11.2 Preparación de la Curva Patrón	31
5.11.3 Azúcares Solubles Totales en Agua	32
5.11.5 Azúcares Reductores Totales	33
<b>CAPITULO 6</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	34
6.1 Composición de la Semilla de Tamarindo y Efecto Hipoglucemiante de la Semilla Completa y Fraccionada	34
6.2 Tiempo de Actividad Hipoglucemiante de los Extractos de Semilla Completa y de la cáscara	42
6.3 Porcentajes de Rendimiento de la Cáscara Tratada en Seco y Húmedo:	45
6.4 Determinación de la Capacidad Antioxidantes de los Extractos de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo	46
6.5 Purificación del Extracto Obtenido con Acetato de Etilo	49
6.6 Análisis Espectroscópicos de los Extractos A, B, F y G	50
6.7 Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antioxidante del Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo	51
6.8 Análisis Proximal de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo	54
<b>CAPITULO 7</b>	
<b>CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS</b>	56
<b>CAPITULO 8</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	57
<b>ANEXOS</b>	64






## 1.0 INTRODUCCIÓN

El tamarindo (*Tamarindus indica*) es una leguminosa, que crece en forma natural en regiones tropicales y subtropicales. En México el tamarindo se produce en grandes cantidades y se usa para la elaboración de refrescos; la semilla de tamarindo no tiene ningún uso, por lo que se considera un desecho industrial. Recientemente se ha determinado que la semilla de tamarindo presenta actividad hipoglucemiante. <sup>(1)</sup>

La Diabetes es un problema de salud a nivel mundial, que presenta altos índices de mortalidad y se caracteriza por una hiperglucemia. Se ha descrito que la hiperglucemia incrementa los niveles de radicales libres, provocando un incremento en el estrés oxidativo, el cual es el responsable de las numerosas complicaciones de la enfermedad. En México existen un gran número de especies de plantas medicinales que la población utiliza para tratar la sintomatología de la diabetes, sin embargo solo un pequeño número de esas especies han sido objeto de estudios químicos que conduzcan al aislamiento de nuevos compuestos con actividad antidiabética o antioxidante. <sup>(1)</sup>

Se ha descrito la presencia de antioxidantes en la semilla de tamarindo, y se ha estudiado la actividad hipoglucemiante de sus extractos <sup>(1,2,3)</sup> En este trabajo se realizó un estudio para determinar la actividad y el grado de eficacia de los antioxidantes y de los hipoglucemiantes que se obtienen de la cáscara de semilla de tamarindo. La actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos de la cáscara de la semilla de tamarindo fue estudiada en ratones sanos, y se comparó con la actividad de la semilla completa; se encontró que en la cáscara está presente el o los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante, pues el germen de la semilla no presenta actividad, aunque la actividad de la cáscara es menor que el de la semilla completa.

También se estudio el efecto antioxidante de los extractos de acetato de etilo y metanólico de la cáscara de semilla de tamarindo, encontrándose que el extracto de acetato de etilo presenta mayor actividad antioxidante, evita la formación de peróxidos en el ácido linoleico hasta en un 88.5%, mientras que el extracto metanólico retarda la oxidación en un 54.5%.



---

Se realizó el fraccionamiento del extracto de acetato de etilo mediante cromatografía en columna, obteniéndose 11 fracciones, cuya actividad antioxidante también se determinó; se encontró que algunas fracciones presentaron mayor actividad antioxidante que el extracto total.

Por último se decidió realizar un Análisis Proximal de la cáscara de la semilla de tamarindo, para determinar la proporción de sus metabolitos primarios, encontrándose que es una fuente con un gran contenido en carbohidratos, así como de nitrógeno total y fibra lo que justifica su uso como alimento en algunos países.

En trabajos posteriores es necesario estudiar si existe una relación entre la actividad antioxidante y la actividad hipoglucemiante y tratar de determinar que compuestos son los responsables de la actividad.

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 EL TAMARINDO

#### 2.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y MORFOLÓGICA

El Tamarindo pertenece a las leguminosas y se dice que es originario de África, ya que fueron los árabes los primeros en tener conocimiento de las propiedades del fruto de esta especie, el nombre deriva del árabe “tamare”= dáttil, e “hindi”= indio que significa dáttil de la india, siendo este nombre el que le dio origen a su nombre botánico: *Tamarindus indica*.<sup>(4)</sup>

El árbol fue introducido a Egipto, el Medio Oriente y Asia por comerciantes árabes en tiempos antiguos, porque su multiplicación se realiza generalmente por semilla ya que presenta la ventaja de tener un alto porcentaje de germinación.<sup>(4)</sup> La planta, a los 20 años, llega a ser un árbol maduro, de madera compacta, y con un diámetro del tronco de hasta 150 cm., que se caracteriza por tener una copa redondeada, esparcida y densa, logrando alcanzar una altura de 10 a 25 m, además se dice que es un árbol de larga vida ya que en Hawai se han encontrado árboles de tamarindo que tienen hasta 150 años de edad.<sup>(5)</sup>

Sus flores son poco visibles porque son muy pequeñas, crecen en racimos cortos teniendo aproximadamente de 5 a 10 cm. de longitud, son de color amarillo pálido con una combinación de color rosa.<sup>(6)</sup> Su fruto son vainas curvadas e irregulares que crecen en gran abundancia y su tamaño varía de 5 a 18 cm. de largo y 1.9 a 3.2 cm. de ancho; la corteza que encierra la pulpa es café grisáceo. A medida que maduran las vainas se llenan un poco más de pulpa y toman una coloración de café a café-rojiza, entonces la piel se convierte en una cáscara quebradiza, la pulpa se deshidrata hasta adquirir la apariencia de una pasta cubierta por algunos hilos de fibra gruesa que se extiende a lo largo del tallo.

El deterioro del fruto no ocurre tan rápido como en otros frutos debido a su deshidratación natural y por su composición química (alta concentración de acidez) que actúa como conservador natural, la pulpa constituye el 40% de la vaina y es fuente de vitaminas B y C. Por lo general el tamarindo empieza a producir su fruta entre los 7 y 10 años de edad, siendo éste su producto principal.<sup>(7)</sup>



Las semillas, ya bien formadas, son duras, lisas, ovaladas o cuadradas de 9.5 a 12.7 mm. de longitud, comprimidas lateralmente y de color pardo brillante, unidas entres sí con fibras que se encuentran en la pulpa cubiertas individualmente por una especie de membrana. En seco las semillas se conservan por mucho tiempo, además se clasifican en dos grupos según su color: rojo o café.<sup>(7)</sup>

### 2.1.2 DISTRIBUCIÓN Y USOS DEL TAMARINDO EN MÉXICO

El tamarindo crece en regiones tropicales y subtropicales; en México se cultiva en estados como Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. También se llega a encontrar en forma silvestre en las costas del Pacífico principalmente en los estados de Jalisco, Colima y Guerrero.<sup>(6)</sup>

En nuestro país la única parte que se usa de este árbol, es el fruto, cuya pulpa carnosa y ácida es apreciada para elaborar agua fresca.<sup>(5,7)</sup> A nivel industrial se elaboran pastas para concentrados, que se utilizan en la preparación de bebidas refrescantes, dulces y helados; la pulpa azucarada o salada con frecuencia se utiliza como postre, por estas razones en la industria alimentaria es muy apreciada. Tomando en cuenta que en el fruto están contenidas las semillas y estas a nivel industrial no tienen ningún uso, se les considera como un desecho, cuya eliminación representa a menudo un problema, ya que por cada kilogramo de tamarindo se obtienen alrededor de 850 a 1000 semillas.<sup>(4)</sup>

Solo un pequeño número de personas sabe que la semilla tiene algún uso. En Ixtlahuaca, Estado de México es utilizada como tratamiento para la *Diabetes mellitus*; en esta zona las personas utilizan aproximadamente 8 semillas de *Tamarindus indica* Linn trituradas y hervidas en un litro de agua, las personas lo toman como agua de tiempo y tienen mejoría en la enfermedad.<sup>(1)</sup> Además, recientemente se ha comprobado, en la Facultad de Química, que los extractos de la semilla de tamarindo poseen actividad hipoglucemiante en ratones.<sup>(1)</sup> Es importante la caracterización de las semillas de tamarindo para la recuperación de productos que le darían un valor agregado como hipoglucemiantes o antioxidantes.

### 2.1.3 USOS DEL TAMARINDO EN OTROS PAÍSES

En diferentes países sobre todo de los continentes Africano y Asiático, los productos derivados del tamarindo tienen usos variados: se utilizan en productos alimenticios, y se emplean extensamente en la Medicina Tradicional. Por ejemplo, en la India y África las flores y las hojas se utilizan como bases para salsas o bien se pueden servir como verdura para ensaladas o sopas, mientras que las semillas cocidas y pulverizadas las emplean para alimentar al ganado.<sup>(2,6)</sup>

En Japón el germen obtenido de la semilla se usa para manufacturar goma de Tamarindo, que se añade a algunos alimentos para aumentar su viscosidad, ya que la semilla sin cáscara es un buen sustituto del almidón;<sup>(8)</sup> se ha encontrado que contiene un polisacárido que se aísla por extracción con agua caliente y posterior desecación. Este polisacárido forma geles estables en un amplio intervalo de pH, por lo que tiene aplicaciones alimenticias, ya que ayuda a mejorar la textura de helados, mermeladas, ates y estabiliza cremas, mayonesas y quesos, por este hecho en Japón esta permitido su uso como aditivo en alimentos.<sup>(7,9)</sup>

A nivel medicinal, se sabe que en el norte de Nigeria la raíz se usa junto con otras medicinas nativas para el tratamiento de la lepra, y en otras partes de África para el tratamiento de dolor de pecho.<sup>(6)</sup> En el este del Sudán las hojas se usan para lavar las heridas y reducir la inflamación.<sup>(6)</sup> En la India las semillas molidas se usan para el tratamiento de la disentería, hervidas y machacadas se emplean para el tratamiento de úlceras y la cáscara de la semilla molida se usa en el tratamiento de la diabetes.<sup>(6)</sup>

## 2.2 DIABETES MELLITUS

La *Diabetes mellitus* (DM) se considera como un serio problema endocrino, que se caracteriza por tener una elevada concentración de glucosa en sangre, debido a la insuficiencia en la producción de insulina o la resistencia a ésta. Se define como un grupo de enfermedades metabólicas, en las que se presenta un deficiente aprovechamiento de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, dando como resultado una imposibilidad de las células para realizar las funciones metabólicas de manera adecuada.<sup>(10,11,12)</sup>



La *Diabetes mellitus* se divide en dos tipos:<sup>(13)</sup>

Diabetes tipo 1: En la cual hay una deficiencia en la producción de la insulina por lo que se requiere de insulina exógena para su tratamiento, entonces se dice que el paciente es dependiente de insulina o insulino-dependientes (*IDDM*).

Diabetes tipo 2: En la cual la insulina es incapaz de ejercer su actividad normal, estos pacientes se les conoce como no insulino-dependientes (*NIDDM*).

La diabetes es una enfermedad crónica que no puede ser completamente curada y que además, puede desarrollar complicaciones si no se lleva un adecuado control de la enfermedad. Los padecimientos vasculares (enfermedades coronarias y vasculares periféricas) son las principales complicaciones asociadas con la diabetes, y son causa primordial de muerte en los diabéticos.<sup>(11,14,15)</sup>

Recientemente se ha relacionado el estrés oxidativo con las complicaciones de la enfermedad. En estudios sobre diabetes inducida en animales ó en personas que presentan la enfermedad, se ha visto que existe un aumento en el estrés oxidativo, debido a la hiperglucemia persistente y crónica, ya que ésta trae como consecuencia la formación de Radicales Libres (RL).<sup>(14,15, 16)</sup>

Los avances en las investigaciones bioquímicas y moleculares han demostrado que en sistemas biológicos los RL son un fenómeno natural debido a que se producen por el transporte de electrones en la mitocondria. Los componentes más susceptibles de sufrir daños por estos radicales son los lípidos, las proteínas y el DNA; en condiciones normales las enzimas de las células son suficientes para neutralizar a los radicales libres. Las enzimas más importantes del sistema antioxidante celular como son: Glutation peroxidasa (GPx), Glutation reductasa (GR), Superoxido dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT), pueden ser susceptibles a la oxidación y por lo tanto su capacidad antioxidante disminuye.<sup>(17,18,19)</sup> En la célula el estrés oxidativo se produce cuando el ataque oxidativo, supera las defensas antioxidantes, dando como resultado una sobreproducción de RL como pueden ser: el Ion superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), por lo que los tejidos de las personas diabéticas sufren daños, uno de estos daños es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad provocando peroxidación lipídica, siendo ésta un factor de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis.

Se ha descrito que el tratamiento con diferentes antioxidantes, mejora las anomalías metabólicas que ocurren en personas diabéticas; se ha encontrado que la vitamina E es un excelente antioxidante a nivel celular porque reduce la formación de especies reactivas de oxígeno.<sup>(18,20, 21, 22)</sup> Considerando que las plantas son una buena fuente de antioxidantes entre los que se pueden encontrar tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides y taninos, éstas pueden ser consideradas como un tratamiento para evitar complicaciones en la diabetes.<sup>(23)</sup>

### 2.2.1 MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS Y SUS LIMITACIONES

Actualmente la insulina y los hipoglucemiantes orales son los principales medicamentos para el tratamiento de la diabetes y son efectivos para el control de la hiperglucemia, pero algunas veces llegan a presentar reacciones secundarias o no tienen el efecto deseado en ciertos pacientes, ya que prevalecen dificultades en su uso dado los problemas de dosificación que presentan, pues resulta muy difícil reproducir la función de liberación de insulina llevada a cabo por las células beta pancreáticas.<sup>(12)</sup> El uso de insulina tiene sus limitaciones se ha encontrado que el 30 al 50% de pacientes con Diabetes tipo 1 tiene anticuerpos antiinsulina al inicio de su padecimiento y antes de recibir insulina exógena, además el tratamiento inadecuado de insulina puede llevar a un riesgo de hipoglucemia extrema.<sup>(11)</sup> Las sulfonilureas y las metforminas se usan en el tratamiento de pacientes con *diabetes mellitus* no insulino-dependientes, pero frecuentemente estos medicamentos son incapaces de disminuir la glucosa a concentraciones normales y pueden llegar a producir acidosis láctica y diarrea.<sup>(24)</sup> Otros medicamentos como el Acarbosa, Miglitol y Voglibiosa son inhibidores de las alfa glucosidasas intestinales pero se ha visto que presentan un efecto retardado para la disminución de la glucosa y algunas veces no se logra llegar a valores normales.<sup>(25)</sup>

Dentro de la medicina moderna aún no existe un tratamiento que pueda ser considerado ideal para este padecimiento, está claro que debido a los efectos laterales de las drogas actualmente usadas, hay una necesidad de buscar algún agente seguro con efectos adversos mínimos. Algunas plantas son una fuente potencial de medicamentos antidiabéticos, por lo que podrían ser candidatas para estudios sobre los mecanismos de la actividad hipoglucemiante, así como la para la identificación y el posible aislamiento de los compuestos responsables de dicha actividad.<sup>(24,25)</sup>

### 2.2.2 PLANTAS ANTIDIABÉTICAS

El estudio Químico y Biológico de las plantas ofrece un medio para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos y la obtención de otros, que aunque ya sean conocidos, puedan aislarse en mayor cantidad. En la Medicina Tradicional mexicana las plantas y flores han jugado un papel importante en la vida de los mexicanos; desde hace algunos años se sabe que las personas tienden a usar plantas para el tratamiento de la *Diabetes mellitus*.<sup>(26)</sup> Se han descrito cerca de 800 plantas que se emplean para el tratamiento de esta enfermedad, de las cuales aproximadamente 150 existen en México, pero únicamente el 20% ha recibido algún tipo de estudio para determinar su efecto hipoglucémico, mientras que el otro 80% no ha recibido ninguna investigación farmacológica.<sup>(27)</sup>

Los mecanismos empleados por las plantas antidiabéticas para disminuir los niveles de glucosa en sangre son diversos: hay plantas que exhiben propiedades similares como las Sulfonilureas o la glibenclamida en las que el efecto hipoglucemiante en animales normales se debe al estímulo para la liberación de insulina proveniente de las células pancreáticas  $\beta$ .<sup>(12)</sup> Otras plantas presentan actividad semejante a la Metformina o a las Biguanidas que aumentan la acción de la insulina por que incrementan el número de transportadores de glucosa.

