



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-
HIPERGLUCEMIANTE DE LOS COMPUESTOS
OBTENIDOS DE LAS HOJAS DE *ANNONA
CHERIMOLA* MILLER**

T E S I S

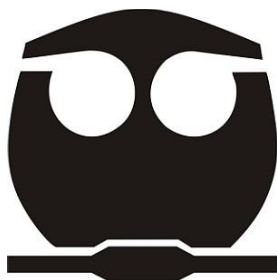
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

HERNÁNDEZ SALVADOR ERIKA



Ciudad de Universitaria, CDMX 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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	Profesor: Isabel del Carmen Rivero Cruz
Vocal	Profesor: Marlene Osiris Carreón Aguilar
Secretario	Profesor: Fernando Calzada Bermejo
1er. suplente	Profesor: Mario Alberto Figueroa Saldívar
2do. suplente	Profesor: Alberto Hernández León

SITIO DE REALIZACIÓN

Esta tesis se realizó en la unidad de Investigación Médica en Farmacología, 2º piso CORCE, UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Director de tesis

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Asesor técnico

Q.F.B.T. Miguel Andrés Valdés Guevara

Sustentante

Erika Hernández Salvador

El presente proyecto está registrado ante la UMAE Hospital de Especialidades del
CMN SXXI, IMSS y tiene los siguientes financiamientos:
FIS/IMSS/PROT/G12/1110; FIS/IMSS/PROT/G15/1402 y
FIS/IMSS/PROT/MD16/1558

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE ESQUEMAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	V
I. JUSTIFICACIÓN.....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
III. HIPÓTESIS	1
IV. OBJETIVOS.....	2
IV.1 Objetivo general.....	2
IV.2 Objetivos particulares.....	2
V. ANTECEDENTES.....	2
V.1 Generalidades de la diabetes mellitus (DM)	3
V.2 Clasificación de la diabetes.....	4
V.3 Epidemiología de diabetes en el mundo	5
V.4 Diabetes mellitus en México	5
V.5 Signos, síntomas y complicaciones de la diabetes	6
V.6 Diagnóstico	6
V.7 Tratamiento.....	7
V.7.1 Biguanidas	9
V.7.2 Sulfonilureas	9
V.7.3 Tiazolidinedionas (glitazonas).....	10
V.7.4 Inhibidores de α -glucosidasas	10
V.7.5 Meglitinidas	11
V.8 Inhibidores de la enzima α -glucosidasas	11
V.9 Medicina tradicional	13
V.10 Generalidades de <i>Annona cherimola</i> Miller	14
V.11 Flavonoides.....	16
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	18
VI.1 Material	18



VI.2	Análisis cromatográfico.....	19
VI.3	Pruebas biológicas.....	20
VI.3.1	Animales	20
VI.3.2	Preparación de muestras y administración	20
VI.3.3	Inducción de DM2 en ratones hembra	20
VI.3.4	Determinación de niveles de glucemia.....	20
VI.4	Pruebas anti-hiperglucemiantes.....	21
VI.4.1	Modelo in vivo agudo	21
VI.4.2	Modelo in vivo subcrónico.....	21
VI.4.3	Prueba de tolerancia oral a la glucosa y sacarosa.....	21
VI.5	Análisis estadístico.....	21
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
VIII.	CONCLUSIONES	49
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	50



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
AcOEt	Acetato de etilo
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ccfp	Cromatografía en capa fina preparativa
CH ₃ COCH ₃	Acetona
CMN	Centro Médico Nacional
DCM	Diclorometano
D.E.	Desviación estándar
dL	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EAcHE	Extracto etanólico de <i>Annona cherioli</i> Miller
EtOH	Etanol
FAchAcOEt	Fracción de acetato de etilo de <i>Annona cherioli</i> Miller
FAchAc1	Fracción acuosa 1 de <i>Annona cherioli</i> Miller
FAchAc2	Fracción acuosa 2 de <i>Annona cherioli</i> Miller
FAchDCM	Fracción de diclorometano de <i>Annona cherioli</i> Miller
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
g	Gramos
h	Hora
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
H ₂ O	Agua
IDF	International Diabetes Federation
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IP	Intraperitoneal



kg	Kilogramos
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
MeOH	Metanol
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
TOG	Tolerancia oral a la glucosa
TOS	Tolerancia oral a la sacarosa
UV	Ultravioleta



ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de <i>Annona cherimola</i> Miller	19
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metformina	9
Figura 2. Glibenclamida.....	9
Figura 3. Rosiglitazona.....	10
Figura 4. Pioglitazona.....	10
Figura 5. Acarbosa	11
Figura 6. Repaglidina	11
Figura 7. Inhibición competitiva de las enzimas intestinales durante la hidrólisis de oligosacáridos por la acarbosa	13
Figura 8. Diagrama esquemático de los sustratos que se unen a los subsitos de las enzimas α -glucosidasas.....	13
Figura 9. Esqueleto de un flavonoide	17
Figura 10. Flavonoides de origen natural	18

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con extracto etanólico (EAChE) y fracciones (FAChAc2/FAChDCM) a las 0, 2 y 4 horas.....	24
Gráfica 2. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con el extracto etanólico (EAChE), fracción acuosa (FAChAc2) y fracción de diclorometano (FAChDCM) por 28 días.	26
Gráfica 3. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados	



inicialmente con glucosa (1.5 g/kg) y 30 min después con el extracto etanólico (EAchE, 300 mg/kg).....	27
Gráfica 4. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con sacarosa (3 g/kg) y 30 min después con el extracto etanólico (EAchE, 300 mg/kg).....	28
Gráfica 5. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con glucosa (1.5 g/kg) y 30 min después con la fracción acuosa (FAchAc2, 300 mg/kg)	29
Gráfica 6. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con sacarosa (3 g/kg) y 30 min después con la fracción acuosa (FAchAc2, 300 mg/kg)	30
Gráfica 7. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con glucosa (1.5 g/kg) y 30 min después con la fracción de diclorometano (FAchDCM, 300 mg/kg)	31
Gráfica 8. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con sacarosa (3 g/kg) y 30 min después con la fracción de diclorometano (FAchDCM, 300 mg/kg)	32
Gráfica 9. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con acarbosa, rutina y miricetina a las 0, 2 y 4 horas.....	37
Gráfica 10. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con acarbosa, rutina y miricetina por 28 días	38
Gráfica 11. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados 30 min después con rutina previa administración de glucosa	39
Gráfica 12. Comparación de los valores de glucemias en animales con	

diabetes experimental a las 0,2 y 4 horas, tratados 30 min después con rutina previa administración de sacarosa	41
Gráfica 13. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados 30 min después con miricetina previa administración de glucosa.....	42
Gráfica 14. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados 30 min después con miricetina previa administración de sacarosa.....	43
Gráfica 15. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina, acarbose y una combinación de ambas.....	45
Gráfica 16. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina, glibenclamida y una combinación de ambas.....	46
Gráfica 17. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina, metformina y una combinación de ambas.....	47

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Hojas y frutos de <i>Annona cherimola</i> Miller	15
Imagen 2. Hojas de <i>Annona cherimola</i> Miller	16

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con extracto etanólico (EAchE) y fracciones (FAchAc2/FAchDCM) a las 0, 2 y 4 horas.....	24
---	----

Tabla 2. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con extracto etanólico (EAchE) y fracciones (FAchAc2 /FAchDCM) a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.	26
Tabla 3. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con el EAchE en la prueba de TOG.....	28
Tabla 4. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con el EAchE en la prueba de TOS.....	29
Tabla 5. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la FAchAc2 en la prueba de TOG.....	30
Tabla 6. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la fracción acuosa (FAchAc2) en la prueba de TOS.	31
Tabla 7. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la fracción de diclorometano (FAchDCM) en la prueba de TOG.....	32
Tabla 8. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la fracción de diclorometano (FAchDCM) en la prueba de TOS.	33
Tabla 9. Rendimientos de compuestos aislados y purificados	34
Tabla 10. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con los compuestos purificados en modelo agudo.....	36
Tabla 11. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con acarbosa, rutina y miricetina a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.	38
Tabla 12. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina en la prueba de TOG.....	40
Tabla 13. Comparación de los valores de glucemias en animales con	

diabetes experimental tratados con rutina en la prueba de TOS.....	41
Tabla 14. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con miricetina en la prueba de TOG.....	42
Tabla 15. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con miricetina en la prueba de TOS.....	44
Tabla 16. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados con rutina, acarbosa y rutina-acarbosa	45
Tabla 17. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados con rutina, glibenclamida y rutina-glibenclamida.....	46
Tabla 18. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados con rutina, metformina y rutina-metformina.....	48

I. JUSTIFICACIÓN

Una manera eficaz de tratar la DM2 es mediante la supresión de la digestión de hidratos de carbono, y por lo tanto la reducción de la absorción de la glucosa, con inhibidores de las enzimas α -glucosidasa, debido a esto, la búsqueda de nuevas moléculas que presenten una actividad inhibitoria sobre este blanco molecular ha cobrado un gran interés.

En los últimos años, los proyectos emprendidos para descubrir inhibidores de las α -glucosidasas a partir de fuentes naturales han recibido una gran atención debido a que estos compuestos son abundantes en la naturaleza y a sus prometedoras actividades biológicas. Tomando este enfoque, el presente trabajo tiene el propósito de encontrar nuevos agentes inhibidores de las α -glucosidasas con utilidad para controlar la DM2 de la fracción acuosa obtenida de la partición del extracto etanólico de las hojas de *Annona cherimola* Miller.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que el extracto etanólico de las hojas de *Annona cherimola* Miller presentan actividad antidiabética y se ha identificado a la rutina como el compuesto que presenta la actividad anti-hiperglucemiante, sin embargo, aún no se han identificado los compuestos minoritarios presentes en la fracción acuosa, los cuales podrían tener una mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas que rutina.

III. HIPÓTESIS

La fracción acuosa de las hojas de *Annona cherimola* Miller, además de rutina, contiene otros compuestos con un efecto anti-hiperglucemiante.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Obtener otros compuestos adicionales a la rutina de la fracción acuosa de las hojas de *Annona cherimola* Miller y determinar su efecto anti-hiperglucemiante.

IV.2 Objetivos particulares

- » Aislar los compuestos presentes en la fracción acuosa obtenida de las hojas de *Annona cherimola* Miller mediante cromatografía en capa fina preparativa.
- » Identificar mediante cromatografía en capa fina analítica a los compuestos presentes en la fracción acuosa.
- » Determinar la actividad anti-hiperglucemiante de los compuestos aislados de la fracción acuosa en ratones con diabetes experimental de manera aguda y sub-crónica.

V. ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es un síndrome metabólico que afecta cada vez a más personas en todo el mundo, es una enfermedad que representa un problema de salud pública a nivel mundial. En México, desde el año 2000 es la primer causa de muerte entre las mujeres y la segunda entre los hombres (FMD, 2015).

Generalmente para el manejo terapéutico de la diabetes se utilizan medicamentos con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción, que tienen el propósito de normalizar los niveles de glucosa en sangre. Los tratamientos son administrados de por vida, lo que representa muchas veces un alto costo económico. Por otra parte, la aparición de efectos adversos o reacciones de hipersensibilidad, son situaciones que obligan a suspender el tratamiento o cambiarlo constantemente. Con estos señalamientos resulta importante el desarrollo de nuevos agentes con propiedades antidiabéticas, en donde las plantas son una excelente alternativa. Más de 400 especies vegetales para el control de la diabetes mellitus han sido registrados (García-Lujan, 2009), pero

solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia.

Se ha reportado que especies del género *Annona* presentan propiedades anti-hiperglucemiantes, como son: *Annona squamosa*, *A. muricata*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. diversifolia* y *A. cherimola* (Brindis *et al.*, 2013; Calzada *et al.*, 2017a), esto apoya la idea que estas especies sintetizan metabolitos secundarios similares que actúan como antidiabéticos.

En el caso de las hojas de *Annona cherimola* Miller, se ha descrito que presentan actividad anti-hipercolesterolemiantes, anti-hiperlipidémica, anti-protozoaria, anti-neoplásica, antidiabética, antidepresiva, antiartrítica, antibacteriana, antifúngica y para el tratamiento en enfermedades de la piel (Loizzo, *et al.* 2012; Quispe, *et al.* 2009; Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017a; 2017b).

El presente trabajo tiene el propósito de aislar e identificar compuestos adicionales a rutina presentes en las hojas de *Annona cherimola* Miller y posteriormente determinar su actividad anti-hiperglucemiante.

V.1 Generalidades de la diabetes mellitus (DM)

La diabetes es un desorden metabólico caracterizado por poliuria, polifagia, polidipsia y pérdida de peso sin razón aparente, también por glucosa alta en sangre y cetoacidosis episódica. Es un desorden metabólico en el cual la oxidación de carbohidratos no es posible debido a una alteración en la función de la insulina (Murray *et al.*, 2007). La hiperglucemia propia de la diabetes mellitus se produce por secreción insuficiente de insulina por las células β en los islotes pancreáticos, o por la incapacidad de la insulina secretada para estimular la captación celular de glucosa en sangre (Stuart, 2012). La principal función de la insulina es contrarrestar la acción concertada de varias hormonas generadoras de hiperglucemia y para mantener bajos los niveles de glucosa en sangre. Un paciente con diabetes no absorbe la glucosa adecuadamente, de modo que ésta queda circulando en la sangre (hiperglucemia) y dañando los tejidos con el paso del tiempo. Este deterioro causa complicaciones para la salud potencialmente letales (IDF, 2015).

V.2 Clasificación de la diabetes

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, tenemos cuatro tipos de diabetes, que son: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional y otros tipos específicos de diabetes.

- » Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): también denominada diabetes mellitus insulino-dependiente, representa entre el 5-10% de las personas con DM. Los síntomas de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) se producen por la destrucción progresiva de células β en los islotes de Langerhans por los linfocitos T, lo que conduce a una deficiencia absoluta de la insulina. Las personas con esta forma de diabetes necesitan una administración de insulina diaria con el fin de controlar sus niveles de glucosa en sangre. La eliminación de las células β secretorias de insulina causa hiperglucemia, y la aparición de glucosa en la orina (Tébar *et al.*, 2009).
- » Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): también denominada diabetes mellitus no insulino-dependiente, es el tipo más frecuente, del 90 a 95% de los pacientes con DM padecen este tipo de diabetes. La diabetes de tipo 2 (DM2) esta causada inicialmente por la disminución de sensibilidad de los tejidos efectores a las acciones metabólicas de la insulina. Esta menor sensibilidad a la insulina suele conocerse como resistencia a la insulina (Guyton *et al.*, 2006). La resistencia a la insulina disminuye la capacidad para estimular el músculo esquelético y el tejido adiposo para que extraigan glucosa de la sangre. Asimismo, la insulina tiene menor capacidad de inhibir la producción de más glucosa sanguínea por el hígado (Stuart, 2012).
- » Diabetes gestacional: es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, durante esta etapa el organismo sufre cambios hormonales muy intensos y en la diabetes gestacional estas hormonas producen el efecto inverso a la insulina, elevando los niveles de glucosa en sangre. La mayoría de las veces esta condición desaparece al finalizar el embarazo, pero existen casos en los que la diabetes permanece al no llevar los cuidados adecuados durante la gestación y se considera como diabetes tipo 2 (Stuart, 2012).

» Otros tipos específicos de diabetes:

- Defectos genéticos en la función de las células beta
 - Defectos genéticos en la acción de la insulina
 - Enfermedades del páncreas exocrino
 - Endocrinopatías
 - Diabetes inducida químicamente, o por drogas
 - Infecciones
 - Diabetes poco común mediada inmunitariamente
 - Otros síndromes genéticos, algunas veces asociados con diabetes
- (NOM, 2010)

V.3 Epidemiología de diabetes en el mundo

En el 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes; más del 80% de las muertes por diabetes fueron registradas en países de ingresos bajos y medios, con respecto a los de ingresos altos (OMS, 2016). La prevalencia mundial de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7% al 8,5% en la población adulta. Ello supone también un incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso o la obesidad. En 2014, el 9% de los adultos mayores de 18 años tenía diabetes.

En el 2015, de acuerdo con la Federación Mexicana de Diabetes (FMD), en el mundo 1 de cada 11 adultos vive con diabetes, 46.5% de los adultos con diabetes no sabe que la tiene; 1 de cada 7 nacimientos se ven afectados por diabetes gestacional y predice que para el 2040, 1 de cada 10 adultos (642 millones) padecerán de diabetes (FMD, 2015).

V.4 Diabetes mellitus en México

En el 2014 en México la DM ocupó el primer lugar en número de defunciones tanto en hombres como en mujeres. Las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales. Cabe señalar que según la Dirección General de Información en Salud en el 2007 hubo un número mayor de defunciones en el

grupo de las mujeres (37,202 muertes) comparado con el de los hombres (33,310) (OMS, 2014; DGIS, 2007).

En el 2011, las tasas de mortalidad más altas se ubicaron en la Ciudad de México (99.57 de cada 100 mil personas), Veracruz (84.35 de cada 100 mil) y Puebla (81.57 muertes), mientras en Quintana Roo, Chiapas y Baja California Sur presentaron las más bajas (35.19, 45.22 y 46.98 de cada 100 mil personas, respectivamente); la diferencia entre los estados con la tasa más alta y la más baja (Ciudad de México y Quintana Roo) es casi del triple (INEGI, 2013).

V.5 Signos, síntomas y complicaciones de la diabetes

Las personas pueden experimentar diferentes signos y síntomas de la diabetes, y en ocasiones puede que no haya signos. Algunos de los signos más comunes son:

- » Poliuria (micción frecuente)
- » Polidipsia (sed excesiva)
- » Polifagia (aumento del hambre)
- » Pérdida de peso
- » Cansancio
- » Falta de interés y concentración
- » Una sensación de hormigueo o entumecimiento en las manos o los pies
- » Visión borrosa
- » Infecciones frecuentes
- » Heridas de curación lenta
- » Vómitos y dolor de estómago

Las personas con diabetes corren un mayor riesgo de desarrollar una serie de complicaciones graves para la salud. Niveles permanentemente altos de glucemia pueden causar graves enfermedades, que afectarán al corazón, vasos sanguíneos, ojos, riñones y sistema nervioso (Rang *et al.*, 2008).

V.6 Diagnóstico

De acuerdo a la NOM 015, la prediabetes se diagnostica cuando la glucosa en el ayuno es igual o mayor a 100 mg/dL y menor o igual de 125 mg/dL y/o cuando la

glucosa dos horas post-carga oral de 75 g de glucosa anhidra es igual o mayor a 140 mg/dL y menor o igual de 199 mg/dL.

También se establece el diagnóstico de diabetes si se cumple cualquiera de los siguientes criterios: presencia de síntomas clásicos y de una glucemia plasmática casual > 200 mg/dL; glucemia plasmática en ayuno > 126 mg/dL; o bien glucemia >200 mg/dL a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua; sin olvidar que en la prueba de ayuno o en la prueba de tolerancia oral a la glucosa o en ausencia de síntomas inequívocos de hiperglucemia, estos criterios se deben confirmar repitiendo la prueba en un día diferente.

Para determinar el tipo de diabetes gestacional, se debe efectuar antes la prueba de tolerancia a la glucosa, en toda paciente embarazada entre las semanas 24 y 28 de gestación. Si una hora después de una carga de 50 g de glucosa por vía oral, se encuentra una glucemia plasmática >140 mg/dL, se efectuará la prueba diagnóstica. Se recomienda que los estudios iniciales se hagan entre la semana 24 y 28 semanas de embarazo (alrededor de los 6 meses), aunque las mujeres que presenten algún riesgo pueden ser estudiadas desde el inicio del embarazo. El estudio consiste en una muestra de glucosa en sangre (50 g de glucosa por vía oral) y si la sospecha es alta se hacen estudios más específicos, como la prueba de tolerancia a la glucosa en tres horas. En esta prueba, se toma una muestra de sangre en ayuno, después, la mujer toma una cantidad específica de glucosa disuelta en agua y se continúa tomando muestras de sangre cada hora hasta completar 3 horas. Se diagnostica diabetes si dos o más de los niveles de glucosa se encuentran por arriba de los siguientes valores: en ayuno 95 mg/dL, a 1 hora 180 mg/dL, a las 2 horas 155 mg/dL y a las 3 horas 140 mg/dL (NOM, 2010).

V.7 Tratamiento

El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por la enfermedad o por sus complicaciones.

El manejo inicial de pacientes con diabetes tipo 2 se realiza mediante medidas no farmacológicas (actividad física, alimentación, control de peso, promoción de la salud y educación para la salud), mismas que se deben mantener durante todo el curso del tratamiento. No obstante, existe evidencia de que los usos de medicamentos en etapas tempranas pueden disminuir la progresión hacia la diabetes. En el caso de diabetes tipo 1, la indicación para el uso de insulina es al momento del diagnóstico en conjunto con las medidas no farmacológicas (NOM, 2010)

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la DM2 van dirigidos a corregir una o más de las alteraciones metabólicas subyacentes; estos fármacos se dividen en tres principales grupos, dependiendo el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto hipoglucemiante (Israili, 2011):

- a. Fármacos que incrementan los niveles de insulina, también llamados secretagogos, que incluyen sulfonilureas como la glibenclamida y las meglitinidas como la repaglinida
- b. Fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina en los tejidos como biguanidas de la que solo se prescribe a la metformina y a las tiazolidinedionas o glitazonas como la pioglitazona
- c. Fármacos que reducen la tasa de absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal, el más usado es la acarbosa

Es muy común que los hipoglucemiantes orales se administren en combinación; esto con la finalidad de obtener un tratamiento más eficaz ya que al combinar dos o más fármacos con diferentes blancos de acción se logra un efecto sinérgico, por lo que, la terapia de la DM2 es polivalente.

A continuación, se resume los tipos de fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de la DM2, así como el mecanismo de acción y efectos adversos de cada uno de ellos (Rang *et al.*, 2008; Israili, 2011):

V.7.1 Biguanidas

Metformina. Reduce la glucosa posprandial y basal en plasma; actúa por tres mecanismos 1) Reduciendo la producción hepática de glucosa por inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis 2) Incrementando la sensibilidad a insulina y mejora la captación de glucosa periférica y su utilización en el músculo 3) Retardando la absorción intestinal de glucosa. Los efectos adversos más frecuentes de la metformina son trastornos digestivos dependientes de la dosis (anorexia, diarrea y náuseas), generalmente, aunque no siempre, transitorios.

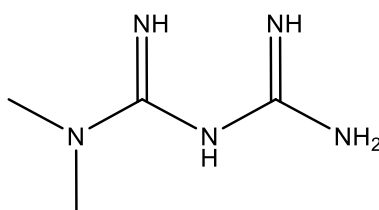


Figura 1. Metformina

V.7.2 Sulfonilureas

Glibenclamida. Estimula la secreción de insulina por las células β del páncreas. Reduce la producción hepática de glucosa y aumenta la capacidad de unión y de respuesta de la insulina en los tejidos periféricos. El efecto adverso más frecuente es la hipoglucemia, que puede ser intensa y prolongada.

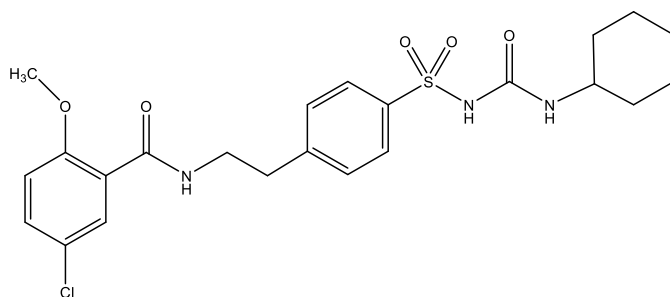


Figura 2. Glibenclamida

V.7.3 Tiazolidinedionas (glitazonas)

Rosiglitazona y pioglitazona. Reduce la glucemia disminuyendo la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, músculo esquelético y el hígado. Los efectos adversos más habituales son el aumento de peso y la retención de líquidos. Se han descrito también síntomas de causa desconocida, como cefaleas, astenia y trastornos digestivos.

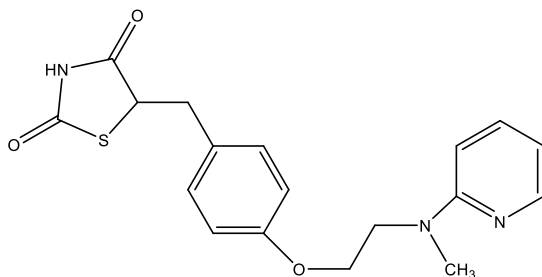


Figura 3. Rosiglitazona

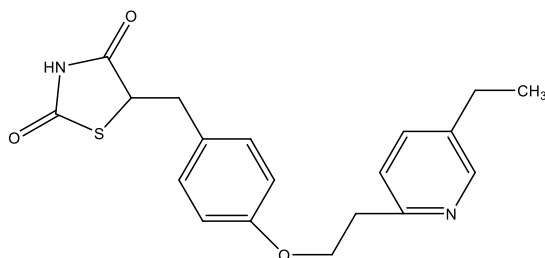


Figura 4. Pioglitazona

V.7.4 Inhibidores de las α -glucosidasas

Acarbosa. Pseudotetrasacárido de origen microbiano. Inhibe a las enzimas α -glucosidasas intestinales, retrasa la digestión de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. La glucosa derivada se libera y pasa a la circulación más lentamente, reduciéndose y retrasando el aumento posprandial de glucosa. Los efectos adversos más frecuentes tienen que ver con su efecto principal y consisten en flatulencias, deposiciones blandas o diarrea y dolor e hinchazón abdominal.

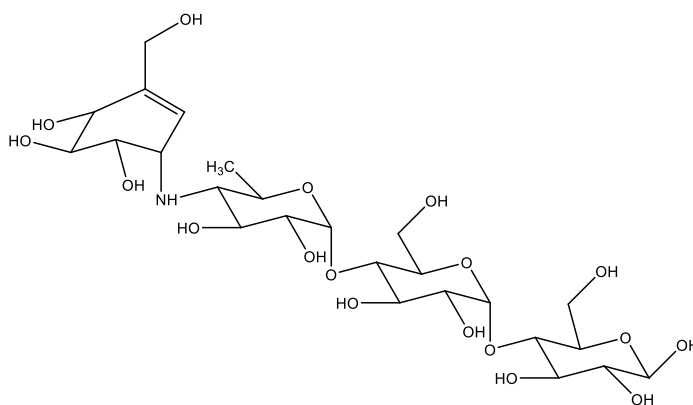


Figura 5. Acarbosa

V.7.5 Meglitinidas

Llamados también glinidas, pertenecen a un grupo de compuestos que interaccionan con una región del receptor SUR1. Son de corta acción y requieren de tres a cuatro dosis al día para alcanzar un efecto adecuado, en este grupo se encuentra la tolbutamida y repaglidina.

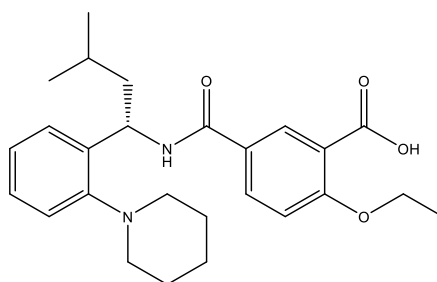


Figura 6. Repaglidina

V.8 INHIBIDORES DE LA ENZIMA α -GLUCOSIDASA

Las α -glucosidasas son enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos de oligosacáridos o glicoconjugados; la mayoría de las glucosidasas son específicas para ciertos tipos de enlace, su actividad depende del número, posición y configuración de los grupos involucrados en los enlaces glucosídicos (Borges de Melo *et al.*, 2006).

Los inhibidores de las α -glucosidasas son conocidos por prevenir la digestión de los hidratos de carbono y reducir el impacto de los carbohidratos de glucosa en la sangre. Las α -amilasas pancreáticas hidrolizan almidones complejos a oligosacáridos en el lumen del intestino delgado, mientras las α -glucosidasas intestinales unidas en membrana hidrolizan oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos en glucosa y otros monosacáridos en el borde cepillo del intestino delgado (Bischoff, 1994).

Los inhibidores de las α -glucosidasas retardan el proceso de digestión y absorción de carbohidratos bloqueando competitivamente la actividad de la glucosidasa (Figura 7). En consecuencia, la concentración máxima de glucosa en sangre posprandial se reduce y el nivel de azúcar en sangre se mantiene bajo. Los inhibidores de las α -glucosidasas pueden ofrecer varias ventajas y han sido recomendados para el tratamiento de la diabetes como la primera línea de tratamiento para reducir la hiperglucemia posprandial.

Actualmente, existen en el mercado tres fármacos inhibidores de las α -glucosidasas: acarbosa, miglitol y vogliobosa. La acarbosa es estructuralmente similar a los oligosacáridos naturales, pero tiene mayor afinidad a las enzimas α -glucosidasas. Esto significa que estos complejos enzimáticos son inhibidos competitivamente y que la disponibilidad de oligosacáridos se reduce. De este modo, la formación de monosacáridos disminuye y se requiere menos insulina para una metabolización posterior, lo que conduce a una reducción de los aumentos posprandiales inducidos por alimentos (Rosak *et al.*, 2012).

Debido a que los inhibidores de las α -glucosidasas bloquean la degradación de carbohidratos complejos, que permanecen en el intestino y colon, donde son digeridos por las bacterias entéricas, liberando gases, lo que causa sus efectos adversos gastrointestinales como flatulencias, diarrea y distensión abdominal (Israili, 2011). Como consecuencia, se han realizado grandes esfuerzos para buscar inhibidores de las α -glucosidasas eficaces, no tóxicos y de bajo costo a partir de recursos naturales que pueden prevenir el riesgo de diabetes tipo 2 y complicaciones relacionadas (Lebovitz, 2009).