Existen también las dietas a base de vegetales recomendadas antiguamente, que han mostrado tener un elevado contenido de carbohidratos ricos en fibras y su efecto retarda la hiperglucemia por lo que se puede justificar sus propiedades antidiabéticas.<sup>(28)</sup> De algunas otras plantas antidiabéticas no se han definido el mecanismo de acción que presentan.<sup>(12)</sup>

En 1979 se realizaron algunas investigaciones acerca de las plantas antidiabéticas más comúnmente usadas por la población mexicana, y la investigación etnobotánica demostró que el “nopal” (*Opuntia streptacantha*), es una de las plantas más utilizadas para este propósito, sobre todo por las poblaciones con influencia cultural náhuatl. En cualesquiera de sus formas de preparación, el nopal es administrado vía bucal de una a tres veces al día (en ayunas o antes de cada comida) en cantidades dependientes de la gravedad sintomatológica del paciente diabético.<sup>(27,29)</sup>



En los estudios realizados al nopal, se determinó que efectivamente tiene propiedades hipoglucemiantes al ser administrado vía bucal tanto en conejos con diabetes experimental, como en conejos sanos con hiperglucemia fisiológica, lográndose confirmar la base del uso popular de esta planta. Sin embargo no se encontró el mecanismo de la actividad hipoglucemiante, así como tampoco se han identificado la o las sustancias responsables de dicha actividad.<sup>(26, 27, 29)</sup>

En 1998, se estudiaron 28 plantas las cuales son usadas por la población mexicana para el tratamiento de la diabetes, se clasificaron y se procesaron de la misma manera que se usan tradicionalmente; sus extractos se administraron en forma intragástrica en conejos sanos con hiperglucemia inducida por medio de la prueba de Tolerancia de la Glucosa. Los resultados obtenidos determinaron que 7 de las 28 plantas presentaban una disminución significativa de glucosa en sangre.<sup>(26)</sup> En la siguiente tabla se mencionan las plantas con el efecto hipoglucemiante más significativo.<sup>(26)</sup>

Tabla No. 1 Plantas con efecto hipoglucemiante significativo

Nombre Científico	Familia	Nombre Popular	Parte que se Usa	% de disminución de glucosa
<i>G. ulmifolia</i> Lam.	Sterculiaceae	Guacima	hojas	22.2
<i>T. hirsutissima</i> L.	Boraginaceae	Lagrimas San Pedro	Tallo	21.7
<i>L. caulescens</i>	Labiatae	Salvia	Flores	20.9
<i>T. foenum-graceum</i> L.	Leguminosae	Fenogreco	Semilla	17.7
<i>M. sapientum</i>	Musaceae	Plátano	Flores Frescas	17.0
<i>R. mangle</i> L.	Rizophoraceae	Mangle rojo	Tallo	16.1
<i>T. diffusa</i> Willd.	Turneraceae	Damiana	Hojas	15.9

De las 21 plantas restantes 8 no presentaron disminución de la hiperglucemia, mientras que las otras 13 plantas la disminución de glucosa no fue significativa.

En el año 2002, en la Facultad de Química de la UNAM, se estudio el efecto hipoglucemiante de la semilla de Tamarindo en ratones sanos así como en ratones diabéticos, encontrándose que el extracto acuoso a una concentración de 2 mg/mL tiene un porcentaje de respuesta de 63.8%, mientras que a una concentración de 4 mg/mL presenta 86.3% de disminución de glucosa en sangre en ratones diabéticos.<sup>(1)</sup>

Uno de los propósitos de este trabajo fue estudiar la actividad hipoglucemiante de la cáscara de la semilla de tamarindo así como de sus extractos en ratones normales, así como determinar cuanto tiempo permanece la actividad del extracto.

### 2.3 ANTIOXIDANTES

Los Radicales Libres son metabolitos comunes en sistemas alimentarios y biológicos. En los sistemas alimentarios los radicales libres pueden atacar los dobles enlaces de los lípidos, provocando una serie de cambios durante el procesamiento o almacenamiento de los alimentos, causando el desarrollo de la rancidez, olores desagradables y una disminución en el valor nutritivo de los productos. Estos cambios son causados por varios factores que incluyen reacciones de oscurecimiento y oxidación de lípidos.<sup>(30)</sup> La oxidación de lípidos depende de condiciones como: Luz (hv), Temperatura (t), Oxígeno (O<sub>2</sub>), acidez (pH), actividad del agua (aw) y presencia de metales (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) bajo las cuales se encuentra el alimento.

Para evitar la formación de los radicales libres durante la etapa de iniciación en la autooxidación de lípidos, se ha recurrido a la utilización de los antioxidantes, que retardan el inicio o bien disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables, evitando la propagación de los radicales libres y por consiguiente la formación de los hidroperóxidos.<sup>(31)</sup>

En la industria alimentaria los antioxidantes son un grupo de aditivos indispensables por que incrementan la vida de almacenamiento y estabilizan los lípidos contenidos en los alimentos sin cambiar sus cualidades sensoriales. La mayor parte de los antioxidantes que se conocen se han aislado de plantas, sin embargo los que más se usan en la industria de alimentos, de cosméticos y farmacéutica son los provenientes de síntesis química.<sup>(32)</sup>

### 2.3.1 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

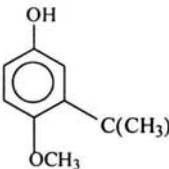
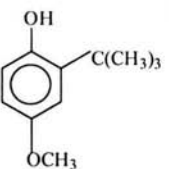
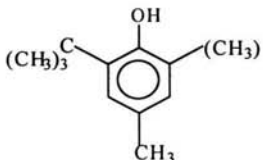
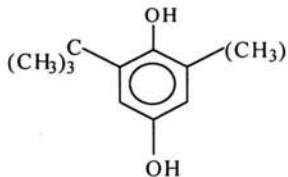
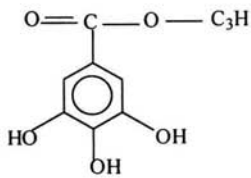
Entre los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG).<sup>(33)</sup> Las ventajas que presentan estos tipos de antioxidantes es que son baratos, activos a concentraciones bajas, solubles en sistemas liposolubles y actúan como sinergistas para incrementar la actividad antioxidante, ya sea con ellos mismos o con antioxidantes naturales como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, etc.<sup>(23)</sup> Las desventajas que presentan son que en particular el BHA y BHT son muy volátiles e inestables a temperaturas elevadas así como en presencia de vapor de agua, además de que se les ha asociado con posibles efectos tóxicos.<sup>(34)</sup>

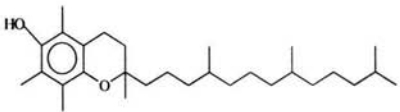
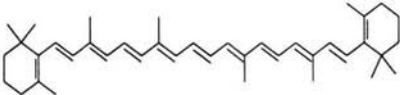
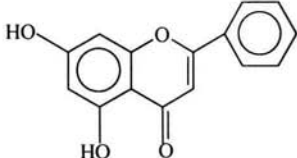
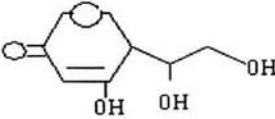
Debido a estos problemas y a la tendencia creciente de la gente por consumir productos naturales, hay interés por la obtención de nuevos antioxidantes que puedan contrarrestar los efectos que presentan los antioxidantes sintéticos, algunas veces los antioxidantes naturales por ejemplo el ácido rosmarínico son menos volátiles y más estables que el BHT y el BHA.<sup>(33,35)</sup>

### 2.3.2 ANTIOXIDANTES NATURALES

Entre los grupos de antioxidantes más importantes aislados de fuente natural se encuentran los tocoferoles, carotenoides, flavonoides, ácido ascórbico, fenoles ácidos, aminoácidos y proteínas; sin embargo los que tienen mayor actividad antioxidante son los que presentan en su estructura una parte fenólica con los grupos hidroxilos en posición orto o para.<sup>(33)</sup>

A continuación se presentan las características y usos de estos antioxidantes <sup>(9,36)</sup>:

ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	CARACTERÍSTICAS	USOS
<p><b>Butilhidroxianisol (BHA)</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>3-terbutil-4-hidroxianisol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>2-terbutilhidroxianisol</p> </div> </div>	<p>Es una mezcla de dos isómeros, el 3-terbutil-4-hidroxianisol y el 2-terbutil-4-hidroxianisol. Contiene un grupo hidroxilo y un grupo terbutilo que ocasiona su relativa no-polaridad.</p>	<p>Estabiliza emulsiones de aceites puros, es un antioxidante grado alimentario y el cuerpo humano tiende a eliminarlo apropiadamente.</p>
<p><b>2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT)</b></p> <div style="text-align: center;">  </div>	<p>Buen antioxidante cuando es usado solo, aunque normalmente se usa en mezclas con otros antioxidantes como el (BHA), ácido cítrico, ácido fosfórico y propilgalato.</p>	<p>Es más efectivo para estabilizar emulsiones que aceites puros, es ideal para grasas animales</p>
<p><b>2-5-di(terbutil)hidroquinona</b></p> <div style="text-align: center;">  </div>	<p>Tiene buena solubilidad y puede mezclarse con el BHA y BHT para permitir combinaciones de antioxidantes altamente efectivas.</p>	<p>Es un antioxidante grado alimentario y exhibe una excepcional potencia en aceites vegetales altamente insaturados y en grasas animales comestibles</p>
<p><b>Galatos de Alquilo</b></p> <div style="text-align: center;">  <p>Propilgalato</p> </div>	<p>Los galatos son ésteres del ácido gálico y los que más se emplean son los de propilo, octilo y dodecilo.</p>	<p>Se puede mezclar con BHA y ácido cítrico para mejorar su acción</p>

ANTIOXIDANTES NATURALES	CARACTERÍSTICAS	USOS
<p data-bbox="186 248 467 271"><b>Tocoferoles y Tocotrienoles</b></p>  <p data-bbox="274 460 379 483">α-tocoferol</p>	<p data-bbox="558 248 845 560">Son los antioxidantes más ampliamente distribuidos en la naturaleza encontrándose principalmente en la fase lipídica de los alimentos como: semillas, aceites vegetales, granos de cereales, frutas, hortalizas.</p>	<p data-bbox="870 248 1147 478">Son considerados antioxidantes efectivos. Sin embargo la actividad relativa de estos compuestos se ve influida significativamente por la temperatura y luz.</p>
<p data-bbox="299 583 429 606"><b>Carotenoides</b></p>  <p data-bbox="312 777 417 800">β-Caroteno</p>	<p data-bbox="558 619 845 772">La estructura química de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono.</p>	<p data-bbox="870 583 1147 848">Los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos inducidos por las diferentes condiciones de procesamiento (principalmente por las altas temperaturas y el oxígeno).</p>
<p data-bbox="303 874 425 897"><b>Flavonoides</b></p>  <p data-bbox="291 1113 366 1136">Flavona</p>	<p data-bbox="558 874 845 1183">Son pigmentos comúnmente encontrados en los vegetales, frutos y algunas plantas. Son glicósidos formados principalmente por una aglucona que contienen varios grupos fenólicos en su estructura.</p>	<p data-bbox="870 874 1147 1139">Normalmente los flavonoides son estables al calor y a las reacciones de oxidación, resisten la mayoría de los tratamientos térmicos realizados en la manufactura de alimentos.</p>
<p data-bbox="287 1206 451 1229"><b>Acido Ascórbico</b></p> 	<p data-bbox="558 1241 845 1390">Es un agente reductor muy fuerte y en algunos sistemas se oxida a ácido dehidroascorbico</p>	<p data-bbox="870 1206 1147 1471">Debido a su elevada solubilidad y a sus excelentes características aromáticas se utiliza en la industria elaboradora de bebidas, para impartirles un agradable sabor ácido.</p>

## 2.4 TÉCNICAS DE EVALUACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RANCIDEZ OXIDATIVA

Con el fin de evaluar el deterioro de los lípidos, se han desarrollado diversos métodos tanto físicos como químicos, siendo necesario considerar las diferentes etapas en las que puede encontrarse el proceso oxidativo y la gran diversidad de compuestos generados, así como las características de la matriz alimenticia, esto aunado al manejo y tipo de almacenamiento al que ha sido sometida, por lo que es recomendable, y en ocasiones necesario, realizar más de una determinación analítica para obtener la visión más amplia posible del estado que guardan los lípidos en la muestra.<sup>(37)</sup>

Existe una gran diversidad de métodos empleados en la caracterización de los productos de oxidación, ya sean primarios o secundarios, el método más común para monitorear la oxidación primaria es midiendo los cambios en el valor del índice de peróxidos, el cual consiste en medir la cantidad de peróxidos presentes en la muestra. El valor encontrado por medio de esta determinación es una indicación del grado de deterioro en etapas tempranas del proceso oxidativo, ya que los peróxidos son los productos primarios más abundantes. Durante el almacenamiento la formación de peróxidos es lenta en un principio, durante el periodo de inducción, el cual puede variar desde unas semanas a varios meses dependiendo de la composición de la grasa evaluada y de las condiciones de almacenamiento, el índice alcanza un valor máximo, para posteriormente disminuir resultado de su descomposición.

Para medir los productos secundarios de la oxidación se recomienda el índice de ácido tiobarbitúrico, o el índice de Kreis.