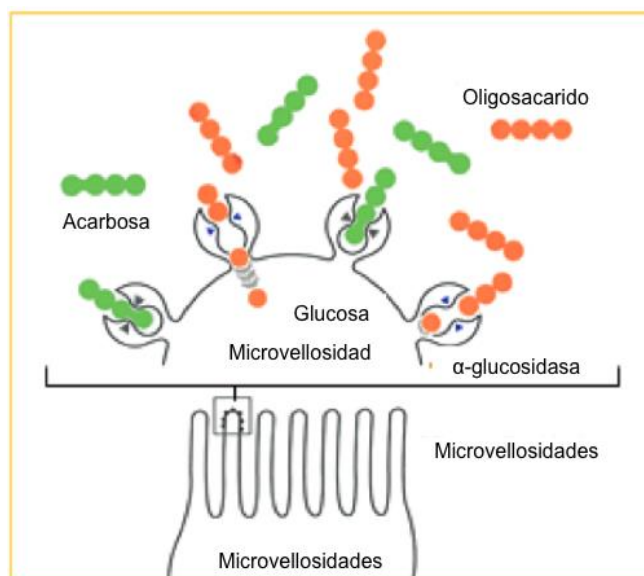


Figura 7. Inhibición competitiva de las enzimas intestinales durante la hidrólisis de oligosacáridos por la acarbosa

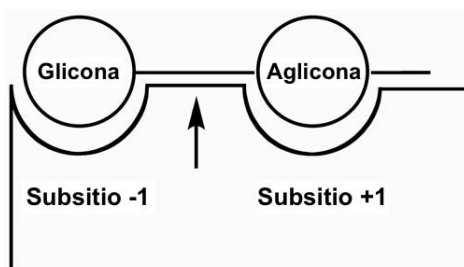


Figura 8. Diagrama esquemático de los sustratos que se unen a los subsitios de las enzimas α -glucosidasas. La hidrólisis es mostrada por una flecha, tiene lugar entre los subsitios -1 y +1.

V.9 Medicina tradicional

La medicina tradicional comprende diversas prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias que incorporan productos derivados de plantas, animales y/o fuentes minerales, técnicas manuales y ejercicios, aplicados en singular o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir ciertos padecimientos (OMS, 2016).

En México alrededor de 4 000 especies de plantas, equivalente al 15% de la flora total, están descritas que presentan atributos medicinales, es decir que más o

menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo solo en un 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda *et al.*, 2005)

En México, se han documentado al menos 306 especies pertenecientes a 235 géneros y 93 familias utilizadas como agentes antidiabéticos. Las familias más comúnmente mencionadas son: Asteraceae (47 especies), Fabaceae, (27 especies), Cactaceae (16 especies), Solanaceae, Euphorbiaceae (10 especies) y Laminaceae (9 especies) (Andrade-Cetto *et al.*, 2005).

V.10 Generalidades de *Annona cherimola* Miller

La familia Annonaceae incluye más de 120 géneros y 2000 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Estudios fitoquímicos de esta familia han demostrado la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, péptidos cíclicos y acetogeninas. Con respecto a las investigaciones farmacológicas se han reportado que los extractos de *A. cherimola* poseen actividad anti-genotóxica, anti-citotóxica, anti-hipercolesterolemia, anti-hiperlipidémica, antidepresiva, crioprotectora, anti-ansiolítica, anti-diabética, anti-protozoaria, anti-secretora, anti-artrítica, anti-bacteriana, anti-micótica, anti-inflamatoria y antioxidante (Ramírez, *et al.*, 2011; Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017a; 2017b).

En México popularmente se conoce como “chirimoya, anona, uruata, palo de corcho”. El nombre de chirimoya parece derivarse de ‘chirimuya’ que en Quechua significa ‘semilla fría’. Esto se refiere a la región andina donde está presente esta especie, que es relativamente fría comparada con las regiones donde están presentes el resto del género de *Annonas* (González-Vega, 2013).



Imagen 1. Hojas y frutos de *Annona cherimola* Miller

El fruto normalmente tiene forma de corazón (Imagen 1) y las hojas son simples, enteras, de disposición alterna y de forma ovada u ovada-lanceolada, son ligeramente peludas en la superficie superior y aterciopeladas en la superficie inferior (Imagen 2).

La clasificación taxonómica de la *Annona cherimola* Miller es la siguiente (Castro, 2007):

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Subfamilia: Annonoideae

Género: *Annona*

Especie: *cherimola*



Imagen 2. Hojas de *Annona cherimola* Miller

En México se le encuentra en Morelos, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Chiapas, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz, Campeche, Estado de México y Ciudad de México.

La *Annona cherimola* Miller se caracteriza por la presencia de alcaloides de tipo isoquinolina, los cuales se han detectado en hojas, semillas y corteza del tallo en las que coinciden la anonaína y la liridenina. Además, a partir de la corteza del tallo se han aislado la anolobina, asimilobina y su n-metil-derivado, coridina, coripalmina, discretamina, glaziovina, laniginosina, lisicamina, nuciferina, tetrahydro-palmitina, nor-ushinsunina, xilopina, iso-boldina, reticulina y estefilidina, estos tres últimos compuestos también están presentes en las hojas. En este último órgano se han identificado también los alcaloides corituberina y nor-nanteína; y los flavonoides quercetina, isoquercitrina y rutina. En la semilla se han identificado otros alcaloides no-isoquinolínicos, cafeína y celeistofolina, y el esteroide daucosterol (BDMTM, 2009; Jyothi *et al.*, 2011; Solares, 2015)

V.11 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que están ampliamente distribuidos en plantas con propiedades como agentes anticancerosos, antivirales, antioxidantes, antibacterianos y anti-inflamatorios, entre otros. Estudios recientes han

determinado que los flavonoides pueden ser muy eficaces para inhibir la actividad de las α -glucosidasas (Zhang *et al.*, 2009)

Los flavonoides son agentes antidiabéticos potenciales porque ejercen múltiples acciones hipoglucémicas (acción insulinomimética) y antihiperoglucémicas (secretagogos de insulina) (Cazarolli *et al.*, 2008a). El efecto inhibitorio de algunos flavonoides sobre la actividad α -glucosidasas ha sido establecida (Hong *et al.*, 2013; Escandón-Rivera *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2013). También se ha reportado que los extractos enriquecidos con flavonoides de algunas plantas mexicanas inhiben eficientemente la actividad de las α -glucosidasas y reducen significativamente los niveles de glucosa en el suero de ratas diabéticas (Andrade-Cetto *et al.*, 2008).

La estructura primaria de los flavonoides consiste en: un anillo de benzopireno (anillos A y C) y un grupo fenilo (anillo B) como puede observarse en la Figura 9. El patrón de sustitución en el anillo C y los enlaces entre el benzopirano y el grupo fenol son las bases para la clasificación de los flavonoides en seis grupos: antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas. En la Figura 10 se muestran algunos flavonoides de origen natural.

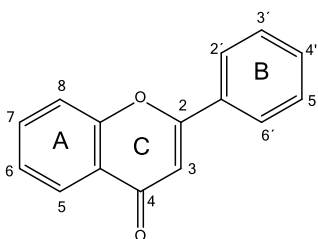


Figura 9. Esqueleto de un flavonoide

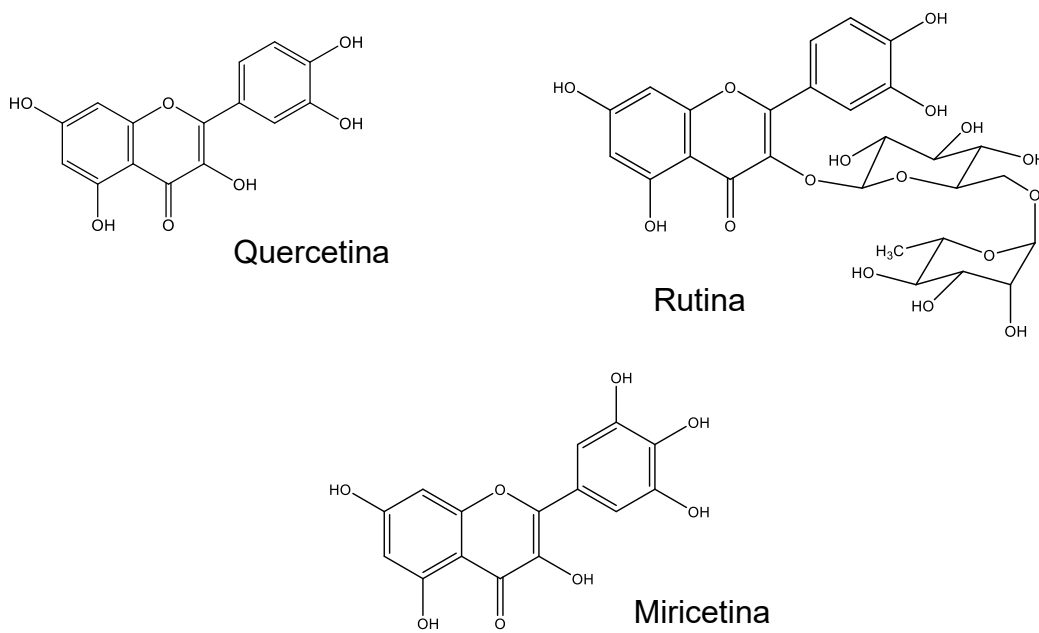
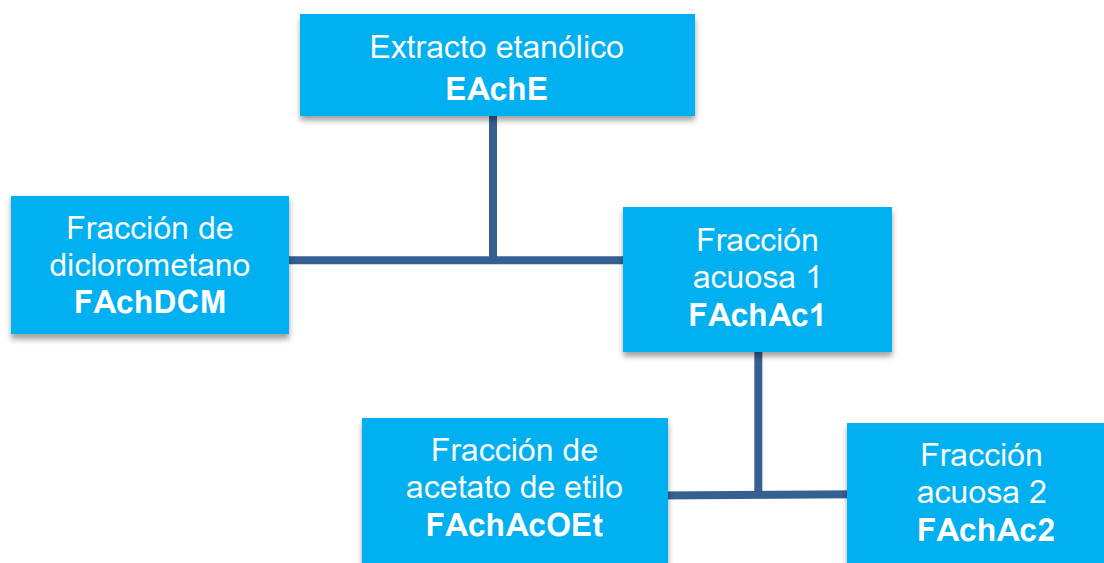


Figura 10. Flavonoides de origen natural

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Material

La fracción acuosa fue proporcionada por el Dr. Calzada, esta fue previamente obtenida en la investigación de maestría del Q.F.B. Jesús Iván Solares Pascasio. El procedimiento que se siguió para obtener el extracto etanólico y su fraccionamiento: las hojas de la planta se dejaron secar a temperatura ambiente por siete días y se pulverizaron; posteriormente se extrajeron por maceración en etanol. El extracto orgánico resultante se filtró y se concentró a sequedad utilizando rota evaporadora a presión reducida. Para el fraccionamiento, 50g del extracto etanólico seco se resuspendieron en 100 mL EtOH acuoso al 10% y se fraccionó por la técnica de par de disolventes no miscibles utilizando diclorometano y acetato de etilo (Esquema 1).



Esquema 1. Fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de *Annona cherimola* Miller (Solares, 2015).

VI.2 Análisis cromatográfico

Purificación. La fracción acuosa se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (ccfp), utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil un sistema ternario de disolventes AcOEt: MeOH: H₂O (10:1.6:1.3). Las cromatoplasmas utilizadas fueron placas de vidrio (sílica gel 60 G F₂₅₄ Merck, con un tamaño de 20x20). Se utilizó para visualizar una lámpara de luz UV con longitud de onda larga (320nm) y onda corta (254nm), se marcó y se raspó la cromatoplasma. El raspado se mantuvo en suspensión CH₃COCH₃: MeOH (50:50), se filtró y se concentró a sequedad utilizando rota evaporadora a presión reducida.

Identificación. Se realizó la técnica de elución en capa fina analítica para identificar a los compuestos aislados utilizando referencias disponibles en el laboratorio (Sigma-Aldrich Chemical Company). Se ocuparon cromatofolios de aluminio (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) como fase estacionaria y como fase móvil el sistema ternario de AcOEt: MeOH:H₂O (10:1.6:1.3). Se eluyó y se visualizó con una lámpara de luz UV con longitud de onda larga (320nm) y onda corta (254nm).

VI.3 Pruebas biológicas

VI.3.1 Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c con un peso de 18-20 g del CMN SXXI IMSS, se mantuvieron en condiciones óptimas de luz/obscuridad en ciclos de 12/12h, temperatura controlada y con libre acceso al agua y alimento. El cuidado y la manipulación de los animales se realizó de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999. Los ratones sanos y diabéticos se dejaron con acceso *ad libitum* al agua y alimento el tiempo en que se usaron para las pruebas y fueron alojados en jaulas, en grupos de seis animales.

VI.3.2 Preparación de muestras y administración

Las muestras fueron disueltas en un volumen de 0.5 mL de una solución de agua destilada al 2% con tween 20 y se administraron por vía intragástrica.

La dosis utilizada para las fracciones y el extracto fue de 300 mg/kg. La dosis utilizada de metformina (Pisa), acarbosa (Bayer) y glibenclamida (Brucen) fue de 850 mg/kg, 50 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente.

VI.3.3 Inducción de DM2 experimental en ratones hembra

La diabetes experimental fue inducida por administración vía intraperitoneal de aloxana (2x75 mg/kg) (aloxana monohidrato, Sigma-Aldrich) previo ayuno de 24 h. La aloxana fue disuelta en agua inyectable que se administra en un volumen de 0.5 mL por animal. Siete días después de la segunda administración se miden los niveles de glucosa en sangre y los animales con valores de glucemia dentro del intervalo de 190-220 mg/dL fueron considerados como diabéticos y seleccionados para las pruebas posteriores. Los animales diabéticos se mantuvieron con solución glucosada al 10% durante su uso.

VI.3.4 Determinación de niveles de glucemia

Se obtienen muestras de sangre de la vena caudal. Se determinó la glucemia por el método de la glucosa oxidasa, utilizando tiras reactivas (Evolution, Infopia). Los

resultados obtenidos se expresan en miligramos de glucosa por decilitro de sangre (mg/dL)

VI.4 Pruebas anti-hiperglucemiantes

VI.4.1 Modelo agudo

Grupos de 6 animales fueron administrados con diferentes tratamientos: extracto etanólico (EAchE, 300 mg/kg), fracción acuosa (FAchAc2, 300 mg/kg), fracción de diclorometano (FAchDCM 300 mg/kg), metformina (850 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), glibenclamida (5 mg/kg) y compuestos puros (50 mg/kg). Se midió la concentración de glucosa en sangre a los tiempos 0, 2 y 4 horas.

VI.4.2 Modelo subcrónico

Grupos de 6 animales fueron administrados con diferentes tratamientos: extracto etanólico (EAchE, 300 mg/kg), fracción acuosa (FAchAc2, 300 mg/kg), fracción de diclorometano (FAchDCM, 300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), rutina (50 mg/kg) y miricetina (50 mg/kg). Se midió la concentración de glucosa cada semana y el tratamiento se administró 6 de 7 días de la semana, por cuatro semanas.

VI.4.3 Prueba de tolerancia oral a la glucosa y sacarosa

Al inicio de cada ensayo se tomó la glucemia, la cual fue considerada tiempo 0 y se administró glucosa (1.5 g/kg) o sacarosa (3 g/kg). A los treinta minutos después se administraron los flavonoides / fracciones / extracto y se tomaron las glucemias a las 2 y 4 horas. En caso de los controles de sacarosa y glucosa, a los 30 minutos después se administró únicamente 0.5 mL de agua.

VI.5 Análisis estadístico

Los niveles de glucosa en sangre se expresaron como la media \pm DE para los seis animales que conforman cada grupo. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunnett utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software,

Inc., EE.UU.). Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el estudio fitoquímico y la evaluación biológica de la fracción acuosa de las hojas de *Annona cherimola* Miller.

Los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides, están recibiendo creciente atención debido a sus actividades biológicas y se ha reportado que este tipo de compuestos juegan un papel importante en la modulación de las actividades α -glucosidasa y α -amilasa (Yin *et al.*, 2014), por lo tanto, pueden contribuir al manejo de la diabetes mellitus tipo 2.

La presentación de los resultados, así como la discusión de los mismos se presenta en tres partes:

1. En la primera parte, se describe la evaluación del efecto del extracto etanólico (EAchE), fracción acuosa (FAchAc2) y fracción de diclorometano (FAchDCM) en los modelos agudo y sub-crónico con el propósito de validar el efecto anti-hiperglucemiante, previamente demostrado (Solares, 2015). En este mismo sentido se llevó a cabo pruebas de tolerancia oral a la glucosa y sacarosa para confirmar el efecto inhibidor sobre las enzimas α -glucosidasas. En esta investigación se uso raton, con la finalidad de cubrir uno de los requisitos necesarios en los ensayos pre-clínicos.
2. En la segunda parte, se detalla la purificación e identificación de los compuestos presentes en la fracción acuosa (FAchAc2) mediante cromatografía en capa fina preparativa. Posteriormente, se evaluó el efecto en los niveles de glucemia de los compuestos aislados en los modelos agudo y sub-crónico en ratones con diabetes experimental. También se realizan las pruebas TOG y TOS de los compuestos más activos para conocer si inhiben la absorción de glucosa y retardan la hidrólisis de la sacarosa.

3. En la tercera se resume la evaluación del efecto anti-hiperglucemiante de manera aguda y subcrónica de la rutina en combinación con tres fármacos utilizados para el control de la DM2, considerando que en las prácticas tradicionales de México las personas combinan el tratamiento alopático con plantas medicinales.

Para esta investigación se consideró que presentaban un efecto anti-hiperglucemiante aquellas muestras que al evaluarse disminuyen los niveles de glucemia de animales diabéticos (≥ 190 mg/dL de glucosa) a valores de glucemia de animales sanos (143-156 mg/dL de glucosa). Los productos hipoglucemiantes son aquellos que inducen valores de glucemia menores al grupo de animales sanos (143-156 mg/dL de glucosa) al ser administrados vía oral (Adeyemi *et al.*, 2009).

A continuación se muestran los resultados y la discusión de esta primera parte.

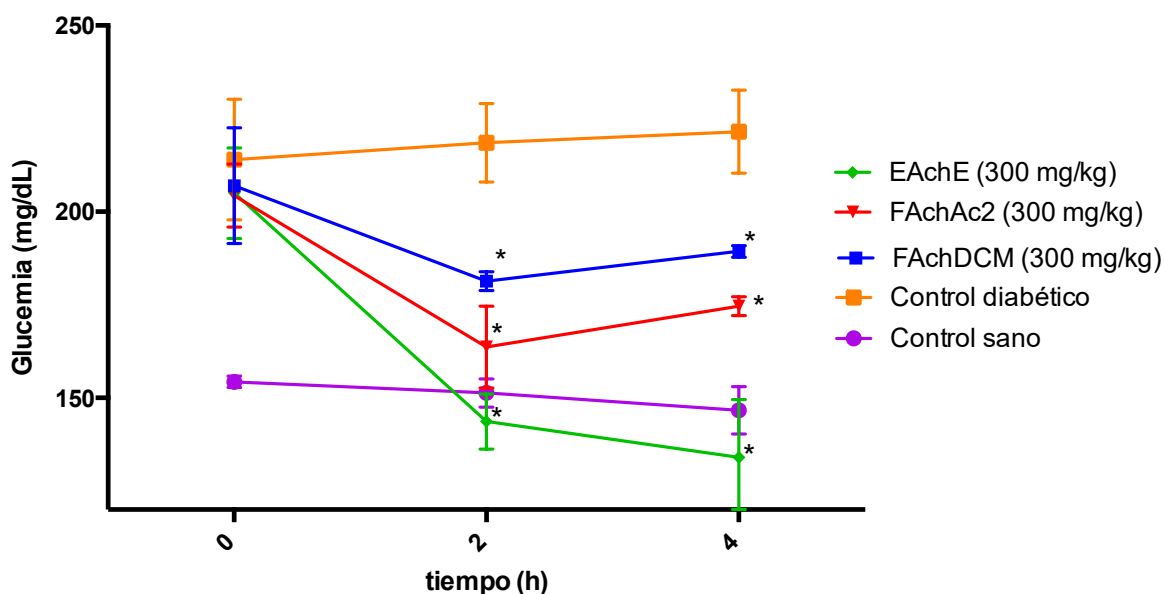
En la Gráfica 1 y Tabla 1 se muestran los resultados de la prueba aguda en animales con diabetes experimental tratados con el EAChE, FAChAc2 y FAChDCM. Las glucemias obtenidas son comparadas con las glucemias del control diabético.

Se observa que el EAChE muestra un efecto anti-hiperglucemiante a partir de las dos horas y mantiene los niveles de glucemia a niveles del grupo control sano en ratones; este efecto anti-hiperglucemiante del extracto concuerda con lo observado cuando fue evaluado previamente en ratas (Solares, 2015).

Una vez demostrado el efecto del extracto, se fraccionó y se obtuvieron tres fracciones: fracción acuosa, fracción de diclorometano y fracción de acetato de etilo. Las fracciones acuosas y la fracción de diclorometano fueron evaluadas en el mismo modelo, observándose que presentan efecto anti-hiperglucemiante, sin embargo, este efecto no llega a niveles de valores de glucemia del grupo control sano. De estas dos fracciones, como se observa en la Gráfica 1 y los valores de la Tabla 1, la fracción que muestra un mejor efecto anti-hiperglucemiante es la FAChAc2, confirmando que esta fracción contiene a los compuestos responsable de la actividad evaluada con el extracto etanólico (Solares, 2015).

El orden de actividad biológica fue el siguiente: EAChE > FAChAc2 > FAChDCM. Lo anterior válida el uso de la planta *Annona cherimola* en la medicina tradicional

mexicana para el control de la diabetes mellitus 2 (Andrade-Cetto *et al.*, 2005; Brindis *et al.*, 2013; Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017a)



Gráfica 1. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con extracto etanólico (EAcE) y fracciones (FAcAc2/FAcDCM) a las 0, 2 y 4 horas; * $p < 0.05$.

Tabla 1. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con extracto etanólico (EAcE) y fracciones (FAcAc2/FAcDCM) a las 0, 2 y 4 horas.

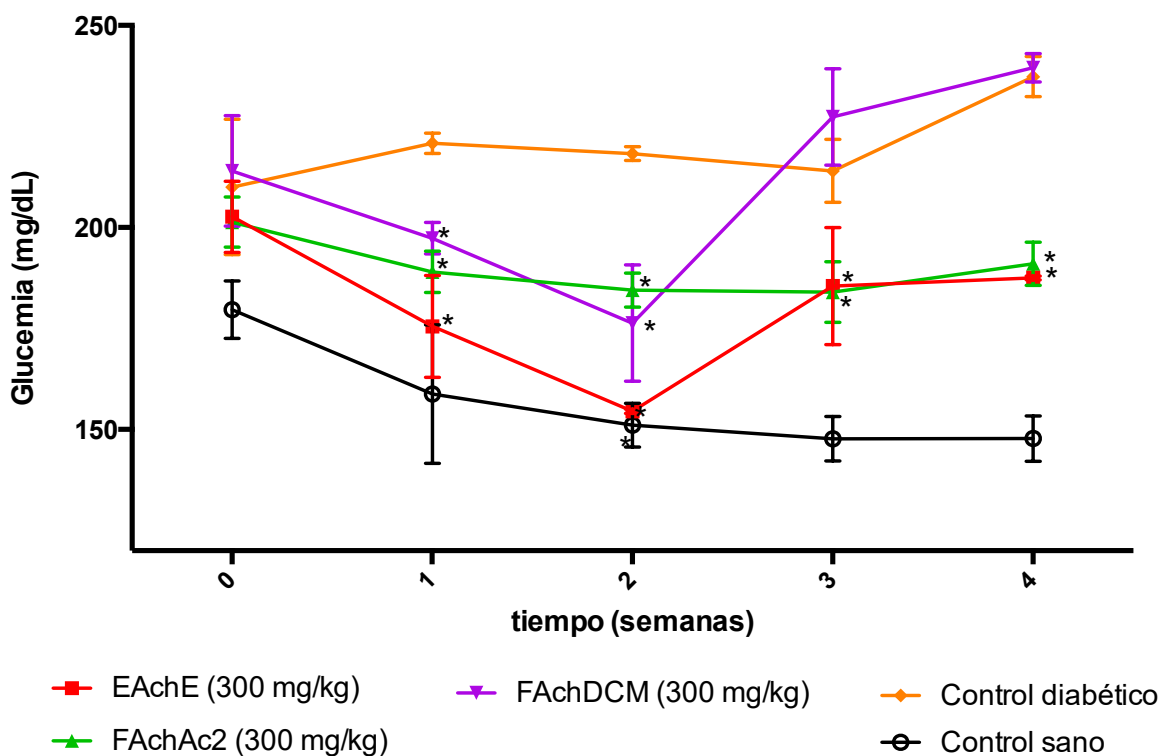
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
EAcE (300 mg/kg)	205±9.9	143.7±6*	134±12.7*
FAcAc2 (300 mg/kg)	204.3±7	163.7±8.9*	174.7±2*
FAcDCM (300 mg/kg)	207±12.7	181.3±2*	189.3±1.2*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2
Control diabético	214±14	218.5±9.1	221.5±9.6

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

Una vez demostrado el efecto agudo se realizó una prueba sub-crónica, los resultados se muestran en la Gráfica 2 y Tabla 2. Los animales con diabetes experimental fueron tratados con EAChE, FAChAc2 y FAChDCM, las glucemias obtenidas fueron comparadas con las glucemias del control diabético. En los resultados mostrados, se observa que el EAChE a los dos primeras semanas de tratamiento muestran un efecto anti-hiperglucemiante que llega a niveles comparables con los niveles de glucosa de los animales sanos, sin embargo, a partir de la tercer semana se presenta un fenómeno de disminución del efecto permaneciendo constante hasta el final del experimento. Este fenómeno de adaptación presentado por el extracto etanólico es muy parecido al que se describe para la acarbosa (Krentz *et al.*, 2005; Calzada *et al.*, 2017a).

La FAChDCM presenta efecto anti-hiperglucemiante a las dos primeras semanas, cabe hacer mención que nunca llegó a los valores de glucemias de animales sanos; a partir de la segunda semana empieza a perder su efecto, de tal forma que a la tercera semana ya no produce el efecto anti-hiperglucemiante y se pierde hasta el final del experimento. En el caso de la FAChAc2 el efecto anti-hiperglucemiante se mantiene, sin embargo, a la dosis probada no llega a los valores de glucemia del grupo control de animales sanos.

Esta evaluación subcrónica se realiza porque la mayoría de los fármacos ocupados para el tratamiento de la diabetes, no mantienen bajo control los niveles de glucemia a largo plazo y como consecuencia se altera el curso de las complicaciones diabéticas (Li *et al.*, 2012). Con los resultados de esta prueba se determina que la fracción acuosa y el extracto etanólico mantienen su actividad anti-hiperglucemiante a largo plazo sin presentar pérdida de esta actividad.



Gráfica 2. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con el extracto etanólico (EAcE), fracción acuosa (FAchAc2) y fracción de diclorometano (FAchDCM) por 28 días; * $p < 0.05$.

Tabla 2. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con extracto etanólico (EAcE) y fracciones (FAchAc2 /FAchDCM) a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.

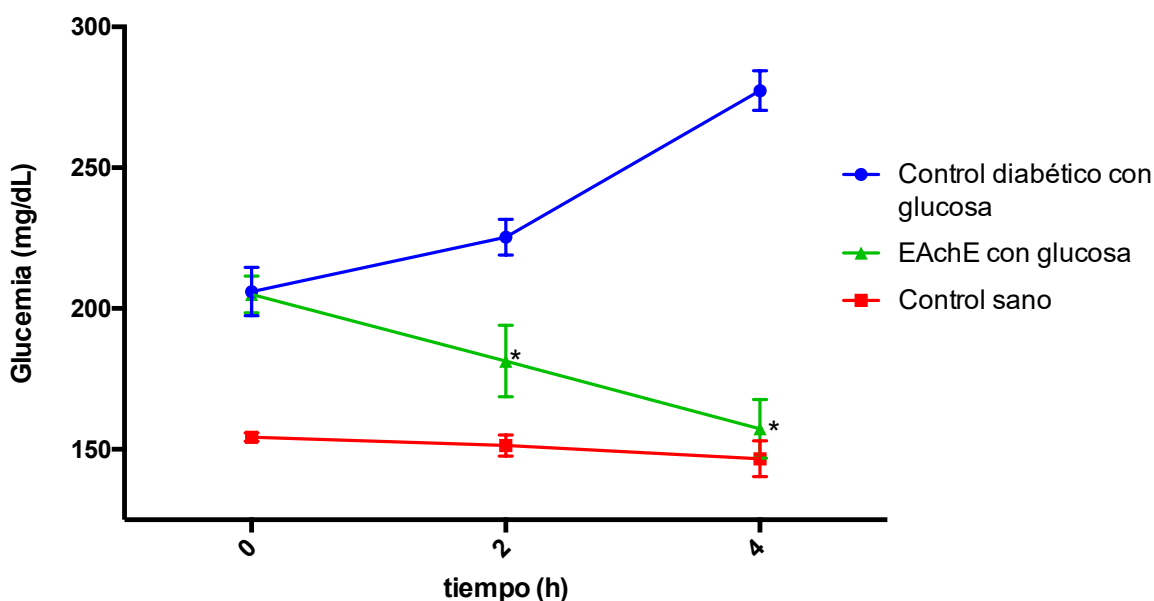
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
EAcE (300 mg/kg)	202.6±7.6	175.5±10.9*	154.5±0.4*	185.5±11.8*	187.5±0.4*
FAchAc2(300 mg/kg)	201.3±5.4*	189±4.4*	184.5±3.6*	184±6.4*	191±4.6*
FAchDCM (300 mg/kg)	214±11.8	197.3±3.3*	176.3±12.5*	227.3±10.3	239.5±2.9
Control sano	179.7±5.5	158.7±13.3	151±4.2	147.7±4.3	147.7±4.3
Control diabético	210±14.5	220.8±2.2	218.2±1.5	214±6.7	237.3±4.3

Promedio ± D.E; n=6, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

A continuación, se muestran en las Gráficas 3-8 y en las Tablas 3-8 los resultados y discusión de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (TOG) y sacarosa (TOS) en animales con diabetes experimental tratados con el extracto etanólico (EAcE)

y fracciones (FAchAc2/FAchDCM), con el propósito de validar que inhiben a la enzima α -glucosidasa. Los niveles de glucemia son comparados con las glucemias del control diabético administrado solo con glucosa o sacarosa.