El índice de Kreis involucra la producción de un color rojo cuando el floroglucinol reacciona con la grasa oxidada en solución ácida, cuya intensidad aumenta con el deterioro.<sup>(38)</sup> Las sustancias responsables de la reacción son epoxialdehídos o sus acetales,<sup>(39)</sup> de acuerdo con Patton<sup>(40)</sup> el color formado parece estar relacionado con la formación creciente de epihidrínaldehído (2,3-epoxipropanal), según este autor el malonaldehído también puede reaccionar dando prueba positiva, lo cual la hace una prueba inespecífica, pero que relaciona bien el grado de oxidación de los lípidos. Normalmente esta prueba se realiza de manera cualitativa, en donde el desarrollo del color rojo indica enranciamiento de los lípidos de la muestra, determinándose el rechazo de la misma.



### 3.0 JUSTIFICACIÓN

La Diabetes es un problema de salud muy extendido a nivel mundial, presenta altos índices de mortalidad. Se caracteriza por una hiperglucemia crónica siendo el resultado de una deficiencia en la secreción o en la función de la insulina dando como resultado un mal funcionamiento de la utilización de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Se sabe que la hiperglucemia incrementa los niveles de radicales libres, provocando un incremento en el estrés oxidativo, el cual es el responsable en las complicaciones de la enfermedad como puede ser enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis) y daño al tejido de las células. El tratamiento farmacológico de la Diabetes esta basada en insulina ó hipoglucemiantes orales, sin embargo en México la *Diabetes mellitus* también se trata por medicina tradicional a través de plantas antidiabéticas. Considerando que algunas de estas plantas son fuente de antioxidantes, éstas podrían ser un complemento en el tratamiento de la enfermedad. Se ha descrito en un trabajo anterior la actividad hipoglucemiante de la semilla de tamarindo,<sup>(1)</sup> por lo que se requiere estudiar de qué depende esa actividad que potencialmente pueda dar lugar al desarrollo de nuevos hipoglucemiantes orales. El efecto antioxidante que pudiera presentar la semilla aumentaría su valor como complemento de antioxidantes naturales para evitar complicaciones en la enfermedad.



## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar y Comparar el efecto hipoglucemiante de los extractos de la cáscara de la semilla de *Tamarindus indica* en ratones sanos con la actividad de la semilla completa.
  
- Intentar aislar el o los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante.
  
- Evaluar el efecto antioxidante de los extractos de la cáscara de semilla de *Tamarindus indica*.
  
- Realizar el Análisis Proximal de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo





#### 4.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar un fraccionamiento de la Semilla de Tamarindo para determinar en cual fracción se encuentra la actividad hipoglucemiante en ratones sanos.
  
- Administrar diferentes concentraciones de los extractos para determinar el porcentaje de respuesta que presentan.
  
- Determinar el tiempo de actividad hipoglucemiante de los extractos de Semilla completa así como de la Cáscara en ratones normales.
  
- Determinar la capacidad Antioxidantes de los extractos de la Cáscara de la Semilla de Tamarindo por medio de pruebas químicas cuantitativas.
  
- Realizar un fraccionamiento del extracto con mayor capacidad antioxidante por medio de Cromatografía en Columna.
  
- Evaluar cuantitativamente la actividad antioxidante de las fracciones del extracto de acetato de etilo.
  
- Hacer el Análisis Proximal de la cáscara de semilla de tamarindo para evaluar su contenido de metabolitos primarios.



## **5.0 PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA SEMILLA COMPLETA Y FRACCIONADA**

#### **5.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

El material biológico (tamarindo) se obtuvo de manera comercial, posteriormente se extrajeron las semillas de la vaina del fruto.

#### **5.1.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:**

La semilla de tamarindo consta de una capa externa de cáscara, una capa intermedia y el germen, se decidió preparar un extracto acuoso para cada fracción así como un extracto de la semilla completa por lo que se realizó lo siguiente:

#### **5.1.3 FRACCIONAMIENTO DE LA SEMILLA:**

Para obtener la cáscara completa de la semilla de tamarindo, únicamente se desprende del germen por medio de un cutter. Para desprender la capa externa de las semillas (se caracteriza por presentar un brillo), éstas se frotaron contra una lija (del tipo que se emplea para lijar madera), se obtuvo la capa externa y la capa intermedia más el germen. Para desprender la capa intermedia del germen se utilizó un cutter. Se prosiguió a preparar los extractos.

**EXTRACTO (I). DE LA SEMILLA COMPLETA**

Se pesaron 1.2056 g de semilla de tamarindo, se trituró manualmente hasta un tamaño de partícula de 3 mm, se puso en un vaso de precipitados de 250 mL, se agregaron 120 mL de agua destilada, se calentó la suspensión a ebullición, con el fin de evaporar la mitad del volumen inicial de agua, se dejó enfriar y después se agregaron 50 mL de metanol; posteriormente la muestra se filtró por gravedad y el filtrado se evaporó a presión reducida para eliminar el metanol, se midió el volumen final que debió ser menor a 50 mL, para asegurar que todo el metanol se evaporó, se ajustó al volumen inicial de 100mL.

**Se prepararon con el mismo procedimiento los siguientes extractos:**

**EXTRACTO (II).** *Cáscara completa de la semilla* (a partir de 1.5737 g)

Concentración. [10.5 mg/mL]

**EXTRACTO (III).** *Fracción externa de la cáscara* (a partir de 0.3021 g)

Concentración [10 mg/mL]

**EXTRACTO (IV).** *Fracción intermedia de la cáscara más germen* (a partir de 1.0173 g)

Concentración. [10 mg/mL]

**EXTRACTO (V).** *Fracción intermedia de la cáscara* (a partir de 0.5002 g)

Concentración. [10 mg/mL]

Dependiendo de la cantidad de muestra empleada se adicionó 100 veces su peso de agua, se evaporaron hasta 50 veces el volumen inicial, se agregó 50 veces el volumen evaporado de metanol, para precipitar carbohidratos y proteínas, se evaporó el metanol a presión reducida y se ajustó al volumen inicial con agua. Con estos extractos se realizaron los bioensayos para determinar actividad hipoglucemiante, cada bioensayo se realizó por triplicado.

## 5.2 PREPARACIÓN DE UN EXTRACTO METANOLICO DESENGRASADO APARTIR DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE TAMARINDO (EXTRACTO VI)

### 5.2.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:

Separación de los componentes de la cáscara de la semilla de tamarindo por extracción continua en Soxhlet.

Se pesaron 27.1770 g de cáscara de semilla de tamarindo y se colocaron en un cartucho de celulosa que se tapó ligeramente con un trozo de algodón, se colocó en el extractor. En un matraz redondo de 250 mL previamente pesado, se introdujo un agitador magnético, se agregaron 150 mL de hexano destilado. Se conectó el matraz al extractor y éste al refrigerante. El matraz se colocó en la canastilla de calentamiento a ebullición suave.

La extracción se dejó por 15 hrs., transcurrido ese tiempo, el cartucho con la muestra se retiró del extractor para ser secada a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó mediante un rotavapor. El residuo de la extracción con hexano, se extrajo con acetato de etilo destilado y después con metanol destilado. Los extractos orgánicos se evaporaron y se determinó el rendimiento de cada extracción.

**Extracto (VI).** *Metanólico* Se preparó el extracto acuoso de la fracción metanólica de la cáscara, se pesaron 0.040g del sólido (residuo de la evaporación del metanol) y se disolvieron en 135 mL de agua, presentando una concentración de 0.296 mg/mL posteriormente se realizó el bioensayo.



### 5.3 PREPARACIÓN DIRECTA DE UN EXTRACTO METANÓLICO DIRECTO EXTRACTO VII Y VIII

Se pesaron 5.022 g de cáscara de semilla de tamarindo se adicionaron 500 mL de agua, se evaporaron 450 mL, una vez evaporada esta cantidad, se dejó enfriar la solución acuosa. Se adicionaron 70 mL de metanol destilado, formándose un precipitado el cual se filtró por gravedad, posteriormente se evaporó el metanol y el agua del filtrado a presión reducida; al residuo obtenido se le adicionaron 50 mL de metanol, se dejó en agitación por 12hr. Se filtró el sólido de la suspensión formada y el filtrado se evaporó a sequedad. Tanto el sólido como el filtrado se utilizaron para preparar los extractos VII y VIII.

#### EXTRACTO (VII).- Para la fracción soluble metanol:

- 1.- Se pesaron 0.0175g y se disolvieron en 10mL de agua. Concentración [1.75mg/mL]
- 2.-Se pesaron 0.0196g y se disolvieron en 5mL de agua. Concentración [3.92mg/mL]

#### EXTRACTO (VIII).-Para la fracción insoluble en metanol:

Se pesaron 0.004 g de la fracción insoluble y se disolvieron en 5 mL de agua.  
Concentración [0.8mg/mL]

Para estos extractos se realizó el bioensayo por triplicado.



## 5.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE EN RATONES NORMALES “BIOENSAYOS” <sup>(1)</sup>

### 5.4.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Para el estudio preliminar se utilizaron 100 ratones macho cepa CFW (25-30 ± 2.5g) en ayuno de 24hr. y con ingesta de agua ad-Libitum.

### 5.4.2 MATERIAL DE LABORATORIO:

Vidrio de reloj	Balanza para animales de laboratorio
Hoja de bisturí	Tiras reactivas Dextrostix II (Bayer)
Cajas contenedoras	Insulina acción rápida 100 regular (Eli Lilly)
Rejilla de metal	Extractos de tamarindos indica Linn
Jeringa de insulina (plastipack)	

#### Procedimiento:

Los ratones utilizados se pesaron, marcaron y se separaron en las cajas contenedoras de acrílico en grupos (Control positivo, Control negativo, Extracto I, Extracto II, Extracto III, Extracto IV, Extracto V, Extracto IV, Extracto VII, Extracto VIII, N=3). Al grupo control positivo se le administró insulina de acción rápida 100 regular (neutra bovina) solución inyectable 100U/mL, 0.1mL por vía subcutánea. A cada ratón se le cuantificó la glucosa inicial (antes de la administración intragástrica de los extractos acuosos o insulina) y la glucosa final (30 min. después de la administración de los extractos o insulina), ésta se cuantificó por el método de tiras reactivas, para lo que se requiere colocar una gota de sangre en la tira reactiva: el ratón se coloca en la rejilla de metal, se realiza un pequeño corte en la parte final de la cola con una hoja de bisturí ejerciendo presión para permitir la salida de la sangre con más facilidad, sobre un vidrio de reloj y una vez que sale la gota de sangre se coloca en el área indicada de la tira reactiva y se deja transcurrir 30 seg.



Después de este tiempo se coloca la tira reactiva (con el área reactiva hacia arriba) y se limpia la sangre con el papel (tipo kleenex) presionando rápido y firmemente de modo que quede limpia de sangre la tira reactiva, se esperan 90 seg. más (un total de 120seg.) y se comparan las áreas reactivas de la tira con la carta de colores impresa en el frasco. Una vez que se obtuvo el valor de la glucosa inicial se administro el extracto por vía intragástrica y se dejaron transcurrir 30 min. después de este tiempo, se determinó nuevamente la concentración de glucosa en sangre aplicando el método descrito. Se siguió el mismo método para cada uno de los 7 extractos que se obtuvieron.

### **5.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA SEMILLA COMPLETA Y LA CÁSCARA SIN FRACCIONAR**

Se llevó a cabo también la determinación del tiempo de permanencia de la actividad en la semilla completa y en la cáscara. Se dio seguimiento a la actividad durante 30 días, este estudio se realizó en ratones sanos realizando los bioensayos correspondientes, en los extractos I y II.

### **5.6 OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE TAMARINDO**

#### **5.6.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:**

De 4 Kg. de vainas de Tamarindo que esta constituida de pulpa y semilla, se separaron manualmente las semillas y se sometieron a una hidratación para separar la cáscara, para lo cual se hizo una pequeña perforación con un cutter (aprox. 4 perforaciones por semilla) y se dejó en agua destilada fría por aproximadamente 7 horas de esta manera se desprendió la cáscara con mayor facilidad. Una vez desprendida la cáscara esta se secó por medio de una estufa de vacío.

**Procedimiento:**

Se pesaron 307.48 g de cáscara de semilla de tamarindo, y se sometieron a una extracción continua en Soxhlet empleando en primer lugar hexano posteriormente acetato de etilo y por último metanol, todos los disolventes empleados fueron previamente destilados. Una vez que se obtuvieron los extractos crudos se procedió a realizar las evaluaciones cuantitativas de actividad antioxidante.

**5.7 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE ACETATO DE ETILO Y METANOLICO <sup>(38,59)</sup>****5.7.1 MATERIAL/REACTIVOS**

Matraz Erlenmeyer 250 mL	Diclorometano
Vaso de precipitados de 600 mL	Solución de Tiosulfato 0.1 N
Bureta de 25 mL	Solución Saturada de KI
Pinzas para bureta	Solución de Almidón 1 %
Tubos de ensaye	Solución de Floroglucinol 1 %
Pipetas volumétricas	Etanol
Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340	Buffer de fosfatos
Ácido Acético Glacial	Etanol al 99 %
$\alpha$ -Tocoferol (sigma chem.)	BHT
Ácido Linoleico (sigma chem.)	





- Solución de Tiosulfato 0.1N: se pesan 12.5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  se disuelven en agua destilada y se hierve por 5min. Valoración: Se pesan 0.14-0.16 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , se disuelven en 50 mL de agua hervida y fría a temperatura ambiente, se adicionan 2 g de KI y 8 mL de HCl conc. y 2 mL de almidón 1% como indicador. La valoración se realizó por triplicado.
- Solución de Almidón 1%: se pesan 1.013 g de almidón y se disuelven en 100 mL de agua caliente
- Solución Ácido Acético/Diclorometano (3:2)
- Solución de Floroglucinol 1%: se pesan 1 g de floroglucinol y se disuelven en 100 mL de ácido acético glacial.

### 5.7.2 ÍNDICE DE PERÓXIDOS. Método volumétrico <sup>(41)</sup>

Se utilizó ácido linoleico como sistema, BHT y  $\alpha$ -Tocoferol como controles. Se midieron 0.182mL de ácido linoleico se adicionaron 14 mL de etanol al 99% y 14 mL de buffer de fosfatos 50 m $\mu$  pH=7, el volumen se ajusto a 35 mL con agua destilada, a esta mezcla se le adicionaron 0.3 mg de cada extracto o de los controles, posteriormente la mezcla se puso a incubación a 40°C en baño maría por 10 días. El ensayo se realizó por triplicado.

Se colocaron  $5 \pm 0.1$  mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 25mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), se disolvieron perfectamente. Una vez disueltos se adicionó 1 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y se dejó reposar en la oscuridad durante 60seg. Después de este tiempo se añadieron 75 mL de agua destilada hervida y fría, se titulo lentamente con una solución de tiosulfato de sodio 0.1 N. Se agitó vigorosamente durante la titulación hasta obtener un color amarillo pálido. Se adicionaron 0.5 mL de solución de almidón como indicador y se continuó con la titulación hasta la desaparición del color azul por 30 seg. Si se gastaban menos de 3 mL, se tenía que diluir el titulante a 0.01 N. en todos los casos fue necesario hacer esta dilución.



### 5.7.3 ÍNDICE DE KREIS <sup>(40)</sup>

Se disolvieron de 0.05 mL a 5 mL de muestra en 5 mL de diclorometano, se adicionaron 10 mL de la solución de ácido tricloroacético al 30 % en ácido acético glacial y 1mL de floroglucinol en ácido acético al 1 %, se agitó y se incubó por 15 min. en baño maría a 45<sup>0</sup>C, transcurrido este tiempo se dejó enfriar y se adicionaron 4 mL de etanol. Se midió absorbancia a 540 nm frente a un blanco de reactivos.

## 5.8 FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO OBTENIDO CON ACETATO DE ETILO

### MATERIAL

Columna cromatografica de 2.5 cm. de diámetro

Placas de aluminio de gel de sílice con un espesor de 0.2mm

Gel de Sílice tamaño de partícula 230-400 mallas

### REACTIVOS

Hexano (Destilado)

Acetato de Etilo (Destilado)

Lámpara de UV

### 5.8.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:

El extracto de acetato de etilo 1.1070 g fue adsorbido en 2 g de gel de sílice y se secó en un rotavapor a vacío. Posteriormente se aplicó a una columna cromatográfica de 2.5 cm. de diámetro la cual fue empacada con 33 g de gel de sílice de tamaño de partícula (230-400 mallas) El proceso de elución se inició con hexano y posteriormente se eluyó con una mezcla de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente en diversas proporciones. Se obtuvieron un total de 151 fracciones de 5 mL cada una, reuniéndose las que fueron de composición semejante por análisis cromatográfico El control de la separación se realizó por medio de cromatografía en capa fina (CCF), eluyendo las cromatoplasmas en mezcla de hexano-Acetato de etilo (9:1) y revelándolas con luz U.V. Las fracciones que contenían la misma sustancia, se reunieron en un matraz bola de 50mL para recuperar la sustancia, el disolvente se evaporó en rotavapor y se calculó el rendimiento. Obtenidas las fracciones se realizaron las evaluaciones cuantitativas de su actividad antioxidante, por medio del Índice de Peróxidos e Índice de Kreis descritos anteriormente.



## 5.9 PRUEBAS ANALÍTICAS DEL FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.

Las fracciones que constaban de un solo producto se analizaron con medios analíticos infrarrojo (IR) y Espectrometría de masas (EM)).

Los espectros de (IR) se obtuvieron en un Espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer (FTYR) modelo 1605, en película.

Los Espectros de Masas se determinaron en un aparato JEOL modelo SX-102, tipo doble sector, geometría inversa, mediante impacto electrónico a 70 eV.

La complejidad por CCF de las demás fracciones y aunado a la cantidad de muestra insuficiente impidió su análisis subsiguiente.

## 5.10 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE TAMARINDO <sup>(37,38,41)</sup>

### 5.10.1 MATERIAL:

Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER MOD. 340	Desecador
Tubos para digestión de 75mL Marca Tecator	Digestor Tecator Mod. ab-20/40
Estufa de vacío Marca lab-line mod. 3620	Aparato de digestión Labconco
Balanza Analítica Marca Ohaus GA200	Matraces de bola fondo plano
Cartuchos de Celulosa de 22 x 80 mm	Canasta de calentamiento
Unidad de destilación Buchi k-314	Parrilla de agitación
Vasos de Berzelius de 600mL	Refrigerante
Cámara de Extracción Soxhlet	Tubos Buchi
Pesafiltros	Crisoles de Porcelana
Pinzas para crisol	Termostato

**REACTIVOS.**

Sulfato de potasio	Rojo de metilo
Sulfato de cobre	Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
Oxido de mercurio	Solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , al 1.25% (m/v)
NaOH 0.1 N	Éter de petróleo R.A
NaOH 0.1 N	Ácido sulfúrico
NaOH 4M	Metanol (Destilado)
Ácido clorhídrico 0.1N más gotas de Indicador	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.

**5.10.2 HUMEDAD****Procedimiento:**

Los pesafiltros se colocaron en una estufa de vacío a una temperatura de 130 °C por 2 horas. Una vez que los pesafiltros estuvieron a peso constante, se pesaron de 2 a 5 gramos de muestra molida y homogénea, se colocaron nuevamente en la estufa por 2 horas a una temperatura de 100°C a 110°C, los pesafiltros se transfirieron a un desecador, hasta que se enfriaron a temperatura ambiente y se pesaron rápidamente.

**5.10.3 PROTEÍNA CRUDA****Procedimiento**

Se pesaron de 20-70 mg de muestra en un papel delgado, la muestra y el papel se introdujeron en un tubo de digestión, se agregaron 0.1 g de CuSO<sub>4</sub>, 0.03 g de HgO, 1 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. se añadieron perlas de vidrio, el tubo se colocó en el digestor (previamente calentado a una temperatura de 370°C) para una predigestión de 15 min. después de este tiempo el tubo fue retirado del digestor y se dejó enfriar, posteriormente se adicionó 1.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el tubo se volvió a colocar en el digestor, se calentó hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el líquido tomo una coloración azul verdosa, se agregaron 60 mL de agua destilada fría.



La muestra se pasó cuantitativamente a un tubo Buchi para llevar a cabo la destilación, una vez colocado el tubo en el equipo de destilación se le añadió aprox. 40 mL de NaOH conc. El destilado se recibió en un matraz de 250 mL que contenía 50 mL de HCl 0.1 N y gotas de rojo de metilo hasta que se obtuvo un volumen de 150 mL, se retiró el matraz y la alargadera se lavó con agua destilada recogiendo sobre el destilado. El exceso de ácido se tituló con una solución de NaOH 0.1 N. Se efectuaron dos pruebas “blanco” donde se empleó la misma cantidad de papel.

#### 5.10.4 GRASA CRUDA

##### Procedimiento:

Se colocaron a peso constante tres matraces de bola fondo plano con perlas de ebullición en la estufa a 100°C, aproximadamente 2hr. Se pesaron de 4 a 5 gramos de muestra sobre un papel (tipo kleenex), se enrolló y se colocó en un cartucho de celulosa, se tapó ligeramente con un algodón a manera de que únicamente cubriera la muestra, se colocó el cartucho en el extractor. Se conecto el matraz al extractor y éste al refrigerante de un equipo Soxhlet. Se añadieron aproximadamente 200ml de éter etílico por el refrigerante y se calentó el matraz a ebullición suave. Una vez extraída toda la grasa, se retiró el matraz y se eliminó el éter, el extracto se secó a 75-80°C por 30 min. Después de este tiempo el matraz se colocó en un desecador hasta que se enfrió a temperatura ambiente para pesarlo.

#### 5.10.5 FIBRA CRUDA

##### Procedimiento:

Se pesaron de 3-5 gramos de muestra desengrasada en un vaso de Berzelius que contenía 0.5 gramos de silicato de aluminio y unas perlas de vidrio. Se adicionaron 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.25% que se encontraba hirviendo. Se colocó el vaso en el digestor y se dejó en ebullición durante 30min. Se retiró el vaso del digestor y se filtró con ayuda de vacío sobre un filtro California. El residuo se lavó con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aprox. 500 mL).



Una vez lavado el residuo se transfirió nuevamente al vaso de Berzelius, se le adicionaron 200mL de sosa hirviendo al 1.25 %, se colocó el vaso en el digestor, se dejó en ebullición durante 30 min. Al término de ese tiempo se retiró el vaso del digestor y se procedió a filtrar el residuo a través del filtro California. El residuo se lavo con agua destilada caliente (aprox. 500 mL) hasta eliminar el álcali, se retiraron las perlas de vidrio. Por ultimo, al residuo se le adicionaron 25 mL de alcohol etílico. El residuo lavado se trasvasó a un crisol de porcelana a peso constante, se colocó en la estufa de vacío para su secado (2 hrs.) a una temperatura de 130<sup>0</sup>C después de este tiempo la muestra se colocó en un desecador hasta que se enfriara y se determinó su peso.

Posteriormente la muestra se carbonizó con ayuda de un mechero antes de meterlo en la mufla, para su incineración, después de realizada dicha operación se volvió a pesar el crisol. La determinación concluyó cuando el crisol estuvo a peso constante.

#### 5.10.6 CENIZAS (Método cenizas totales)

##### **Procedimiento:**

Se colocaron tres crisoles de porcelana en una mufla a 600<sup>0</sup>C por 2 horas, una vez que los crisoles estuvieron a peso constante, se pesaron de 2 a 5 gramos de muestra en el crisol. Posteriormente la muestra se calcinó por medio de un mechero en la campana hasta que no se desprendieron humos. Los crisoles se metieron en la mufla por 2 horas a una temperatura de 550 <sup>0</sup>C o hasta que la muestra presentaba un color blanco. Los crisoles se enfriaron en un desecador y posteriormente se pesaron. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 5.10.7 CARBOHIDRATOS ASIMILABLES

*Se obtuvieron por diferencia:*

**% de carbohidratos asimilables =**

100 – (% humedad + % de fibra + % de grasa + % de proteína + % de ceniza).



## 5.11 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y NO REDUCTORES POR ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS)

### 511.1 REACTIVOS

Solución estándar de glucosa: se disolvieron 2 gramos de glucosa anhidra G.R. en agua destilada aforando a 100mL.

Solución de DNS: se disolvieron 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 200 mL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 5 g de NaOH, después que se disolvió, se adicionaron 91 g de tartrato de sodio, 1g de fenol y 0.25 g de bisulfito de sodio, se aforó a 500 mL. Esta solución se almacenó en un frasco ámbar para ser protegida del bióxido de carbono y luz. Se preparó una solución madre de glucosa de 20 mg/mL y se realizaron las siguientes diluciones.

### 511.2 PREPARACION DE LA CURVA PATRÓN

Curva Patrón de Glucosa: solución de 0.2- 2 mg/mL

Concentración final (mg)	Alícuotas (mL) de la solución madre	Aforo(mL)
0	0	25
0.2	0.25	25
0.5	0.6	25
0.8	1.0	25
1.1	1.4	25
1.4	1.8	25
1.7	2.1	25
2	2.5	25



### 5.11.3 AZUCARES SOLUBLES TOTALES EN AGUA

#### TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:

En un vaso de p.p. de un 1L se colocaron 5.0047 g de cáscara de semilla de tamarindo, se añadieron 500 mL de agua destilada, la muestra se puso a ebullición hasta la evaporación de la mitad del volumen inicial, se dejó en reposo 24 hrs. Una vez transcurrido este tiempo la muestra se filtró, el filtrado se trasvasó a un vaso de precipitados de 500 mL al cual se le adicionó 1.02 g de acetato de zinc para clarificar la solución, se agitó y se dejó sedimentar, una vez más se filtró y el filtrado se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 250 mL, se aforó a este volumen y se le realizó el análisis de azúcares solubles en agua determinando:

### 5.11.4 AZÚCARES REDUCTORES DIRECTOS:

#### Procedimiento:

Se tomó 1 mL de solución, se adicionó 1 mL de DNS y se calentó en baño maría por 5 min., se enfrió y se diluyó con 10 mL de agua destilada, se leyó la absorbancia a 540 nm. La absorción se ajustó con un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra a 540 nm.





### 5.11.5 AZÚCARES REDUCTORES TOTALES:

#### **Procedimiento:**

Se midieron 10 mL de la solución, se pusieron en un matraz erlenmeyer de 125 mL, se adicionó 1 mL de HCl conc., la muestra se calentó a 60<sup>0</sup>C en baño maría por 45 min., una vez transcurrido este tiempo se retiró del baño y se tomaron 5 mL de muestra, se le añadieron 2 mL de NaOH. 4M.

#### **Cuantificación:**

Se tomó 1 mL de solución, se adicionó 1 mL de DNS y se calentó en baño maría por 5 min., se enfrió y se diluyó con 10 mL de agua destilada, se leyó la absorbancia a 540 nm. La absorción se ajustó con blanco de reactivos y agua igualmente tratado que en la muestra a 540nm. Los azúcares reductores directos y totales se cuantificaron interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva estándar de glucosa en concentraciones de 0.2-2 mg/mL.



## 6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE TAMARINDO Y EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA SEMILLA COMPLETA Y FRACCIONADA

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la posibilidad de aislar el o los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante de la semilla que se había probado con anterioridad,<sup>(1)</sup> con esta finalidad se separó la cáscara de la semilla, en la tabla 2 se presenta el porcentaje de cada componente después del fraccionamiento de la semilla de tamarindo.

Tabla2.- Promedios y desviación estándar de la composición de la semilla de tamarindo

Componente	%
Germen	69 ± 0.45
Cáscara Completa	30 ± 0.25
Fracción Interna de la cáscara	17.21 ± 0.3
Fracción Externa de la cáscara	12.63 ± 0.15

Se puede observar que la semilla consta del 69% de germen y 30% de cáscara, hay que considerar que la cáscara es únicamente la fuente de protección. Con respecto al fraccionamiento de la cáscara, tenemos que la fracción interna de está es 5% mayor que la fracción externa.

Después de esta determinación, se probó la actividad hipoglucemiante de cada fracción y se comparó con la actividad de la semilla completa. La metodología que se siguió para preparar los extractos se describe en la parte experimental, las concentraciones de los extractos se calcularon de acuerdo con el trabajo anterior y de acuerdo con el uso tradicional que se da a la semilla en Ixtlahuaca, Estado de México.



La semilla o las fracciones se hirvieron en 100 veces su peso de agua y se evaporó el agua hasta la mitad del volumen inicial, a la infusión obtenida se adicionaron 50 veces su volumen de metanol destilado, para precipitar proteínas y carbohidratos complejos. Posteriormente se evaporó el metanol y se recuperó el volumen inicial con agua. Sin embargo, los extractos así preparados son más concentrados que el extracto preparado directamente de la semilla, porque, como ya se mencionó, cada fracción se hirvió en 100 veces su peso en agua, y las fracciones provienen de un peso determinado de semilla completa disuelta en 100 veces su peso en agua. Se toma en cuenta este hecho para comparar el efecto hipoglucemiante de la semilla y las fracciones, en la tabla 3 se muestra el aumento de la concentración de las fracciones con respecto a la semilla.