En la Tabla y Gráfica 3 se muestran los resultados de la prueba de TOG en animales diabéticos, administrados con el EAchE. En los resultados mostrados se observa que, al administrar una carga de glucosa en animales diabéticos, los niveles de glucemia se elevan evidenciando un pico posprandial desde las 2 horas con un máximo a las 4 horas. Los resultados obtenidos cuando el EAchE es administrado en combinación con glucosa, muestran que el EAchE disminuye el pico posprandial a partir de las 2 horas, llegando a valores de glucemia comparables con los valores del grupo control sano a las 4 horas.



experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con glucosa (1.5 g/kg) y 30 min después con el extracto etanólico (EAchE, 300 mg/kg); * $p < 0.05$.

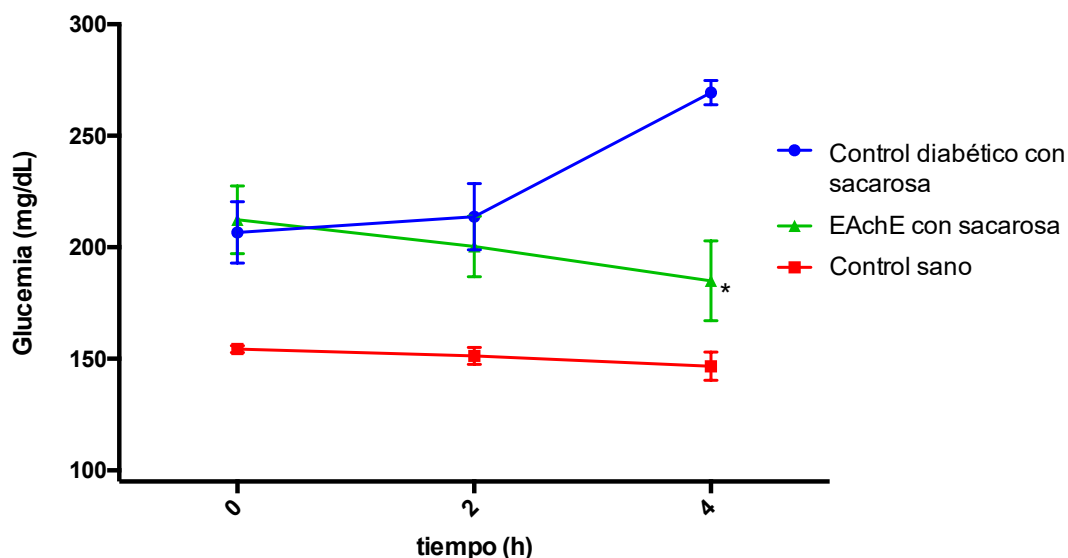
Tabla 3. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con el EAChE en la prueba de TOG.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con glucosa	206±7.4	225.3±5.5	277.3±6
EAChE con glucosa	205±5.6	181.3±10.9*	157.3±8.9*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

En la Tabla y Gráfica 4 se muestran los resultados de la prueba de TOS en animales diabéticos, administrados con el EAChE.

Al administrar una carga de sacarosa a animales diabéticos, los niveles de glucemia se elevan mostrando un pico posprandial a partir de las 2 horas, con un máximo a las 4 horas. Cuando el extracto etanólico es administrado en combinación con la sacarosa, se observa que inhibe el pico posprandial a las 4 horas. Estos resultados establecen como posible modo de acción que el preparado inhibe la hidrólisis de la sacarosa, indicándonos que actúa sobre las enzimas α -glucosidasas (Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017a).



Gráfica 4. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con sacarosa (3 g/kg) y 30 min después con el extracto etanólico (EAChE, 300 mg/kg); *p<0.05.

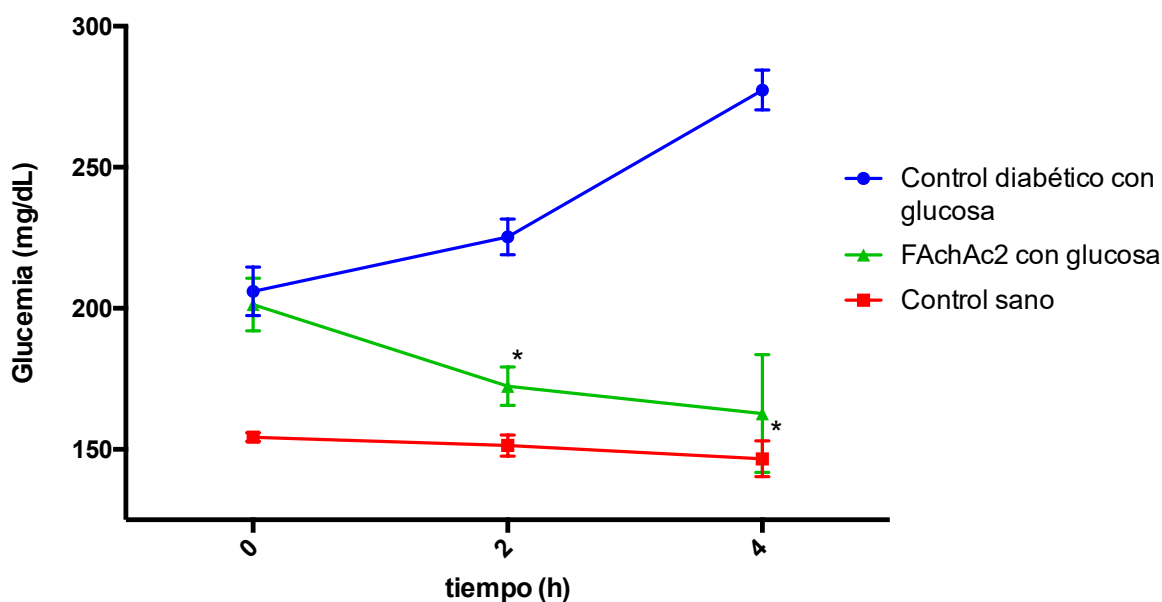
Tabla 4. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con el EAChE en la prueba de TOS.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con sacarosa	206.7±11.9	213.7±12.8	269.3±4.7
EAChE con sacarosa	212.3±13.1	200.3±11.7	185±15.5*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

En la Tabla y Gráfica 5 se muestran los resultados de la prueba de TOG en animales diabéticos, administrados con la FAChAc2.

Cuando la FAChAc2 es administrada en combinación con glucosa, se observa que inhibe el pico posprandial a partir de las 2 horas, llegando a valores de glucemia comparables con los niveles de glucemia producidos por el grupo control sano a las 4 horas.



Gráfica 5. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con glucosa (1.5 g/kg) y 30 min después con la fracción acuosa (FAChAc2, 300 mg/kg); *p<0.05.

Tabla 5. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la FACHAc2 en la prueba de TOG.

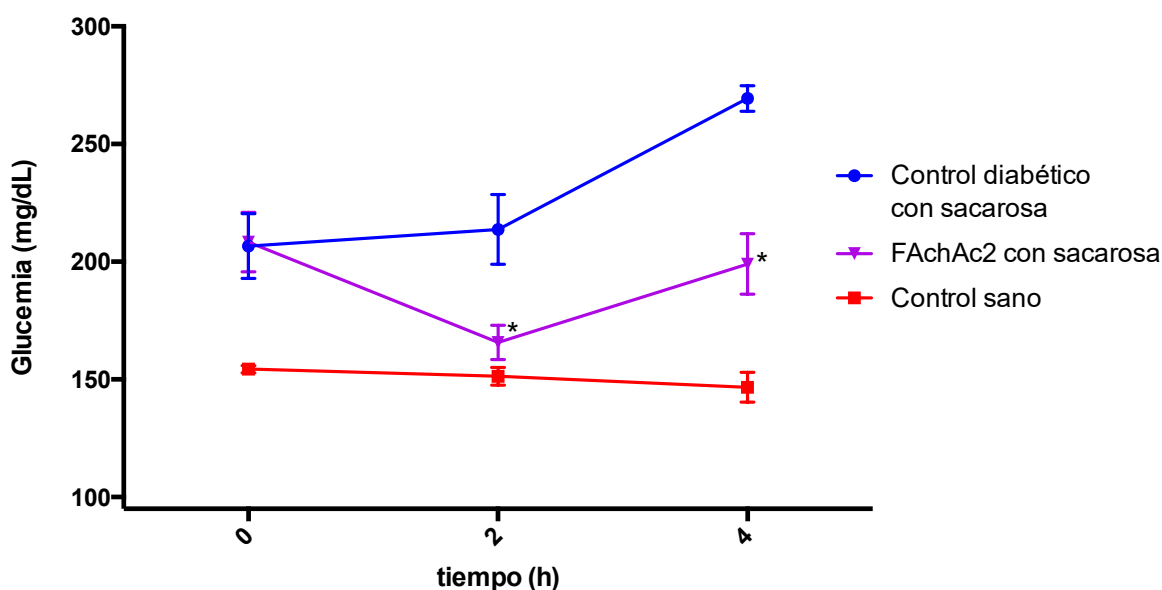
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con glucosa	206±7.4	225.3±5.5	277.3±6
FACHAc2 con glucosa	201.3±8	172.3±5.9*	162.7±18*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

En la Tabla y Gráfica 6 se muestran los resultados de la prueba TOS en animales diabéticos tratados con la FACHAc2.

Cuando la FACHAc2 es administrada en conjunto con la sacarosa, inhibe el pico posprandial a partir de las 2 horas. Sin embargo, al tiempo de 4 horas, el efecto anti-hiperglucemiante producido por esta fracción se pierde ligeramente.

Estos resultados validan el efecto inhibitor de la FACHAc2 y permite determinar que posible blanco de acción es sobre las enzimas α -glucosidasas, ya que retarda la hidrólisis de la sacarosa a glucosa y, por consiguiente, retarda su absorción (Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017a).



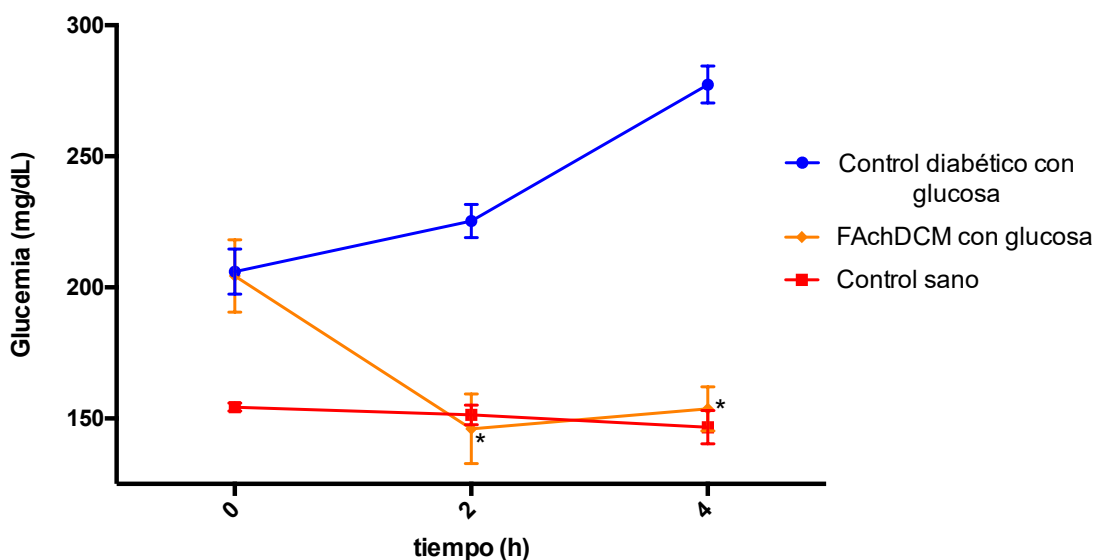
Gráfica 6. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con sacarosa (3 g/kg) y 30 min después con la fracción acuosa (FACHAc2, 300 mg/kg); *p<0.05.

Tabla 6. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la fracción acuosa (FAchAc1) en la prueba de TOS.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con sacarosa	206.7±11.9	213.7±12.8	269.3±4.7
FAchAc2 con sacarosa	208.3±10.9	165.7±6.3*	186±11.1*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

En la Tabla y Gráfica 7 se muestran los resultados de la prueba TOG en animales diabéticos, tratados con FAchDCM. Al administrar la FAchDCM en conjunto con glucosa, los niveles de glucemia que se obtienen son comparables con los niveles del control sano desde las 2 hasta las 4 horas.



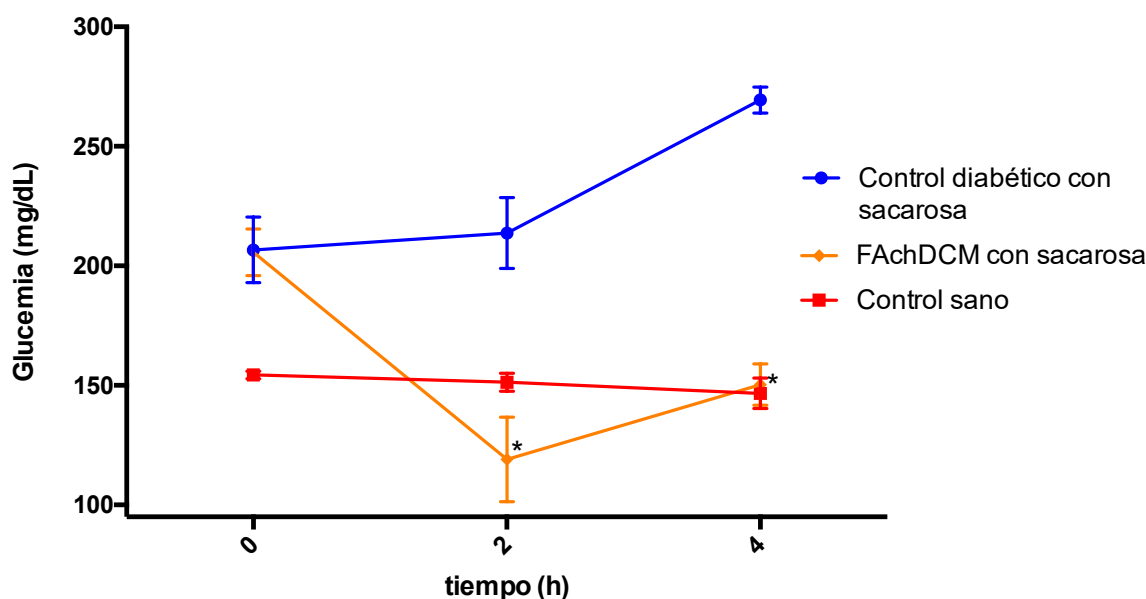
Gráfica 7. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con glucosa (1.5 g/kg) y 30 min después con la fracción de diclorometano (FAchDCM, 300 mg/kg); *p<0.05.