**Tabla 3.-** Aumento de la concentración de los extractos con respecto a la semilla.

<b>Extracto</b>	<b>Aumento de la concentración con respecto a la semilla</b>
<b>(I)</b> Semilla completa	-----
<b>(II)</b> Cáscara sin Fraccionar	3 veces
<b>(III)</b> Cáscara Externa	17 veces
<b>(IV)</b> Cáscara Interna más Germen	5 veces
<b>(V)</b> Cáscara Interna	10 veces
<b>(VI)</b> Extracto Metanólico	0 veces
<b>(VII)</b> Soluble en metanol	0 veces
<b>(VIII)</b> Insoluble en metanol	4 veces

Para los extractos VI y VII, no hay aumento de las concentraciones, ya que en estos casos se consideró inicialmente el peso la semilla completa y por lo tanto la concentración de los extractos es igual a la semilla.



En las tablas 4, 5, 6 se hace un resumen del efecto hipoglucemiante de los extractos que fueron estudiados. Los primeros experimentos Tabla 4, se hicieron con extractos de la semilla completa (extracto I), cáscara (extracto II) y cáscara externa (extracto III) administrados vía intragástrica en ratones sanos en concentraciones de 1 y 3 mg/mL. El control negativo, corresponde a la administración de 0.1 mL de agua destilada y el control positivo a la administración de 0.1 mL de insulina acción rápida.

La Tabla 5 muestra los resultados del fraccionamiento de la cáscara y en la Tabla 6 los resultados de extractos metanólicos de la cáscara completa. Los resultados en las tablas se expresan como el promedio ( $\bar{X}$ )  $\pm$  la desviación estándar ( $\sigma$ ). El porcentaje de disminución de la glucosa en sangre en los ratones se obtuvo con respecto al control negativo, la diferencia significativa entre el control negativo y la media de los extractos que presentaron actividad hipoglucemiante, se calculó por medio de una prueba no paramétrica (prueba de Wilcoxon), dando como el criterio de aceptación diferencias significativas para un valor de  $\alpha \leq 0.05$ .

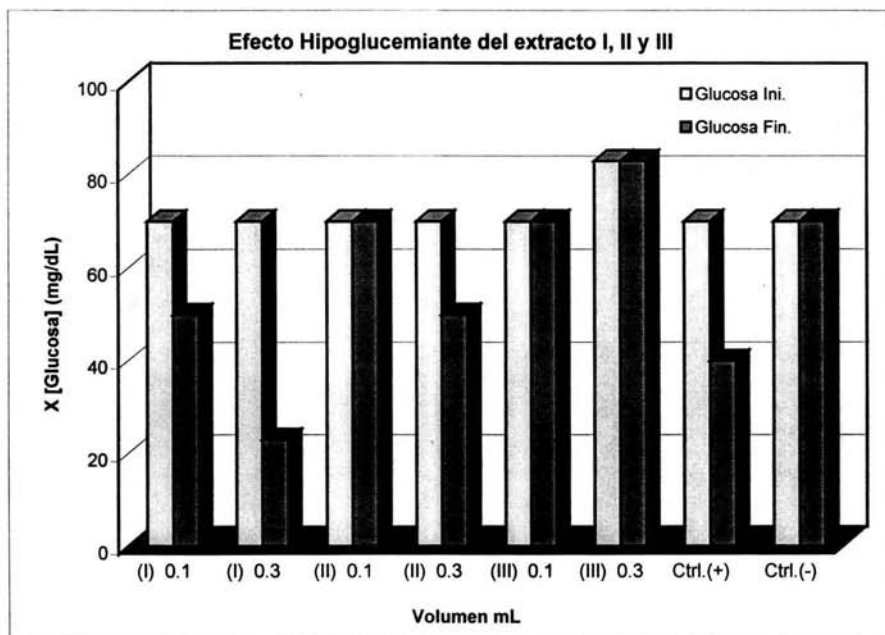
**Tabla No. 4.**-Efecto hipoglucemiante de la Semilla completa, Cáscara sin Fraccionar, Cáscara Externa, los resultados se describen como el promedio de tres experimentos. \* Diferencia significativa  $\alpha \leq 0.05$ .

Extracto	Volumen mL	Concentración [mg/mL]	Promedio Glucosa Inicial (mg/dL)	Promedio Glucosa Final (mg/dL)	Disminución de Glucosa (mg/dL)
<b>(I)</b> Semilla completa	0.1	1 ♣	70 $\pm$ 0	50 $\pm$ 0	20*
	0.3	3 ♣	70 $\pm$ 0	23 $\pm$ 0	47*
	Control (+)	----	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*
	Control (-)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
<b>(II)</b> Cáscara sin Fraccionar	0.1	1 ♦	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
	0.3	3 ♦	70 $\pm$ 0	50 $\pm$ 0	20*
	Control (+)	----	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*
	Control (-)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
<b>(III)</b> Cáscara Externa	0.1	1 ▲	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
	0.3	3 ▲	83 $\pm$ 0	83 $\pm$ 0	0
	Control (+)	----	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*
	Control (-)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0

♣ (I) Semilla completa, (II) ♦Cáscara sin Fraccionar, (III) ▲ Cáscara Externa, los resultados se describen como el promedio de tres experimentos. \* Diferencia significativa  $\alpha \leq 0.05$ .



**Gráfica 1.-** Promedio de glucosa inicial y final, después de la administración de los extractos I, II y III así como los controles positivo y negativo



En la gráfica 1 se observa que la administración de insulina (control +) disminuyó la glucosa en 42.9%. El control negativo no presentó cambio alguno. El extracto I a un volumen de 0.1 mL (concentración 1 mg/mL) de semilla completa, presentó una disminución de glucosa en 28.6%, esta disminución fue significativa, pero menor que el control (+), mientras que un volumen de 0.3 mL (concentración 3 mg/mL) de semilla, el porcentaje de respuesta fue de 67.1% mayor que el control (+).

El extracto II (cáscara completa) presentó una actividad diferente al de la semilla completa: a un volumen de administración de 0.1 mL (concentración 1 mg/mL) de cáscara sin fraccionar no presenta actividad, mientras que a un volumen de 0.3 mL (concentración 3 mg/mL) de cáscara, la actividad hipoglucemiante es de 28.6%, siendo significativa. La actividad del extracto II es menor en comparación con la semilla completa, considerando que el extracto II es 3 veces más concentrado que el extracto I.



Fraccionando la cáscara se observa que el extracto III (cáscara externa), no presenta actividad hipoglucemiante a las dosis administradas, a pesar de que este extracto fue 17 veces más concentrado que el extracto de semilla completa (I).

La gráfica 1 muestra que la fracción con mayor actividad es el de la semilla completa (extracto I), también se puede observar que hay una disminución en la actividad del extracto II con respecto al extracto I. Existe la posibilidad de que haya una relación entre la cáscara y el germen y al momento de fraccionar la semilla esta relación se rompa, dando como resultado un efecto débil en la cáscara completa (extracto II), mientras que en el extracto III, no pueden estar los compuestos responsables del efecto hipoglucemiante, por que no hay actividad alguna.

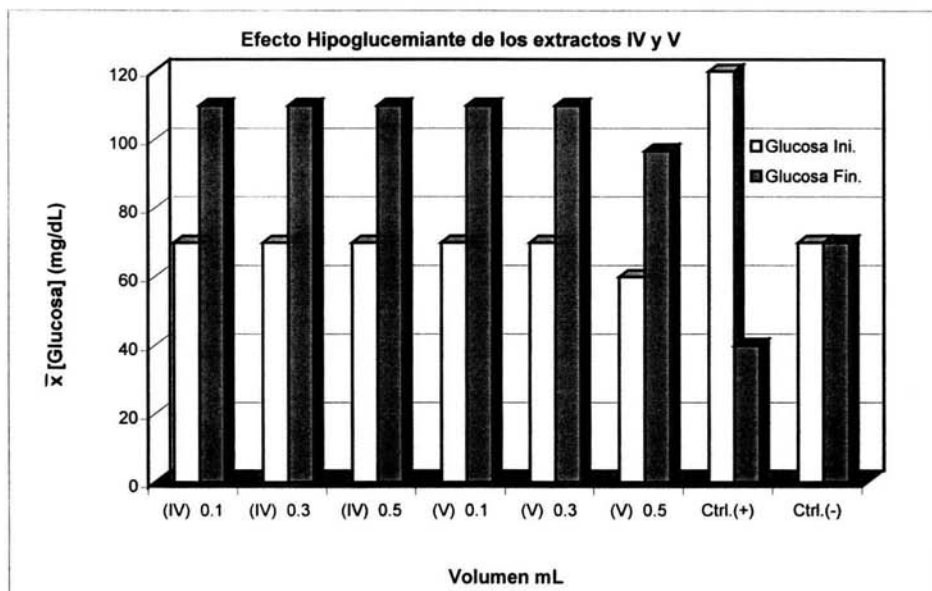
Al observar que en la cáscara existe la actividad hipoglucemiante se realizó un nuevo experimento usando la cáscara interna más el germen y únicamente la cáscara interna. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 y en la gráfica 2.

**Tabla No. 5.-** Efecto hipoglucemiante de los extractos ► (IV) Cáscara Interna más Germen, ▼ (V) Cáscara Interna, los resultados se describen como el promedio de tres experimentos. \* Diferencia significativa  $\alpha \leq 0.05$  en la disminución de la glucosa

Extracto	Volumen mL	Concentración [mg/mL]	Promedio Glucosa Inicial (mg/dL)	Promedio Glucosa Final (mg/dL)	Aumento de Glucosa (mg/dL)
(IV)	0.1	1►	70±0	110±0	40
Cáscara Interna más	0.3	3►	70±0	110±0	40
Germen	0.5	5►	70±0	110±0	40
Control (+)	0.1	----	70±0	40±0	30*
Control (-)	0.1	0	70±0	70±0	0
(V)	0.1	1▼	70±0	110±0	40
Cáscara Interna	0.3	3▼	70±0	110±0	40
	0.5	5▼	60±14	96.7±18	36.7
Control (+)	0.1	----	120±0	40±0	80*
Control (-)	0.1	0	70±0	70±0	0



**Grafica 2.** Promedio de glucosa inicial y final, después de la administración de los extractos IV (cáscara interna + germen), V (cáscara interna) así como los controles positivo y negativo.



Se observa que el extracto IV (cáscara interna más germen) provoca una hiperglucemia en los ratones a las dosis administradas, presentando un aumento del 57.1%. Es posible que los carbohidratos presentes en el germen ó en la cáscara, sean los responsables de este aumento. Se observó el mismo comportamiento en el extracto V (cáscara interna), a las dosis de 0.1 mL, 0.3 mL el aumento de glucosa fue de 57.1%, mientras que para la dosis de 0.5 mL se tiene un incremento del 61.2%, probablemente por la administración mayor de extracto. Es importante tomar en cuenta que el extracto IV y V también son extractos concentrados, quizá ésta sea la razón de la hiperglucemia.

Analizando los resultados, los carbohidratos de la semilla se encuentran probablemente en la fracción interna de la cáscara (extracto V), ya que en esta fracción el aumento de glucosa es semejante al del extracto IV. Considerando el contenido de 10.7 % de carbohidratos presentes en la cáscara, estos pueden ser la causa de la hiperglucemia.



Tratando de localizar el o los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante en la cáscara completa, se realizaron los siguientes experimentos con fracciones preparadas por extracción con disolventes orgánicos. El extracto metanólico (VI) se preparó a partir de la cáscara desengrasada, extraída con metanol, evaporando el metanol y disolviendo en agua.

El extracto VII se obtuvo por una extracción directa con metanol, del residuo de extracción acuosa: la cáscara estudiada se hirvió en 100 veces su peso en agua hasta la evaporación del 95% del volumen inicial, se adicionó metanol, se filtró el extracto, se evaporó el metanol y el agua a presión reducida obteniéndose un residuo al cuál se le adicionó metanol, para posteriormente dejarlo en agitación, dando como resultado un precipitado que se filtró, obteniéndose así dos fracciones una soluble en metanol (extracto VII) y la otra insoluble (extracto VIII), estas fracciones se disolvieron en agua, extracto VII 10 y 5 mL respectivamente, extracto VIII en 5 mL, posteriormente estos extractos se administraron a los ratones para determinar su actividad. Los resultados pueden verse en la tabla 6 y en la gráfica 3.

**Tabla 6.-** Efecto hipoglucemiante de los extractos ◀ (VI) Extracto Metanólico, ◊ (VII) Soluble en metanol, □ (VIII) Insoluble en metanol, los resultados se describen como el promedio de tres experimentos.

\*Diferencia significativa  $\alpha \leq 0.05$ .

Extracto	Volumen mL	Concentración [mg/mL]	Promedio Glucosa Inicial (mg/dL)	Promedio Glucosa Final (mg/dL)	Disminución de Glucosa (mg/dL)
(VI)	0.3	0.088 ◀	103.3±9.4	73.3±12.4	30*
Extracto Metanólico	0.5	0.148 ◀	96.6±9.4	70±0	26.6*
Control (+)	0.1	----	120±0	40±0	80*
Control (-)	0.1	0	70±0	70±0	0
(VII)	0.3	0.525 ◊	116.6±9.4	96.6±18	20*
Soluble en metanol	0.3	1.20	70±0	53.3±12.4	16.7*
Control (+)	0.5	1.9 ◊	70±0	43.3±4.7	26.7*
Control (-)	0.1	----	75±35	30±10	45*
Control (-)	0.1	0	70±0	70±0	0
(VIII)	0.3	0.24 □	86.7±30	60 ± 0	26.7*
Insoluble en metanol	0.1	----	75±35	30±10	45*
Control (-)	0.1	0	70±0	70±0	0



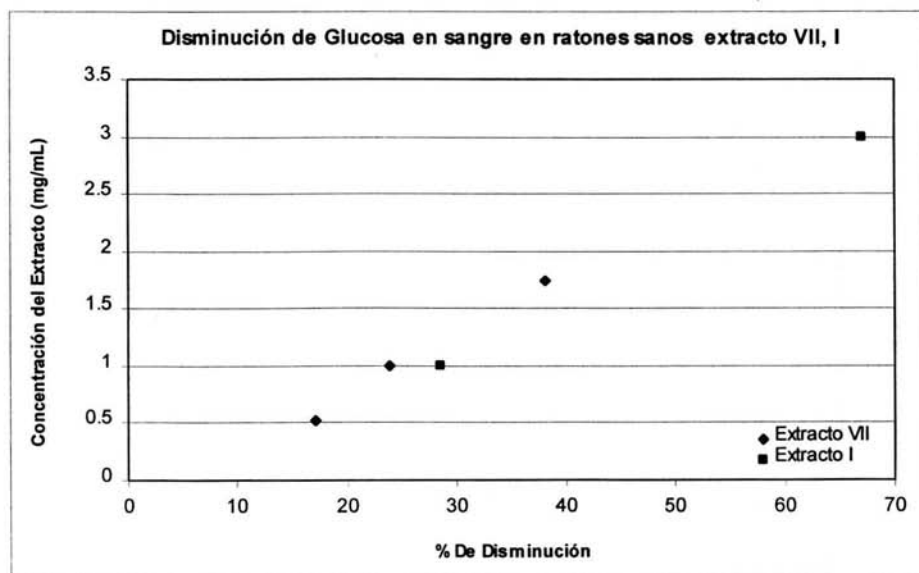


El extracto VI (Extracto metanólico), presentó efecto hipoglucemiante a las concentraciones administradas, para 0.88 mg/mL extracto metanólico presentó 29% de actividad, mientras que a una concentración mayor 1.48 mg/mL extracto metanólico el efecto fue similar que el anterior 27.5%, se esperaba que al ser mayor la concentración se tuviera un mayor efecto. Estas concentraciones son similares al Extracto I (semilla completa) y su efecto hipoglucemiante también es similar, por que a la concentración 1 mg/mL de semilla completa, presenta una disminución de glucosa del 28.6%.

La fracción VIII (insoluble en metanol) únicamente se probó a una concentración 0.24 mg/mL insoluble en metanol, y se obtuvo una disminución del 30.8%, pero este extracto es 4 veces más concentrado que el extracto I

El extracto VII (soluble en metanol) presentó una actividad hipoglucemiante interesante, en la gráfica 3 se muestra dicha actividad.

Gráfica 3 Porcentaje de disminución de la glucosa en sangre de ratones sanos del extracto VII (soluble en metanol), extracto I (Semilla completa), extracto II (cáscara completa) a diferentes concentraciones.





Para el extracto VII (fracción soluble en metanol) a la concentración de 0.525 mg/mL de fracción soluble, la glucosa disminuyó significativamente en 17.2%, por lo que se decidió aumentar la concentración de este extracto para determinar el porcentaje de respuesta.

La segunda concentración fue 1 mg/mL del extracto soluble en metanol, disminuyendo la glucosa en 23.9%, a esta misma concentración el Extracto I (semilla completa) presenta el 28.6% de respuesta, el efecto hipoglucemiante es parecido en ambos casos.

La tercera concentración del extracto VII (1.75 mg/mL soluble en metanol) presentó un efecto de 38.1%, para el extracto I a la concentración de 3mg/mL de semilla completa la actividad es de 67.1%, quizá el extracto VII pudiera llegar a tener esta misma actividad, se observa que conforme aumenta la concentración de dicho extracto aumenta su actividad.

## **6.2 TIEMPO DE ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS DE SEMILLA COMPLETA Y DE LA CÁSCARA**

Se estudio el tiempo de actividad hipoglucemiante de los extractos de semilla completa (I) así como de la cáscara sin fraccionar (II) en ratones sanos, los extractos fueron almacenados en refrigeración a una temperatura de 4<sup>0</sup>C desde el inicio de la prueba hasta el final de ésta. El ensayo se realizó durante 30 días. En la tabla 6 y gráfica 4 se hace un resumen del efecto hipoglucemiante de los extractos que fueron estudiados.

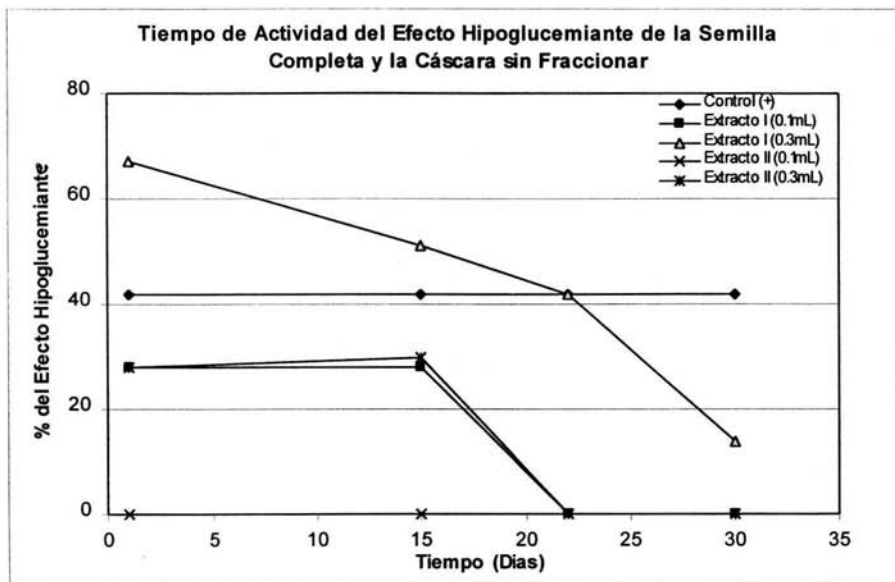


**Tabla No. 7** Tiempo de actividad hipoglucemiante de los extractos de semilla completa así como de la cáscara, los resultados se describen como el promedio de tres experimentos, se expresa el promedio (X)  $\pm$  la desviación estándar ( $\sigma$ ). \* Diferencia significativa  $\alpha < 0.05$

Extracto	Volumen mL	Concentración [mg/mL]	Promedio Glucosa Inicial (mg/dL)	Promedio Glucosa Final (mg/dL)	Disminución de Glucosa	
<b>(I)</b> Semilla completa	0.1	1	Día 1 70 $\pm$ 0	50 $\pm$ 0	20*	
	0.3	3		23 $\pm$ 0	47*	
	Control (+)	---		70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*
	Control (-)	0		70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
<b>(II)</b> Cáscara completa	0.1	1	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
	0.3	3	70 $\pm$ 0	50 $\pm$ 0	20*	
	Control (+)	---	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*	
	Control (-)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
<b>(I)</b> Semilla completa	0.1	1	Día 15 70 $\pm$ 0	50 $\pm$ 16	20*	
	0.3	3		30 $\pm$ 0	40*	
	Control (+)	---		70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*
	Control (-)	0		70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
<b>(II)</b> Cáscara completa	0.1	1	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
	0.3	3	100 $\pm$ 0	70 $\pm$ 16	30*	
	Control (+)	---	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*	
	Control (-)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
<b>(I)</b> Semilla completa	0.1	1	Día 22 70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
	0.3	3		40 $\pm$ 12	30*	
	Control (+)	---		70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*
	Control (-)	0		70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
<b>(II)</b> Cáscara completa	0.1	1	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
	0.3	3	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
	Control (+)	---	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	30*	
	Control (-)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	
<b>(I)</b> Semilla completa	0.3	3	Día 30 70 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	10	
	Control (+)	---		70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 12	30*
	Control (-)	0		70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0
	<b>(II)</b> Cáscara completa	0.3		3	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0
Control (+)		---	70 $\pm$ 0	40 $\pm$ 12	30*	
Control (-)		0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	0	



Grafica 4.-Promedio del % del efecto hipoglucemiante de los extractos I y II, durante un periodo de 30 días, así como los controles positivo y negativo.



Se observa que el extracto I a una concentración de (1 mg/mL de semilla completa) presenta efecto hipoglucemiante hasta los 15 días, posteriormente este efecto se pierde. Pero a una concentración mayor (3 mg/mL de semilla completa), el efecto es más prolongado, disminuyendo conforme avanza el tiempo, el primer día presentó un efecto del 67.1%, mientras que a los 30 días fue de 14.3%. Con respecto a la cáscara el volumen administrado de 0.1mL nunca presentó actividad hipoglucemiante. Para el volumen de 0.3mL, únicamente presentó efecto hasta los 15 días, siendo el mismo que el primer día 28.5% después de los 15 días el efecto se pierde.



### 6.3 PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LA CÁSCARA TRATADA EN SECO Y HÚMEDO:

Como era necesaria una cantidad representativa de muestra para la extracción de antioxidantes, el tratamiento de la muestra fue diferente, se realizó un cambio en el pelado de la semilla, en este caso la semilla se hidrató. Para comprobar que no existía pérdida de metabolitos secundarios se determinó el rendimiento obtenido del pelado en seco y húmedo

En las tablas 8 y 9, se muestran los rendimientos del pelado de la semilla en seco que corresponden a la preparación de un extracto metanólico desengrasado y en húmedo que corresponde a la hidratación de la semilla, se presentan los  $\bar{x} \pm \sigma$ .

Tabla No. 8

Extracción de cáscara separada en seco

Disolvente	% de Rendimiento
Hexano	0.205 $\pm$ 0.054
Acetato de Etilo	0.226 $\pm$ 0.007
Metanol	30.60 $\pm$ 0.8

Tabla No.9

Extracción de cáscara separada en húmedo

Disolvente	% de Rendimiento
Hexano	0.251 $\pm$ 0.029
Acetato de Etilo	0.233 $\pm$ 0.002
Metanol	28.91 $\pm$ 0.454

Se puede observar que no afecta el tratamiento de la muestra ya que los rendimientos son similares para el extracto Hexánico y el de Acetato de Etilo, únicamente se observa una variación del 2% en el extracto Metanólico, lo cual puede atribuirse a la disolución de algunos metabolitos solubles en agua. Para la obtención de los antioxidantes la cáscara se hidrato, debido a que el pelado en húmedo es más fácil y rápido.



#### 6.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTES DE LOS EXTRACTOS DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

Los antioxidantes son importantes en la diabetes, ya que los niveles de antioxidantes disminuyen en personas diabéticas. Se ha visto que las personas que presentan la enfermedad muestran un incremento en el estrés oxidativo, por que incrementan la formación de radicales libres, siendo estos los causantes de las complicaciones en la enfermedad.<sup>(42,43)</sup> Se ha estudiado el efecto que presenta la vitamina E y C en diabetes experimental y se ha observado que estos antioxidantes disminuyen el estrés oxidativo evitando así daños por los radicales libres.<sup>(15,22)</sup> Se determinó la capacidad antioxidante de la cáscara de la semilla de tamarindo, probándose el efecto antioxidante de dos extractos acetato de etilo y el metanólico.

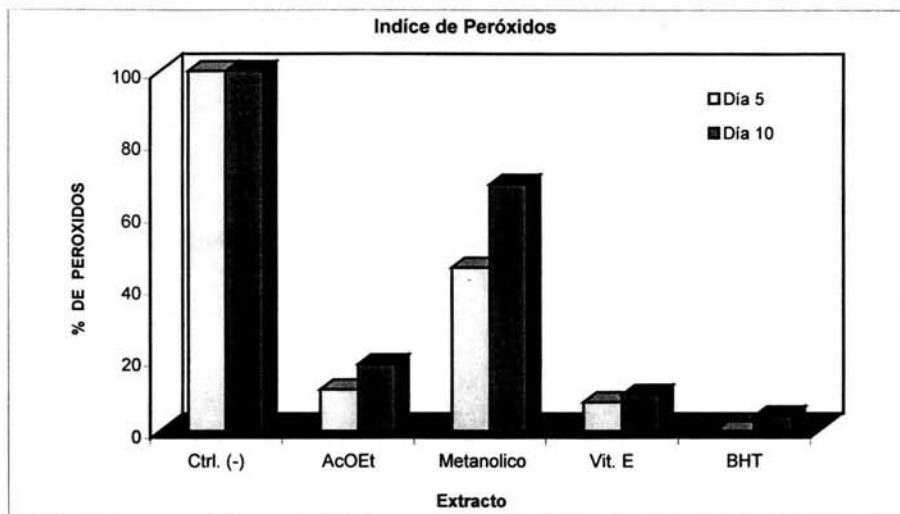
En la tabla No. 10 se presenta la actividad antioxidante de los extractos orgánicos vía húmeda

**Tabla No.10** Se muestra el Índice de Peróxidos de los extractos orgánicos, así como los controles (-) y positivo (BHT), (Vit. E), se presenta la  $\bar{x} \pm \sigma$

Extracto	IP	IP
	5 días	10 días
Control (-)	100 $\pm$ 5.7	100 $\pm$ 3.7
AcOEt	11.5 $\pm$ 1.91	18.5 $\pm$ 0.63
Metanol	45.5 $\pm$ 1.66	68.5 $\pm$ 2.34
Vit E	8 $\pm$ 0.14	10 $\pm$ 0.13
BHT	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0.41



**Gráfica 5** Promedio del % de Peróxidos formados en el sistema de ácido linoleico, al sistema se añadió 0.3mg de cada extracto, así como a los controles (+), el control (-) no se añadió extracto alguno.



En la gráfica 5 se observa que a los 5 días el sistema con el extracto de acetato de etilo, muestra un alto poder antioxidante, con respecto al control negativo y al extracto metanólico, ya que este retarda el deterioro oxidativo en un 88.5%, mientras que el extracto metanólico tan solo retarda 54.5%, observando al antioxidante vit.E, retarda el 92% la formación de peróxidos, parecido al extracto AcOEt, mientras que el BHT es el que presenta mayor poder antioxidante, ya que a los 5 días en el sistema no hay deterioro.

A los 10 días se observa que el sistema con el extracto de AcOEt, continua retardando la formación de peróxidos pero ahora en un 81.5%, el extracto metanólico tan solo retarda el 31.5%, para la vit.E la formación de peróxidos es de 10%, y en el sistema con BHT comienza el deterioro. Para que el extracto de AcOEt tenga la misma actividad que el BHT, se requeriría de una mayor concentración, ya que el BHT a los 5 días es 12 veces más efectivo que el extracto de AcOEt., y a los 10 días es 14 veces. No existe una diferencia significativa entre la Vit. E y el extracto de AcOEt.

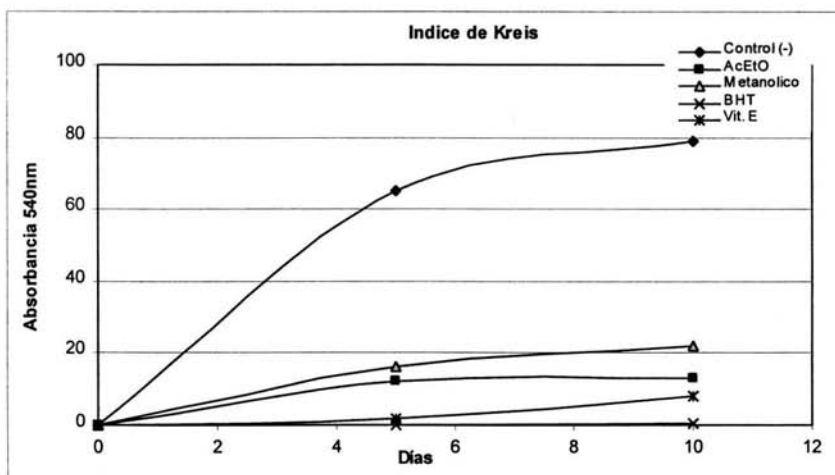
En la tabla 11 se presenta la formación de compuestos secundarios, determinados por el índice de Kreis



**Tabla No.11** Se muestra el Índice de Kreis de los extractos orgánicos, así como los controles (-) y positivo (BHT), (Vit. E), se presenta la  $\bar{x} \pm \sigma$

Extracto	IK abs/g de aceite	
	5 días	10 días
Control (-)	65 $\pm$ 0.15	79.4 $\pm$ 0.9
AcOEt	12 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0.3
Metanol	16 $\pm$ 0.92	22 $\pm$ 0.34
Vit E	2 $\pm$ 0.025	8 $\pm$ 0.06
BHT	0 $\pm$ 0	0.4 $\pm$ 0.07

**Gráfica 6** Se presenta el promedio de formación de compuestos carbonílicos en un sistema de ácido linoleico con o sin adición de antioxidantes.