Tabla 7. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la fracción de diclorometano (FACHDCM) en la prueba de TOG.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con glucosa	206±7.4	225.3±5.5	277.3±6
FACHDCM con glucosa	204.3±11.9	130.3±11.5*	153.7±7.2*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

En la Tabla y Gráfica 8 se muestran los resultados de la prueba TOS en animales con diabetes experimental tratados con la FACHDCM. Al administrar la FACHDCM en conjunto con la sacarosa, produce que los niveles de glucemia del pico posprandial disminuyan, generando hipoglucemia a las 2 h y regresando a niveles de glucosa comparables con los niveles del grupo control sano a las 4 h. El efecto inhibitorio en la hidrólisis de sacarosa y el retardo en la absorción de glucosa, nos indica que el probable mecanismo de la fracción es mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas.



Gráfica 8. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas; administrados inicialmente con sacarosa (3 g/kg) y 30 min después con la fracción de diclorometano (FACHDCM, 300 mg/kg); *p<0.05.

Tabla 8. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con la fracción de diclorometano (FACHDCM) en la prueba de TOS.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con glucosa	206±7.4	225.3±5.5	277.3±6
FACHDCM con sacarosa	205.7±8.4	119±15.3*	150.3±7.5*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

Los resultados obtenidos en la prueba de TOS en el extracto y las fracciones, nos indica la presencia de compuestos en las hojas de *A. cherimola* Miller que afecta la captación o utilización de la glucosa y/o sobre la secreción de insulina (Bilous *et al.*, 2010). Los resultados de la prueba TOS, nos permite evaluar si la acción antihiper glucémica del compuesto actúa mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas (Escandón-Rivera *et al.*, 2012).

A continuación se muestran los resultados y discusión de resultados de la segunda parte.

Una vez confirmado el efecto anti-hiperglucemiante de la fracción acuosa, se procedió a purificar mediante cromatografía fina preparativa a los compuestos mayoritarios presentes.

Los compuestos purificados e identificados en la fracción acuosa (425 mg) fueron siete flavonoides (rutina, narcisina, hiperina, nicotiflorina, isoquercitrina, astragalina y miricetina) y un ácido fenólico (ácido clorogénico). En la Tabla 9 se muestran los rendimientos obtenidos de cada uno de ellos.

Tabla 9. Rendimientos de compuestos aislados y purificados

Compuesto	Rendimiento
Narcisina	37.29 mg
Hiperina	36.61 mg
Nicotinflorina	34.14 mg
Astragalina	12.73 mg
Ácido clorogénico	3.41 mg
Isoquercitrina	20.1 mg
Rutina	73.54 mg
Miricetina	14.83 mg

Lo anterior sugiere que los flavonoides son parte de los constituyentes activos de las hojas. De los compuestos aislados, se obtuvo en mayor proporción la rutina, lo anterior es respaldado con la literatura, donde nos indica que la rutina es el principal componente de las hojas de *Annona cherimola* Miller (Falé *et al.*, 2013; Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017b).

En la Tabla 10, se muestran los resultados de las pruebas agudas en animales diabéticos tratados con los compuestos purificados de la FACHAc2. Como control positivo se muestran los valores de los niveles de glucemias obtenidos en animales diabéticos al ser tratados con acarbosa, observándose que la narcisina presenta el efecto anti-hiperglucemiante durante toda la prueba, a las 4 horas llegando a valores de glucemia comparables con valores del grupo control sano. La hiperina presenta el efecto antihyperglucemiante a las 2 horas y produce un incremento del efecto en comparación al producido por la acarbosa, alcanzando valores de glucemia comparables con los niveles del grupo control sano. Sin embargo, no se mantienen y a las 4 horas su efecto disminuye ligeramente a valores de glucemia comparables al de la acarbosa.

El flavonoide nicotinflorina presenta un efecto anti-hiperglucemiante durante toda la prueba, llegando a valores comparables con los niveles de glucemia generados por la acarbosa.

La astragalina presenta efecto anti-hiperglucemiante; a las dos horas produce niveles de glucemia comparables con los generados por acarbosa, y a las 4 horas pierde ligeramente su efecto.

El ácido clorogénico no presentó actividad anti-hiperglucemiante, los niveles de glucemia son comparables con los valores del grupo control diabético.

En cuanto al flavonoide isoquercitrina, si presenta el efecto anti-hiperglucemiante. Se observa que a las 2 horas presenta un efecto mayor al generado por la acarbosa; sin embargo, no se mantiene, ya que pierde ligeramente su efecto anti-hiperglucemiante a las 4 horas llegando a valores de glucemia comparables con los producidos por la acarbosa.

El efecto anti-hiperglucemiante observado por los flavonoides narcisina, nicotiflorina, hiperina, astragalina e isoquercitrina concuerda con lo reportado en la literatura (Tadera *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2013; Bindis *et al.*, 2013).

Varios polifenoles y en especial los flavonoides son conocidos por inhibir las enzimas α -glucosidasas; se ha descrito que esta actividad es usualmente menor por flavonoides glucosilados que por los no glucosilados (Tadera *et al.*, 2006).

Los resultados presentados en la Tabla 10 y Gráfica 9 nos muestran que la miricetina presenta un mayor efecto anti-hiperglucemiante al generado por la acarbosa, manteniendo niveles de glucemia a las 2 y 4 horas comparables con los niveles producidos por el grupo control sano.

Se observa que la rutina también presenta un efecto anti-hiperglucémico mayor al generado por la acarbosa a las 2 y 4 horas, y al igual que la miricetina, los niveles de glucemia son comparables con el grupo control sano. Los resultados obtenidos por la rutina validan el efecto anti-hiperglucemiante, previamente demostrado (Solares, 2015).

El efecto anti-hiperglucemiante observado por estos flavonoides, rutina y miricetina, concuerda con lo reportado en la literatura (Cazarolli *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2014; Vinayagam *et al.*, 2015; Solares, 2015; Calzada *et al.*, 2017b). Estos flavonoides pertenecen al grupo de los flavonoles; la diferencia entre ellos es la sustitución en la posición tres, en el caso de la rutina una glucosilación y en el caso de miricetina un grupo hidroxilo, como se puede observar en la Figura 10.

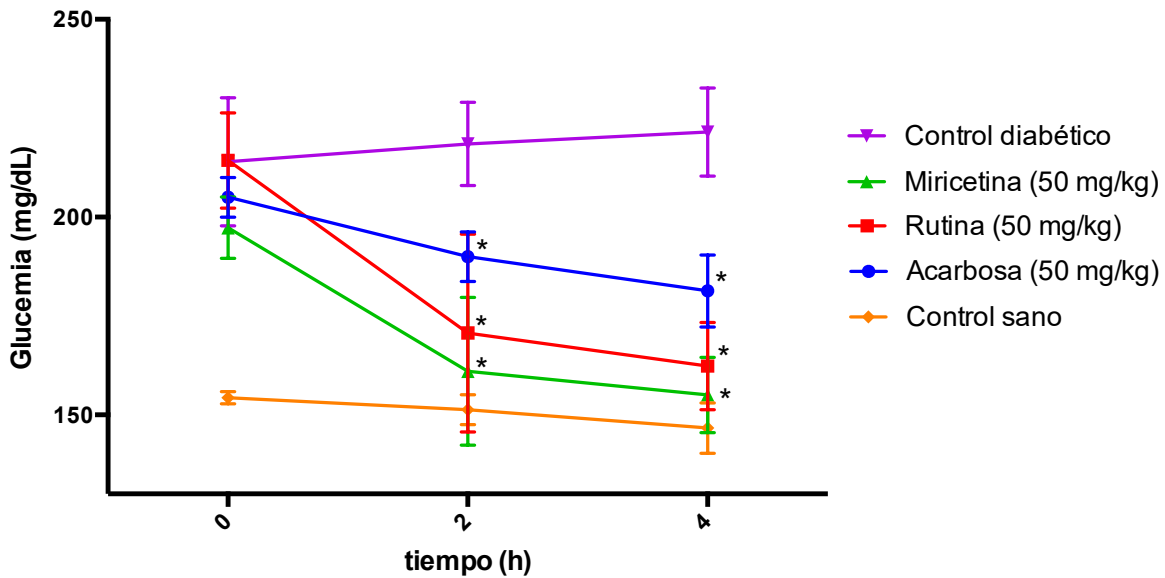
Se ha demostrado que la administración diaria de rutina en ratas con diabetes inducida químicamente normaliza los niveles de glucosa en sangre, inhibe el pico posprandial, protege al hígado y a los riñones contra el daño inducido por streptozotocina (Habtemariam *et al.*, 2015).

Estudios también han mostrado que la miricetina es uno de los principales componentes hipoglucemiantes de origen vegetal y su ingesta dietética es de alrededor de 0.98-1.1 mg por día, mayor que algunos otros flavonoles. La información sobre su consumo en los alimentos sugirió que el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (DM2) podría ser menor debido a una mayor ingesta de esta (Li *et al.*, 2012).

Tabla 10. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con los compuestos purificados en modelo agudo.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Acarbosa (50 mg/kg)	205±4	190±5*	181.3±7.4*
Narcisina (50 mg/kg)	204.7±9.8	186.3±4.1	167.3±15.5*
Hiperina (50 mg/kg)	203±3.5	152.7±13.7*	184.3±13
Nicotiflorina (50 mg/kg)	206.7±0.9	176.7±5.3*	179.7±6.1*
Astragalina (50 mg/kg)	203.3±11.9	190.7±3.3	200±6.4
Ácido clorogénico (50 mg/kg)	204.3±10.5	193±15.9	211±8.5
Isoquercitrina (50 mg/kg)	206.3±12.7	169±7.9*	197.7±8.9
Rutina (50 mg/kg)	214.3±9.8	170.6±20.4*	162.3±8.9*
Miricetina (50 mg/kg)	197.3±6.3	161±15.2*	155±7.8*
Control diabético	214±14	218.5±9.1	221.5±9.6

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05



Gráfica 9. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con acarbosa, rutina y miricetina a las 0, 2 y 4 horas; * $p < 0.05$

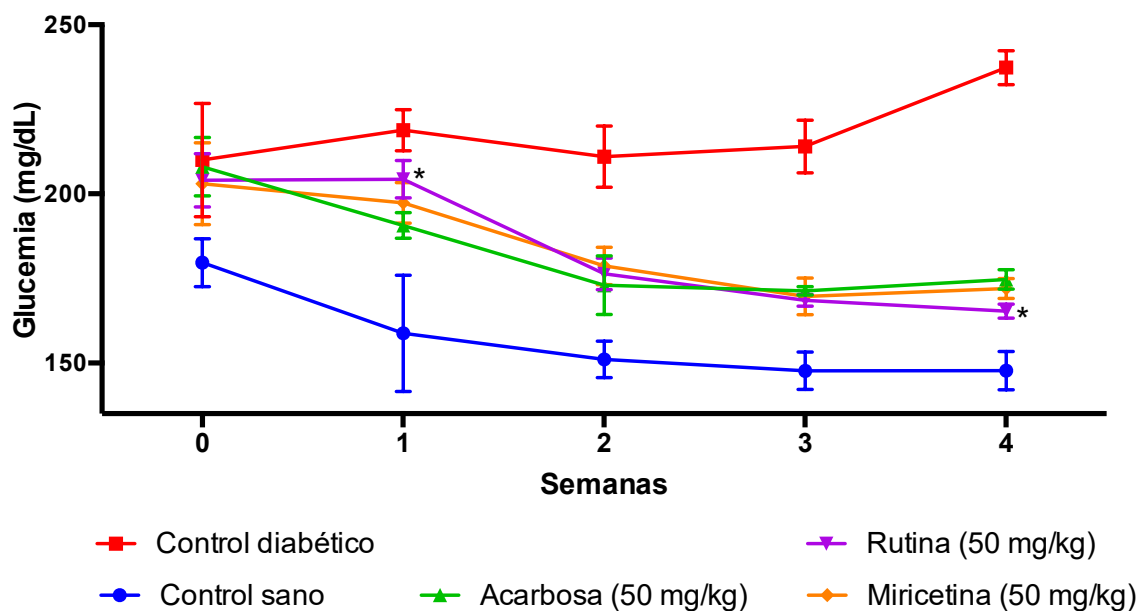
Tomando en cuenta que los flavonoides rutina y miricetina mostraron un mejor efecto anti-hiperglucemiante al producido por la acarbosa, fueron seleccionados para realizar las pruebas subcrónicas.

En la Gráfica 10 y Tabla 11 se muestra la prueba subcrónica de los animales diabéticos tratados con rutina y miricetina. Los niveles de glucemias obtenidos son comparados con las glucemias de los animales diabéticos tratados con acarbosa.

Estos resultados muestran que, la rutina continúa presentando una actividad anti-hiperglucemiante durante todo el experimento, generando valores de glucemia comparables con los generados por el grupo tratado con acarbosa la mayor parte de la prueba; para la 4ta. semana, la rutina produce un efecto anti-hiperglucemiante ligeramente mayor al producido por la acarbosa.

En cuanto al flavonoide miricetina, se observa que también continúa presentando el efecto anti-hiperglucemiante previamente observado durante la prueba subcrónica. Es importante hacer notar que los niveles de glucemia generadas por la miricetina son comparables con las glucemias generadas por los grupos tratados con acarbosa durante todo el experimento.

Estos resultados presentados por la rutina y la miricetina presentan una ventaja, ya que muchos fármacos ocupados para el tratamiento de la DM2 pierden su efecto cuando son utilizado por periodos largos (Li *et al.*, 2012).



Gráfica 10. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con acarbosa, rutina y miricetina por 28 días; * $p < 0.05$.

Tabla 11. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con acarbosa, rutina y miricetina a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.