Como los peróxidos están sujetos a reacciones secundarias de degradación, dando lugar a compuestos carbonílicos, en la gráfica 6 se observa el aumento en la concentración de dichos compuestos, los cuales se pueden apreciar en el control negativo, conforme aumenta el tiempo, la formación de los compuestos carbonílicos aumenta.

No en todos los casos se tiene el mismo comportamiento, el extracto metanólico presenta un deterioro 3 veces menor que el control a los 5 días, mientras que para el extracto de AcOEt es 4 veces menor.





Obteniéndose un mejor resultado con la Vit. E ya que retarda la formación 24 veces y el BHT a los 5 días no presenta formación de estos compuestos. A los 10 días aumenta la concentración de compuestos carbonílicos en todos los extractos; esto indica que el deterioro esta avanzando, pero este aumento no es muy alto con respecto al control negativo.

## 6.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDO CON ACETATO DE ETILO

El extracto de Acetato de Etilo fue el que presentó mayor actividad antioxidante, por lo se realizó su fraccionamiento mediante cromatografía en columna, obteniéndose 12 fracciones. En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos

**Tabla No. 12** Se presentan los mg obtenidos del fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo y los resultados de CCF.

Fracciones	mg de muestra	Fracciones primarias	Componentes CCF
A	366.1	1-16	1
B	297.1	17-48	1
C	50	49-59	Mezcla
D	10	60-70	Mezcla
E	122.3	71-91	Mezcla
F	57.9	92-99	2
G	13.3	100-116	2
H	43.2	117-119	Mezcla
I	2.7	120-124	Mezcla
J	5.7	135-148	Mezcla
K	0.3	149-151	Mezcla

Mediante el análisis por CCF, se determinó que las fracciones A, B constaban de un solo compuesto, por lo que se utilizó un estudio espectroscópico.



## 6.6 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS EXTRACTOS A, B, F y G.

Tabla 13.- datos espectroscópicos de las fracciones A, B, F y G.

Fracciones	IR $\text{cm}^{-1}$	EM # de compuestos
A	3007,1746,1464, 1163,722	Mezcla de grasas ó aceites
B	2925,2553,1736,1464,1 245,1175,1030,723,699	Mezcla de grasas ó aceites
F	3396,2918,1710,1463, 1260,1166,1720	8
G	3380,2925,2853,1712, 1261,1027	4

Los espectros de infrarrojo muestran que para las fracciones A y B existe la presencia de grupos metilos y metilenos, así como posibles grupos carbonilos de éster. Con respecto al espectro de masas en ambos espectros se observa una mezcla de grasas.

Las fracciones F y G también se analizaron por medio de infrarrojo se detectó la presencia de grupos metilos, metilenos y posibles grupos cetonicos, con respecto a los espectros de masas para la fracción F hay 8 compuestos uno en mayor proporción que corresponde a un compuestos que presentó un ion molecular de  $M^+$  279 el cual no se logró identificar. El extracto G consta de 4 compuestos, uno en mayor proporción siendo el mismo compuesto que esta presente en la fracción F, ion molecular de  $M^+$  279g/mol.

La complejidad por CCF en el resto de las fracciones, aunado a la cantidad de muestra insuficiente impidió su análisis subsiguiente.



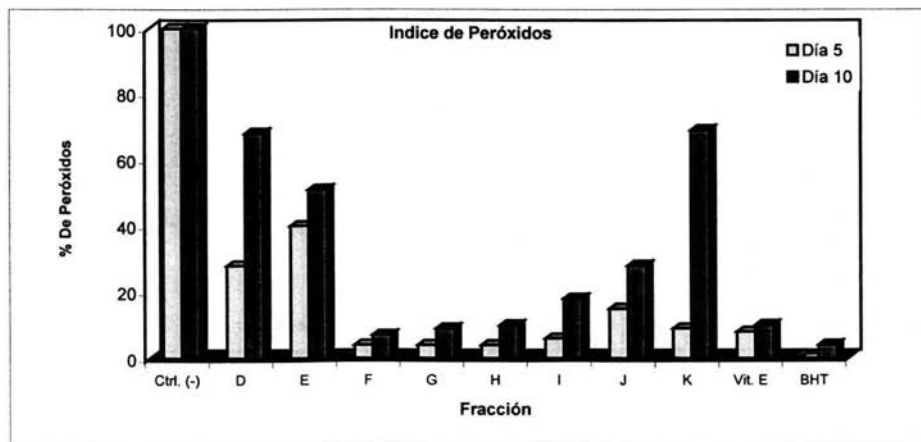
## 6.7 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Una vez fraccionado el extracto se realizó una evaluación del efecto antioxidante de cada fracción en el sistema de ácido Linoleico. En la Tabla No. 14 se muestra el Índice de Peróxidos e Índice de Kreis de las fracciones del extracto de acetato de etilo, así como los controles (-) y positivo (BHT), (Vit. E), se presenta la  $\bar{x} \pm \sigma$ .

Tabla No. 14 Índice de Peróxidos e Índice de Kreis

Fracción	% IP 5 días	% IP 10 días	IK abs/g de aceite 5 días	IK abs/g de aceite 10 días
Control (-)	100 ± 1.6	100 ± 0.8	67 ± 1.5	77 ± 0.9
D	28 ± 3.2	68 ± 3.2	2 ± 0.025	27 ± 0.006
E	40 ± 2.8	51 ± 0.20	5 ± 0.45	19 ± 0.0715
F	4 ± 0	7 ± 0.68	1 ± 0.4	2 ± 0.031
G	4 ± 0	9 ± 0.46	1 ± 0	2 ± 0.056
H	4 ± 0	10 ± 0.46	1 ± 0.12	2 ± 0.29
I	6 ± 0	18 ± 0	1 ± 0.1	11 ± 0.021
J	15 ± 1.91	28 ± 0	4 ± 0.2	6 ± 0.25
K	9 ± 1.91	69 ± 0	1 ± 0.2	12 ± 1.15
Vit E	8 ± 0.14	10 ± 0.13	2 ± 0.025	8 ± 0.06
BHT	0 ± 0	4 ± 0.41	0 ± 0	0.4 ± 0.07

Gráfica 7 Promedio del % de Peróxidos formados en el sistema de ácido linoleico del fraccionamiento de Acetato de Etilo





Se observa un alto poder antioxidante en las fracciones F, G y H, en un 96%, presentando mayor efectividad que la Vit. E (92%), sin embargo el BHT no presenta formación de peróxidos a los 5 días. Para la fracción I la formación de peróxidos se retrasa un 94%, el cual es 2% mayor que la Vit. E. El extracto J presenta una efectividad de 85%, 3% menos que el extracto de AcOEt, pero el extracto K a los 5 días retrasa un 91% parecido a la Vit.E. El retraso en la formación de peróxidos para los Extractos D (72%) y E (60%) es bajo, pero comparándolos con el extracto metanólico (54.5%) se tiene un mejor poder antioxidante.

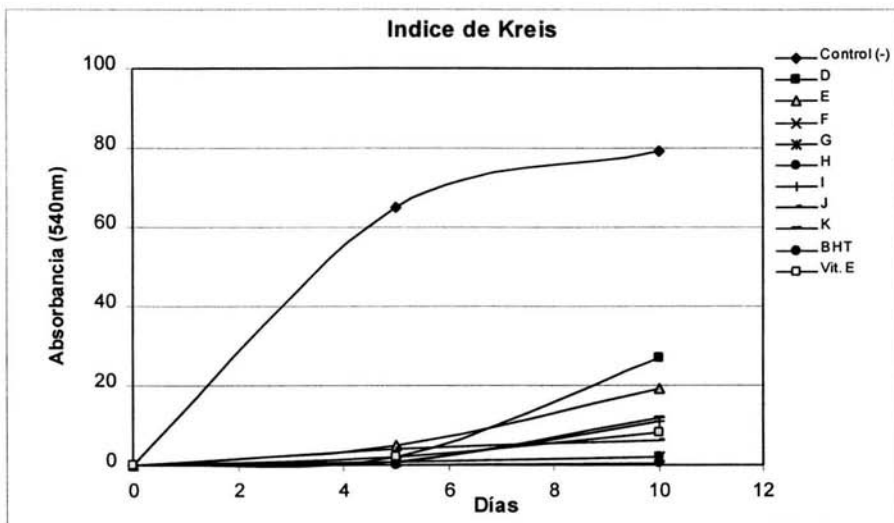
A los 10 días encontramos que los extractos F, G y H continúan presentando poder antioxidante, retrasando la formación de peróxidos en un 93%, 91% y 90% respectivamente, la Vit. E retrasa un 90%, en el BHT comienza el deterioro, pero se tiene una efectividad del 96%.

El extracto I presenta un 82% de efectividad, menor que el Extracto de AcOEt, mientras que el extracto J presenta un 72%, sin embargo el extracto K no presenta efectividad ya que se pueden observar un alto porcentaje de peróxidos, así como también en los extractos E y D.

A continuación se presenta la gráfica del comportamiento de los compuestos secundarios (Índice de Kreis) en el fraccionamiento del extracto de AcOEt



Gráfica 8 Se presenta el promedio en la formación de compuestos carbonílicos del fraccionamiento del extracto de AcOEt, así como a los controles (+) y (-)



En la gráfica 8 se observa que todas las fracciones presentan similitudes en la formación de compuestos carbonílicos a los 5 días comparados con el control negativo, a los 10 días aumentan estos compuestos, siendo significativo con las fracciones D y E. En la fracción I y K también se observa un incremento significativo en los compuestos carbonílicos pero es menor que en las fracciones anteriores.

Para las fracciones F, G y H, se tiene una mínima concentración de estos compuestos, siendo menor que la Vit. E.



## 6.8 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

Para complementar el estudio de la cáscara de semilla de tamarindo se decidió analizar su Composición Próximal de acuerdo a la AOAC 1980, se presentan los  $\bar{x} \pm \sigma$ .

Tabla 15. Composición Próximal de la cáscara de la Semilla de Tamarindo.

Determinaciones	%Base húmeda	% Base seca
Humedad	14.298 $\pm$ 0.045	-----
Proteína	17.920 $\pm$ 0.472	20.910
Grasa	1.172 $\pm$ 0.119	1.368
Fibra	17.415 $\pm$ 0.534	20.320
Cenizas	1.346 $\pm$ 0.022	1.570
Carbohidratos asimilable por diferencia	47.849	55.832

Al realizar el fraccionamiento de la semilla se determinó que está formada por 70% de Germen y 30 % de Cáscara. En la Tabla 15 se presenta el Análisis Proximal de la cáscara de la semilla de tamarindo, comparando este análisis con la semilla completa que se ha descrito anteriormente <sup>(44)</sup> se observa que: el contenido de proteína en la cáscara es alto (17.92%), ya que la semilla completa presenta (12.87%) de acuerdo a Balogun M. <sup>(44)</sup> y este corresponde al valor total de la semilla, se esperaba un valor menor o igual, hay que considerar que el contenido de metabolitos primarios puede variar de un fruto a otro, debido a las diferentes condiciones de cultivo. Comparando el contenido de proteína de la cáscara y el que generalmente presentan las leguminosas (17-30%) concuerda, aunque no necesariamente este porcentaje de proteína nos indica su eficacia nutricional.

De acuerdo al contenido de Grasa, la semilla presenta (11.1%) siendo mayor que la cáscara, posiblemente la cantidad faltante se encuentre en el germen, tomando en cuenta el contenido de grasa de la cáscara, concuerda con el que presentan las leguminosas de consumo común, el cual varía de 1-3%, a excepción del cacahuate (43%) y la soya (18%).



Con respecto a la fibra el contenido es alto, la semilla presenta un (15.78%) y en general para las leguminosas es de 3-5%, posiblemente este valor inusual de fibra se deba a que la cubierta o testa es muy gruesa y dura en esta leguminosa. Para las cenizas el contenido reportado en la semilla es de (5.0%) y el que presenta la cáscara es muy pequeño, existe la posibilidad que la cantidad faltante se encuentre en el germen, o también se puede justificar por el alto contenido de proteína, las leguminosas generalmente presenta un valor de 2.5-4.2 %. En cuanto al contenido de carbohidratos asimilables la semilla presenta (55.25%), similar al obtenido en la cáscara, las leguminosas contienen del 57-65% de carbohidratos y el valor obtenido es muy semejante.

En la tabla 16 se presenta el contenido de azúcares en la cáscara de la semilla, determinando azúcares reductores y no reductores por el método ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS).

<b>% Azúcares Reductores Directos</b>	<b>% Azúcares No Reductores</b>	<b>% Azúcares Totales</b>
0.686 ± 0.012	11.413 ± 0.451	10.727

**Tabla No. 16** Determinación de azúcares totales en la cáscara de la semilla de Tamarindo.

Aproximadamente el 94 % de los azúcares solubles en agua de la cáscara son azúcares no reductores, mientras que el 6% son azúcares reductores directos, no existe reporte alguno acerca de los azúcares solubles en la semilla.



## 7.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El extracto acuoso después de precipitar proteínas y carbohidratos de la semilla de tamarindo (extracto I) a diferentes concentraciones presenta mayor actividad que los extractos similares de la cáscara.
- La extracción con metanol de la cáscara produce un residuo que se puede fraccionar por disolución en agua. El producto soluble en agua tiene una actividad hipoglucemiante similar que el extracto de semilla completa
- La actividad hipoglucemiante de la cáscara desaparece después de 2 semanas de almacenamiento a 4 °C.
- La semilla de tamarindo tiene antioxidantes que evitan la formación de peróxidos y de compuestos secundarios en ácido linoleico. En el fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo se encontraron algunas fracciones con mayor actividad antioxidante que el extracto completo.
- Para identificar los compuestos antioxidantes y/o hipoglucemiantes de la cáscara, es necesario trabajar con una mayor cantidad de muestra.
- Con respecto al análisis proximal se encontró que la cáscara de la semilla de tamarindo es una fuente rica en carbohidratos, así como nitrógeno total y fibra.