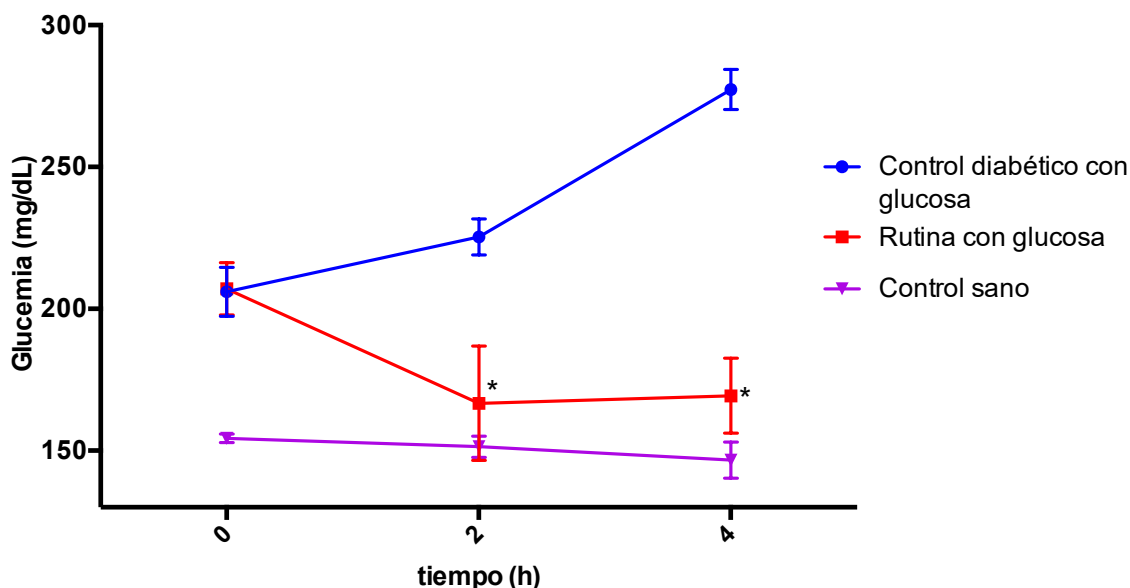
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Acarbosa (50 mg/kg)	208±7.4	190.6±3.2	173±7.5	171.3±1	174.7±2.5
Rutina (50 mg/kg)	204±6.8	204.3±5	176.3±4	168.3±2	165.3±1.8*
Miricetina (50 mg/kg)	203±10.5	197.3±5.2	178.7±4.8	169.7±4.7	172±2.5
Control sano	179.7±5.5	158.7±13.3	151±4.2	147.7±4.3	147.7±4.3
Control diabético	210±14.5	220.8±2.2	218.2±1.5	214±6.7	237.3±4.3

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

En las Gráficas 11-14 y en las Tablas 12-15 se muestran las pruebas de tolerancia oral a la glucosa (TOG) y a la sacarosa (TOS), con el objetivo de aportar información para establecer el posible mecanismo de acción mediante el cual, la rutina y miricetina producen su efecto anti-hiperglucemiante.

En las Gráficas 11-12 y en las Tablas 12-13, se muestran los resultados obtenidos de la prueba de tolerancia oral a la glucosa y sacarosa para la rutina. Los niveles de glucemia son comparados con el control diabético administrado solo con glucosa al t=0 h.

En los resultados mostrados en la Gráfica 11 y Tabla 12, se observa que, al administrar una carga de glucosa en animales diabéticos, los niveles de glucosa se elevan, mostrándose el pico posprandial con su máximo a las 4 horas. Cuando la rutina es administrada en combinación con glucosa, inhibe el pico posprandial a partir de las 2 horas; a las dos horas mantiene valores de glucemia con las del grupo control sano, y a las 4 horas pierde ligeramente efecto anti-hiperglucemiante.



Gráfica 11. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados 30 min después con rutina previa administración de glucosa; *p<0.05.

Tabla 12. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina en la prueba de TOG.

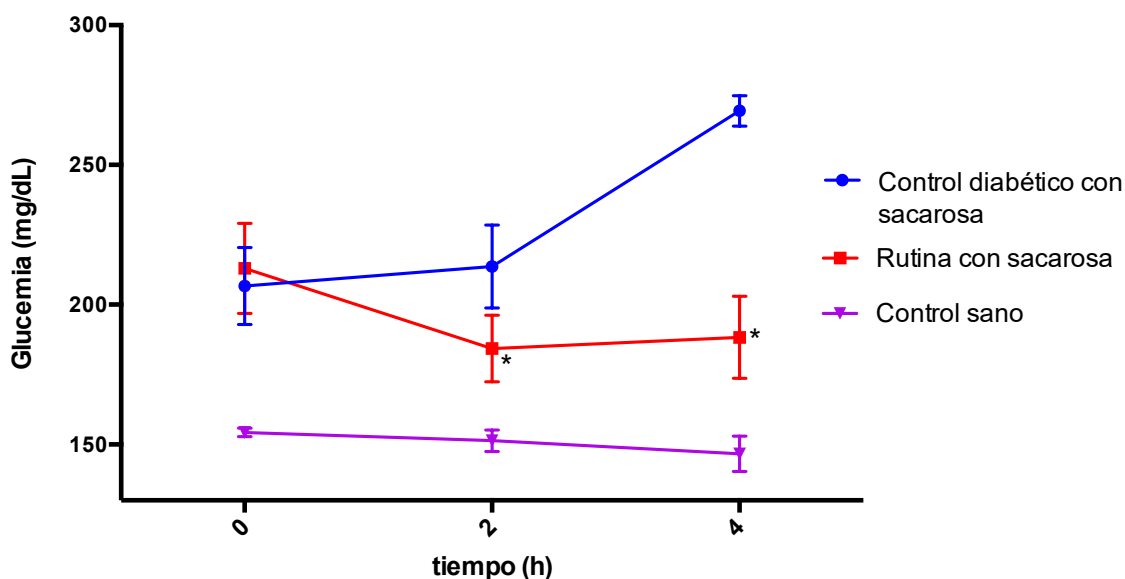
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con glucosa	206±7.4	225.3±5.5	277.3±6
Rutina con glucosa	207±9.2	166.7±20.1*	169.3±13.2*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

En los resultados mostrados en la Gráfica 12 y en la Tabla 13, muestran que al administrar una carga de sacarosa en animales diabéticos, los niveles de glucosa se elevan, mostrándose el pico posprandial con un máximo a las 4 horas. Cuando la rutina es administrada en combinación con sacarosa, se observa que inhibe el pico posprandial a partir de las 2 horas.

Los resultados mostrados en las pruebas TOS muestran que la rutina genera una disminución en los niveles de glucosa en sangre, indicándonos que el posible blanco de acción es mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

Se han demostrado que la rutina interactúa con cuatro residuos de aminoácidos de las enzimas α -glucosidasas, lo cual revela su potencial de unión a nivel molecular en el sitio catalítico de la acarbosa; también se demostró que este flavonol glucosilado tiene una alta afinidad por las enzimas α -glucosidasas al igual que la acarbosa (Calzada *et al*, 2017a). Debido a que la rutina presenta una estructura similar al azúcar (rutinosa), puede actuar como el sustrato de las enzimas α -glucosidasas e inhibirlas competitivamente (Hakamata *et al.*, 2009).



Gráfica 12. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0,2 y 4 horas, tratados 30 min después con rutina previa administración de sacarosa; * $p < 0.05$.

Tabla 13. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina en la prueba de TOS.

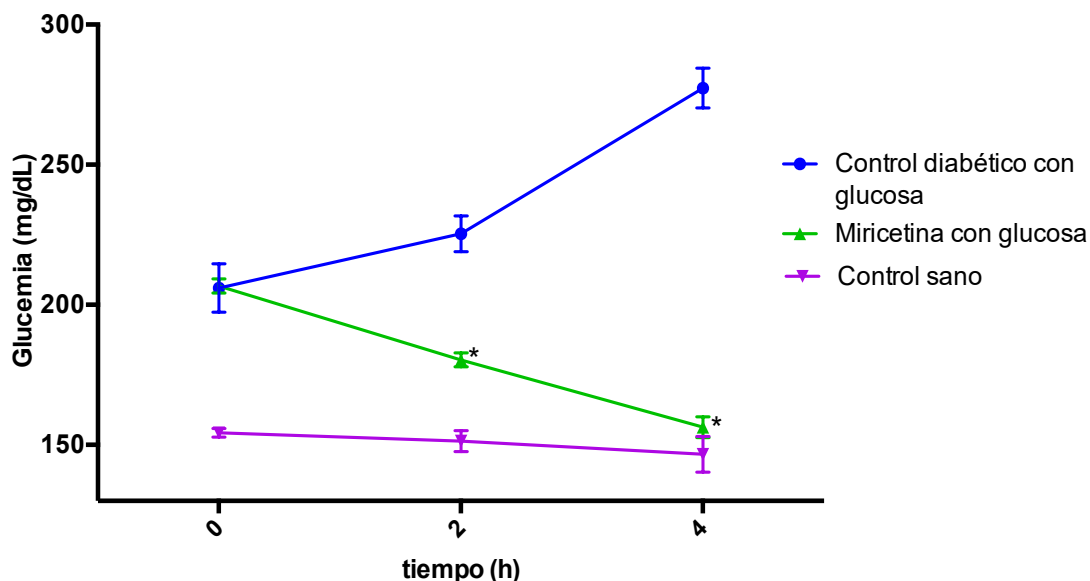
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con sacarosa	206.7±11.9	213.7±12.8	269.3±4.7
Rutina con sacarosa	213±16	184.3±11.9*	188.3±14.7*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio \pm D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

En las Gráficas 13-14 y en las Tablas 14-15 se muestran los resultados de la prueba de tolerancia oral a la glucosa y sacarosa con miricetina. Los niveles de glucemia son comparados con el control diabético administrado solo con sacarosa.

Los resultados de la prueba TOG son mostrados en la Gráfica 13 y Tabla 14. Cuando la miricetina es administrada en combinación con glucosa, inhibe el pico posprandial a partir de las 2 horas, llegando a valores de glucemia comparables con las glucemias del grupo control sano a las 4 horas. Estos resultados muestran que la miricetina afecta la captación o utilización de la glucosa y/o en la secreción

de la insulina (Bilous *et al.*, 2010).



Gráfica 13. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados 30 min después con miricetina previa administración de glucosa; * $p < 0.05$.

Tabla 14. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con miricetina en la prueba de TOG.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con glucosa	206±7.4	225.3±5.5	277.3±6
Miricetina con glucosa	206.7±8.4	180.3±7.3	156.3±4.9*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

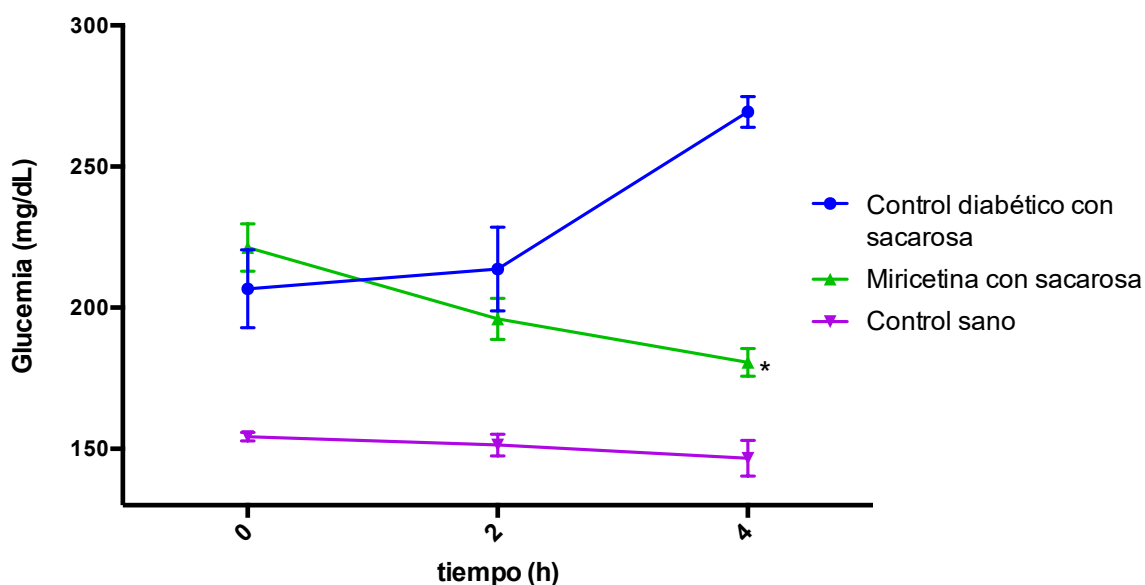
Los resultados de la prueba de TOS son mostrados en la Gráfica 14 y Tabla 15. Al administrar una carga de sacarosa en animales diabéticos, los niveles de glucosa se elevan, mostrándose el pico posprandial con un máximo a las 4 horas. Cuando la miricetina es administrada en combinación con sacarosa, se observa que inhibe el pico posprandial a las 4 horas.

Los resultados mostrados por la prueba TOG y TOS sugieren que la miricetina ejerce su efecto inhibitor en los niveles de glucemia a través de la inhibición de

las enzimas α -glucosidasas a nivel intestinal, sin embargo, no se descartan otros blancos de acción.

Recientemente, se han identificado inhibidores de enzimas α -glucosidasas que no presentan compuestos similares al azúcar y estos inhibidores podrían unirse al sitio de unión para la aglicona o en cualquier otro lugar (Figura 8) (Hakamata *et al.*, 2009).

De acuerdo a la literatura, el efecto antihiper glucemiante de la miricetina se debe a una mejora en la señalización de la insulina, también se ha reportado otro mecanismo por el cual disminuye los niveles de glucemia, el cual es mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas (Li *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2016). El poder de inhibición en las enzimas α -glucosidasas de la miricetina es debido a las sustituciones que presenta en el anillo B (Figura 9), se ha encontrado que la actividad inhibitoria incrementa considerablemente con el aumento de grupos hidroxilo en este anillo (Tadera *et al.*, 2006).



Gráfica 14. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados 30 min después con miricetina previa administración de sacarosa; * $p < 0.05$.

Tabla 15. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con miricetina en la prueba de TOS.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Control diabético con sacarosa	206.7±11.9	213.7±12.8	269.3±4.7
Miricetina con sacarosa	221.3±8.4	196±7.3	180.7±4.9*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2

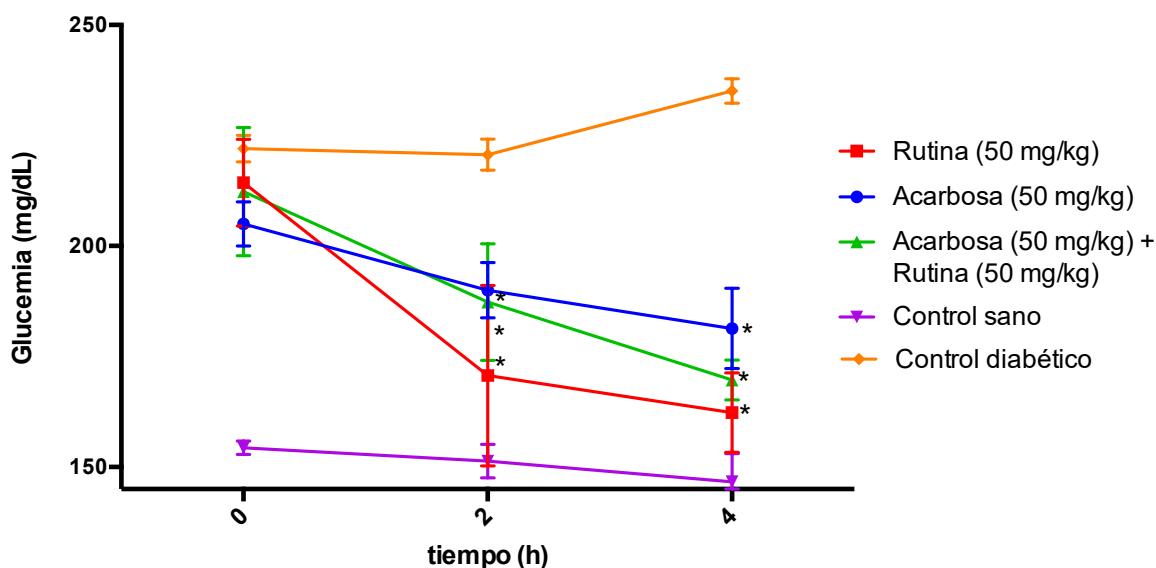
Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

El posible mecanismo de acción elucidado por los resultados obtenidos en las pruebas TOG y TOS con la rutina y la miricetina es la inhibición de las enzimas α -glucosidasas. Estas enzimas están presentes en las vellosidades intestinales y son enzimas que actúan en la hidrólisis de la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructuosa y galactosa) (Rosak *et al.*, 2012). El resultado es la demora en la digestión de los hidratos de carbono y el retardo en la hidrólisis de sacarosa, resultando en una disminución de glucosa en sangre.