## 8.0 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Kalkech Cordero Guadalupe Yazmin 2002 Tesis: Evaluación del Efecto Hipoglucemiante de los Extractos de Tamarindos indica Linn en Ratones. Facultad de Química UNAM México D.F.
- 2.- Tsuda Takanori, Mizuno Kosuke, Ohshima Katsumi, Kawakishi Shunro, 1995. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidative Components from Tamarind (*Tamarindus indica*) Seed Coat *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (43) 2803-2806
- 3.- Tsuda Takanori, Watanabe Mie, Ohshima Katsumi, Yamamoto Akira. 1994. Antioxidative Components Isolated from the Seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.) *J.Agric. Food Chem.* (42) 2671-2674
- 4.- Marangoni A., Alli I., Kermasha S. 1988. Composition and Properties of Seeds of the Tree Legume *Tamarindus indica*. *Journal of Science Food* (53) 1452-1455
- 5.- *Tamarindus indica* L. publicado en *Species Plantarum* 1:34. (1753) [www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/22-legumenz.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/22-legumenz.pdf)
- 6.- *Tamarindus indica* 30 Jhon A. Parrota [www.fs.fed.us/global/iitf/Tamarindusindica.pdf](http://www.fs.fed.us/global/iitf/Tamarindusindica.pdf)
- 7.- Generalidades del Tamarindo [www.centa.gob.sv/documentos/otrainfo/agricola/tamarindo.doc](http://www.centa.gob.sv/documentos/otrainfo/agricola/tamarindo.doc)
- 8.- Gidley J.Michael, Lillford J. Peter, Rowlands W. David. 1991. Structure and Solution Properties of Tamarind-Seed Polysaccharide. *Carbohydrate Research.* (214) 299-314
- 9.- H.D.Belitz-W.Gras *Química de Alimentos* Ed. Zaragoza 1997
- 10.- Alarcon-Aguilar F.J., Jimenez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., Roman-Ramos R. 2000. Hypoglycemic Effect of Extracts and Fractions from *Psacalium decompositum* in Healthy and alloxan-diabetic mice *Journal of Ethnopharmacology* (72) 21-27
- 11.- Casanueva Esther, Kaufer-Horwitz Martha, Pérez-Lizaur Ana Berta, Arroyo Pedro, *Nutriología Medica*. Ed. Panamericana 1995



- 12.- Syiem D., Syngai G., Khup P., Khongwir B.S Kharbuli B. , Kayang H. 2002. Hypoglycemic Effects of *Potentilla fulgens* L. in normal and alloxan-induced diabetic mice *Journal of Ethnopharmacology* (83) 55-61
- 13.- Pari L., Maheswari J. Uma 1999. Hypoglycaemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats *Journal of Ethnopharmacology* (68) 321–325
- 14.- Giugliano Dario, Ceriello Antinio and Paolisso Giuseppe 1995 Diabetes Mellitus, Hipertensión, and Cardiovascular Disease: Which Role for Oxidative Stress? *Metabolism* (44) 363-368
- 15.- Paolisso Giuseppe, D'Amore Anna, Giuliano Dario, Ceriello Antonio 1993 Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients *Am. J. Clin. Nutr.* (57) 650-656
- 16.- Salonen T. Jukka, Nyssönen Kristiina, Pekka-Tomi and Korpela Heikki 1995 Increased Risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follows up study in men. *British Medical Journal* (311) 1124-1127
- 17.- Ramazan Sekeroglu Mehmet, Sahin Havva, Dülger Haluk. 2000. The Effect of Dietary Treatment on Erythrocyte Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Serum Lipid Peroxidation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus *Clinical Biochemistry*, Vol. 33, No.8, 669–674
- 18.- Reaven D. Peter, Herold A. David, Barnett Joellen and Edelman Steve 1995 Effects of Vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM *Diabetes Care* (18) 807-816
- 19.- Seghrouchni Ilham, Draï Jocelyne, Bannier Edith, Riviere Joël, Calmard Pascale, Garcia Isabelle, Orgiazzi Jacques, 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency *Clinica Chimica Acta* (321) 89–96

- 20.- Coleman D. Michael, Fernandes Sandra, Khanderia Leena 2003. A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamins E, C and  $\alpha$ -lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation Environmental Toxicology and Pharmacology (14) 69-75
- 21.- Dincer Yýldýz., Alademira Zeynep, Iýlkovab Hasan, Akcay Tlay 2002. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control Clinical Biochemistry (35) 297-301
- 22.- Hee Hong Jung, Mi-Ji Kim, Mo-Ra Park, Oh-Gye Kwag, In-Seon Lee, Boo Hyeong Byun, Soo-Chun Leef, Kyung-Bok Lee, Soon-Jae Rhee 2004 Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. Clinica Chimica Acta (340) 107- 115
- 23.- Mandhavi D.L. y Deshpande S.S Technological toxicological and health perspectives Food Antioxidants Capitulo 3
- 24.- Clifford J. Bailey PhD; Caroline Day, PhD. 1989 Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. Diabetes Care. (12) 553-64
- 25.- Virdi Jaspreet, Sivakami S. , Shahani S. , Suthar A.C., Banavalikar M.M., Biyani M.K. 2003. Antihyperglycemic Effects of Three Extracts from *Momordica charantia* Journal of Ethnopharmacology (88) 107-111
- 26.- Alarcon-Aguilar F.J., Roman-Ramos R., Perez-Gutierrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C.C, Flores-Saenz J.L. 1998. Study of the Anti-hyperglycemic Effect of Plants Used as Antidiabetics Journal of Ethnopharmacology (61) 101-110
- 27.- Román Ramos Rubén, Lemus Lara Alicia, Alarcon Aguilar Francisco, Flores Saenz José Luis 1992. Hypoglycemic Activity of Some Antidiabetic Plants. Archives of Medical Research (23) No.3 105-109
- 28.- Vinik I. Aaron, Jenkis, J.A. David 1998. Dietary Fiber in Management of Diabetes. Diabetes Care (11) 160-173



- 29.- Ibañez Camacho Rafael, Roman Ramos Rubén. 1979. Hypoglycemic effect of *Opuntia cactus*. *Investigación Medica* (10) 223-229
- 30.- Rodríguez, P. 1984 Natural antioxidants *Tecnología Alimentaria* 19 (6) 26-28
- 31.- Packer, L. 1999 Antioxidant food supplement in human health Editorial Academic Press
- 32.- Tsuda Takanori, Ohshima Katsumi, Kawakishi Shunro, Osawa Toshihiko 1994. Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (42) 248-251
- 33.- Moure Andrés, Cruz Jose M., Franco Daniel, Domínguez J. Manuel, Sineiro Jorge, Domínguez Herminia. 2001 Natural antioxidants from residual sources *Food Chemistry* (72) 145-171
- 34.- Dapkevicius A., Rimantas, V. y Juzef, P. 1998 Antioxidant activity of Extracts obtained of different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania *Journal Science Food Agriculture* (77) 140-146
- 35.- Osawa Toshihiko and Namiki Mitsuo 1981 A Novel of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of *Eucalytus* leaves (45) 735-739
- 36.- Harbone Mabry 1975 *The flavonoids Part 1* Academic Press, USA p.p. 1-46
- 37.- Pomeranz Yeshajahu, Meloan E., Clinton. *Food Analysis Theory and Practice* third edition p.p. 627-639 Ed. Chapman and Hall 1994
- 38.- Egan, H. Kirk R. and Sawyer R. *Análisis Químicos de los Alimentos de Person* Ed. Continental México 1988
- 39.- Gray, J. L. Measurement of Lipid Oxidation 1978 *Journal A. Oil Chem. Sc.* (55) 539-546
- 40.- Patton, S., Keeney M. and Kutz, G.W. 1951 Compounds Produced in the Kreis color reaction with Particular Reference to Oxidized Milk fat *Journal AOCS* (28) 391
- 41.- *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 1980



- 42.- Bhor V.M., Raghuram N., Sivakami S. 2004. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (36) 89–97
- 43.- McCune M. Letitia, Johns Timothy 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest Journal of Ethnopharmacology (82) 197-205
- 44.- Balogun M. Adebisi, Fetuga L. Babatunde. 1986. Chemical Composition of Some Underexploited Leguminous Crop Seeds in Nigeria J.Agric. Food Chem., (34), 189-192
- 45.- Alarcon-Aguilar F.J., Roman-Ramos R., Jimenez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., Gonzalez-Paredes B., Flores-Saenz J.L. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits Journal of Ethnopharmacology (55) 171-177
- 46.- Alarcon-Aguilar F.J., Jimenez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., Gonzalez-Paredes B., Weber C.C., R. Roman-Ramos (2000) Hypoglycemic activity of root water decoction sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. Journal of Ethnopharmacology (69) 207–215
- 47.- Bocco, A.; Cuvelier, M. E.; Richard, H.; Berset, C. 1998, Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. J. Agric. Food Chem. (46) 2123-2129
- 48.- Donovan L. Jennifer, Meyer S. Anne, Waterhouse L. Andrew. 1998. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus domestica*). Journal of Agricultural and Food Chemistry (46) 1247-1252
- 49.- Gallan Pilar Martin, Carrascos Antonio, Gussinye Miguel, and Dominguez Carmen (2003) Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 34, No. 12, pp. 1563–1574



- 50.- Gallagher A.M., Flatt P.R., Duffy G., Abdel-Wahab Y.H.A. 2003. The effects of traditional antidiabetic plants on *in vitro* glucose diffusion Nutrition Research (23) 413–424
- 51.- Grover J.K., Yadav S., Vats V. 2002. Medicinal Plants of India with Anti-diabetic Potential Journal of Ethnopharmacology (81) 81- 100
- 52.- Hsua Chun-Sen, Chiub Wan-Chun, Yehb Sung-Ling, 2003. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids, and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutrition Research (23) 67–75
- 53.- Hii. CST, Howell SL: 1985. Effects of flavonoids on insulin secretion and  $Ca^{2+}$  handling in rat islets of Langerhans. Journal Endocrinology (107) 1-8
- 54.- Kalt Wilhelmina, Forney F. Charles, Martin Antonio. 1999. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits Journal Agricultural and Food Chemistry (47) 4638-4644
- 55.- Kanner Joseph, Frankel Edwin, Granit Rina, German Bruce 1994. Natural Antioxidants in Grape and Wines Journal of Agricultural and Food Chemistry (42) 64-69
- 56.- Maruta Yoshihiko, Kawabata Jun, Niki Ryoya. 1995. Antioxidative Caffeoylquinic Acid Derivatives in the Roots of Burdock (*Arctium lappa* L.) Journal of Agricultural and Food Chemistry (43) 2592-2595
- 57.- Mohamada Sameer, Tahaa Asia, Bamezaia R.N.K., Farhat Basirb Seemi, Najma Zaheer Baquera. 2004 Lower doses of vanadate in combination with trigonella restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats Clinica Chimica Acta (342) 105– 114
- 58.- Quan Shou, Kaminski Pawel M., Liming Yang,a Toshisuke Morita,d Muneo Inaba, Susumu Ikehara, Goodman Alvin I., Michael S. Wolin and Nader G. Abraham (2004) Heme oxygenase-1 prevents superoxide anion-associated endothelial cell sloughing in diabetic rats. Biochemical and Biophysical Research Communications (315) 509–516



- 59.- Román Ramos Rubén, Lemus Lara Alicia, Alarcón Aguilar Francisco, Flores Saenz José Luis 1992. Hypoglycemic Effect of Plants Used in Mexico as Antidiabetics. Archives of Medical Research (23) 59-64
- 60.- Román Ramos Rubén, Lemus Lara Alicia, Partida Hernández Guadalupe, Alarcón Aguilar Francisco, Flores Saenz Jose Luis 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. Archives of Medical Research (22) 87-93
- 61.- Sabu M.C., Kuttan Ramadasan 2002. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property Journal of Ethnopharmacology (81) 155-160
- 62.- Tortoriello Jaime, Romero Ofelia. 1992. Plants Used by Mexican Traditional Medicine with Presumable Sedative Properties: An Ethnobotanical Approach Archives of Medical Research (23) No.3 111-116
- 63.- Vats V., Grover J.K., Rathi S.S. 2002. Evaluation of Anti-hyperglycemic and Hypoglycemic Effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology (79) 95–100
- 64.- Wolfe Kelly, Wu Xianzhong, Hai Liu Rui. 2003. Antioxidant Activity of Apple Peels Journal of Agricultural and Food Chemistry (51) 609-614
- 65.- Zia Tayyaba, Nazrul Hasnain S., Hasan S.K. 2001. Evaluation of the Oral Hypoglycaemic Effect of *Trigonella foenum-graecum* L. (methi) in normal mice. Journal of Ethnopharmacology (75) 191–195



## 10.0 ANEXOS

### HUMEDAD

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_i - P_f) \times 100}{m}$$

Donde:

**Pf** = Peso del pesafiltro más muestra seca

**Pi** = Peso del pesafiltro más muestra húmeda

**m** = Peso de la muestra

### PROTEÍNA CRUDA

Cálculos:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(P - B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

Donde:

**P** = volumen gastado en la titulación de la muestra (mL)

**B** = volumen gastado en la titulación del blanco (mL)

**N** = Normalidad de la NaOH

**meq** = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

**m** = peso de muestra en gramos

**F** = factor de conversión (6.25)

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ N}_2 \times F$$



**GRASA CRUDA ( Método Soxhlet)**

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

**P<sub>f</sub>** = peso del matraz después de la extracción**P<sub>o</sub>** = peso del matraz vacío con perlas**m** = peso de la muestra en gramos**FIBRA CRUDA**

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

**P<sub>s</sub>** = peso del crisol con el residuo seco**P<sub>c</sub>** = peso del crisol con el residuo calcinado**m** = peso de la muestra en gramos**CENIZAS (Método cenizas totales)**

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

**P<sub>f</sub>** = peso del crisol con las cenizas**P<sub>o</sub>** = peso del crisol vacío**m** = peso de la muestra en gramos



## DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y NO REDUCTORES POR ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS)

Cálculos:

Determinación de azúcares reductores:

$$\% \text{ de az. red.} = \frac{\text{mg de glucosa} \times \text{aforo} \times 1 \text{ g gluc.}}{\text{g de muestra} \times 1000 \text{ mg gluc.}} \times 100$$

$$\% \text{ de az. red. totales} = \frac{\text{mg de azúcar invertido} \times \text{aforo1} \times \text{aforo2} \times 1 \text{ g gluc.}}{\text{g de muestra} \times \text{alícuota} \times 1000 \text{ mg gluc.}} \times 100$$

% Azúcares totales solubles en agua = %Azúcares reductores directos - %Azúcares reductores totales

## ÍNDICE DE PERÓXIDOS. MÉTODO VOLUMÉTRICO

$$\text{mEq} = \frac{(\text{mL de Tiosulfato mtra.} - \text{mL de Tiosulfato bco.}) \times N \text{ de Tiosulfato} \times 1000}{\text{g de muestra}}$$

## ÍNDICE DE KREIS

Cálculos:

Donde:

$A_m$  = es la absorbancia de la muestra

$A_b$  = es la absorbancia del blanco de reactivos

$l$  = es la longitud de la celda (1cm)

$$I \text{ Kreis} = \frac{A_m - A_b}{l \times \text{gr de grasa}} = \text{índice / g grasa}$$