A continuación se muestran los resultados y discusión de la tercera parte. Las glucemias son comparadas con el grupo control de animales diabéticos.

En la Gráfica 15 y Tabla 16, se muestran los resultados de las glucemias de animales diabéticos tratados con rutina y rutina-acarbosa en una prueba aguda.

Se observa que la combinación de acarbosa-rutina presenta un efecto anti-hiperglucemiante, el cual, presenta valores de glucemia comparables con los niveles de glucemia generados por la acarbosa sola y la acarbosa-rutina. Sin embargo, es importante hacer notar, que la mezcla de acarbosa-rutina nunca llega a valores de glucemia comparables con el grupo control sano como es el caso de la rutina sola. Estos resultados, nos indican que la administración conjunta de acarbosa con rutina no impacta en el efecto anti-hiperglucemiante producido por la administración de rutina sola.



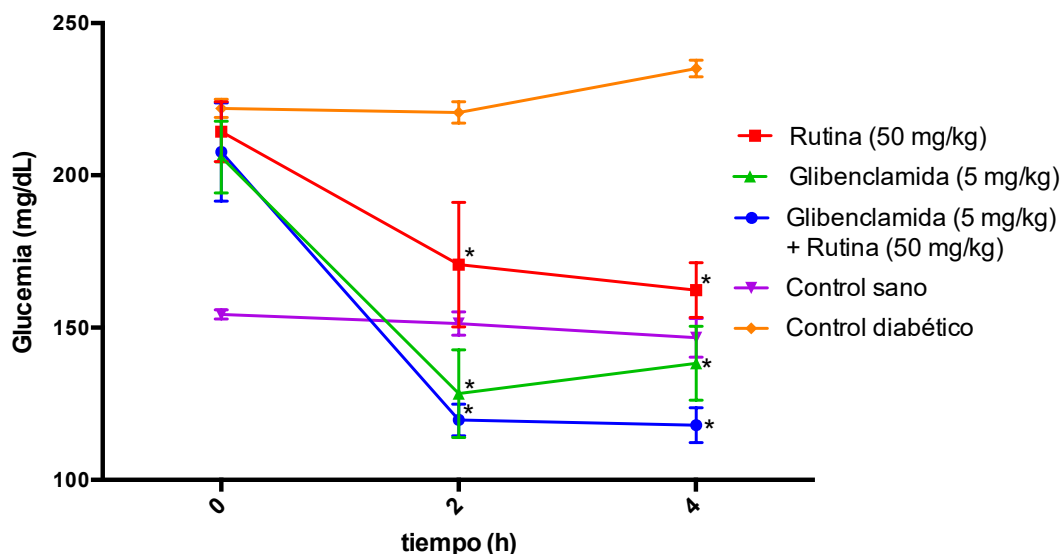
Gráfica 15. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina, acarbosa y una combinación de ambas; * $p < 0.05$.

Tabla 16. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados con rutina, acarbosa y rutina-acarbosa

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Rutina (50 mg/kg)	214.3±9.8	170.6±20.4*	162.3±8.9*
Acarbosa (50 mg/kg)	205±4	190±5*	181.3±7.4*
Acarbosa (50 mg/kg)+rutina (50 mg/kg)	212.3±14.5	187.3±13.2*	169.7±4.5*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2
Control diabético	214±14	218.5±9.1	221.5±9.6

Promedio \pm D.E.; $n=6$, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

En la Gráfica 16 y en la Tabla 17, se muestran los resultados de los niveles de glucemia de animales diabéticos tratados con rutina y glibenclamida-rutina en prueba aguda. El análisis de resultados muestra que la combinación de glibenclamida-rutina presenta una actividad anti-hiperglucemiante, sin embargo, genera hipoglucemia leve a las 4 horas, al igual que la administración de glibenclamida sola. Con estos resultados, se indica que la mezcla de rutina con glibenclamida potencia ligeramente el efecto anti-hiperglucemiante que presenta la rutina sola, generando hipoglucemia.



Gráfica 16. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina, glibenclamida y una combinación de ambas; * $p < 0.05$

Tabla 17. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados con rutina, glibenclamida y rutina-glibenclamida.

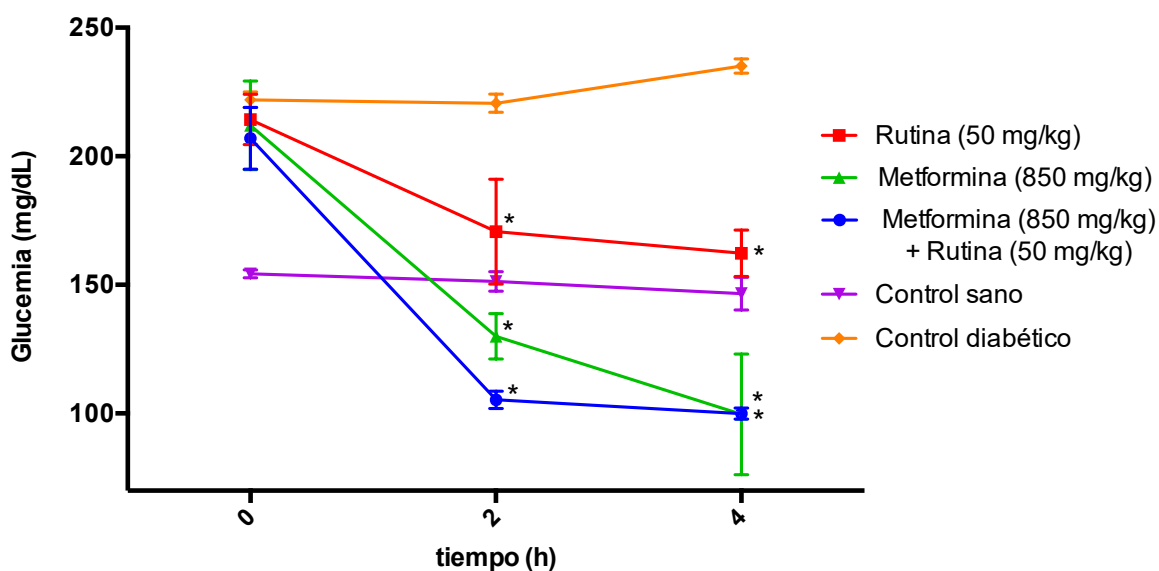
Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Rutina (50 mg/kg)	214.3±9.8	170.6±20.4*	162.3±8.9*
Glibenclamida (5 mg/kg)	206±11.8	128.3±14.4*	138.3±12.1*
Glibenclamida (5 mg/kg)+rutina (50 mg/kg)	207.7±16.1	119.7±5.1*	118±5.7*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2
Control diabético	214±14	218.5±9.1	221.5±9.6

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; * $p < 0.05$

En la Gráfica 17 y en la Tabla 18, se muestran los resultados de la prueba aguda en donde se comparan los niveles de glucemias de animales diabéticos tratados con rutina y rutina-metformina.

Como se puede observar en los resultados mostrados en la Gráfica 17 y Tabla 18, la combinación de metformina-rutina presenta en toda la prueba un efecto hipoglucemiante. Se debe hacer notar que la administración de metformina sola, también genera un efecto hipoglucemiante desde las dos hasta las cuatro horas del experimento. Con los resultados obtenidos, se puede indicar que la combinación de rutina con metformina potencia el efecto anti-hiperglucemiante que presenta la rutina y metformina cuando son administradas por separado, generando una hipoglucemia la mayor parte de la prueba.

De acuerdo a la literatura, el efecto aditivo que presenta la rutina cuando es combinada con otros fármacos, en este caso con glibenclamida y metformina, es debido a que los mecanismos de acción de ambos son diferentes y por lo tanto el efecto se sinergiza (Aminoff, *et al.* 2014).



Gráfica 17. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental tratados con rutina, metformina y una combinación de ambas; * $p < 0.05$.

Tabla 18. Comparación de los valores de glucemias en animales con diabetes experimental a las 0, 2 y 4 horas, tratados con rutina, metformina y rutina-metformina.

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)		
	0h	2h	4h
Rutina (50 mg/kg)	214.3±9.8	170.6±20.4*	162.3±8.9*
Metformina (850 mg/kg)	212±17.2	130±8.8*	99.7±23.5*
Metformina (850 mg/kg)+rutina (50 mg/kg)	207±10.4	105.3±2.9*	100±1.9*
Control sano	154.3±1.2	151.3±3.1	146.6±5.2
Control diabético	214±14	218.5±9.1	221.5±9.6

Promedio ± D.E.; n=6, análisis por ANOVA de una vía; *p<0.05

VIII. CONCLUSIONES

Se confirma el efecto anti-hiperglucemiante del extracto etanólico, la fracción acuosa y la rutina.

Se confirma que el mecanismo por el cual el extracto etanólico, la fracción acuosa y la rutina generan disminución de los niveles de glucemia es mediante la inhibición de la enzima α -glucosidasa.

Se aporta que la fracción de diclorometano presenta un efecto anti-hiperglucemiante y el mecanismo mediante el cual genera este efecto es por inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

Los compuestos purificados e identificados de la fracción acuosa fueron siete flavonoides (rutina, narcisina, hiperina, nicotiflorina, isoquercitrina, astragalina, miricetina) y un ácido fenólico (ácido clorogénico).

Todos los flavonoides aislados mostraron una actividad anti-hiperglucemiante, sin embargo, la miricetina presenta un efecto importante comparable con el mostrado por la rutina y se evidencia que la miricetina es un inhibidor de las enzimas α -glucosidasas.

Se observa que la combinación de rutina-acarbose no afecta el efecto anti-hiperglucemiante. La combinación de rutina-glibenclamida y rutina-metformina genera interacción, potenciando ligeramente el efecto anti-hiperglucemiante y generando una hipoglucemia significativa.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Adeyemi, D.; Komolafe, O.; Adewole, O.E.; Adenowo, K. (2009) Antihyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). African Journal of Traditional. CAM; 6: 62-69.

Aminoff, M.; Boller, F. (2014) Handbook of clinical neurology. Elsevier. Edinburgh; 818-819.

Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. (2005) Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology; 99 :325–348.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (BDMTM). Actualización 2009, obtenido de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chirimoya&id=7229>

Bilous, R.; Donnelly, R. Handbook of Diabetes; Wiley-Blackwell: Oxford, 2010; p 238.

Bischoff, H. (1994) Pharmacology of glucosidase inhibitor. European Journal of Clinical Investigation, 24: S3–10.

Borges de Melo, E.; da Silveira Gomes, A.; Carvalho, I. (2006) α -and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedron. 62(44):10277-10302.

Brindis, F.; González-Trujano, M.; González-Andrade, M.; Aguirre-Hernandez, E.; Villalobos-Molina, R. (2013) Aqueous Extract of *Annona macrophyllata*: A Potential alfa-Glucosidase inhibitors. Biomed Research International.

Calzada, F.; Solares-Pascasio, J.; Ordoñez-Razo, R.; Velázquez, C.; Barbosa, E.; García-Hernández, N.; Mendez-Luna, D. & Correa- Basurto, J. (2017a)

Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona cherimola* Miller and rutin on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*; 9(1), 1.

Calzada, F., Correa-Basurto, J., Barbosa, E., Mendez-Luna, D., & Yopez-Mulia, L. (2017b). Antiprotozoal Constituents from *Annona cherimola* Miller, a Plant Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Diarrhea and Dysentery. *Pharmacognosy Magazine*; 13(49): 148–152.

Castro, J. (2007). Cultivo de la *Annona* (*Annona cherimola* Mill.). San José: Consejo Editorial.

Cazarolli, L.H.; Zanatta, L.; Alberton, E.H.; Figueiredo, M.; Folador, P.; Damazio, R.G., et al. (2008 a) Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*; 8:1429–40.

Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Reis Bonorino Figueiredo, M. S., Folador, P., Damazio, R. G., ... & Mena Barreto Silva, F. R. (2008 b). Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini reviews in medicinal chemistry*; 8(10):1032-1038.

Dirección General de Información en Salud (DGIS). Actualización 2007, obtenido de

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS.pdf

Escandón-Rivera, S.; González-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Navarrete, A.; Mata, R. (2012) α -Glucosidase Inhibitors from *Brickellia cavanillesii* *Journal of Natural Products*; 75, 968–974 Guyton, C.G.; Hall, J.E. (2006) *Tratado de Fisiología Médica*. 11ª Edición. Elsevier; 950.

Falé, L.; Ferreira, C.; Maruzzella, F.; Florêncio, H.; Frazão, F.; & Serralheiro, M. (2013). Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 150(2):718-723.

Federación Mexicana de Diabetes (FMD). Atlas de la IDF 7°, edición 2015

García-Lujan, C. (2009). Use of medicinal plants and dietary supplements for glycemic control of diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*; 8:229-239

González-Vega, M. (2013). Cherimoya (*Annona cherimola* Miller), fruit-bearing tropical and subtropical of promissory values. *Cultivos tropicales*.

Guyton, A.; Hall, J. & Guyton, A. (2006). Tratado de fisiología médica. Elsevier Brasil :234-236

Habtemariam, S., & Lentini, G. (2015). The therapeutic potential of rutin for diabetes: an update. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(7), 524-528.

Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., & Oku, T. (2009). Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Current topics in medicinal chemistry*, 9(1), 3-12

Hong, H.; Li, S.; Zhang, X.; Ye, W.C. (2013). Flavonoids with α -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*. *Chinese medicine*; 8:19.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas diabetes 2013.

International Diabetes Federation (IDF). Signs and symptoms of diabetes, 2015

Israili, Z. (2011). Advances in the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. *American Journal of Therapeutics*; 18 :117-152.

Jo, S. H., Ka, E. H., Lee, H. S., Apostolidis, E., Jang, H. D., & Kwon, Y. I. (2009). Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*; 2(4): 52-60.

Jyothi, B.; Venkatesh, K.; Chakrapani, P. (2011). Phytochemical and Pharmacological potential of *Annona cherimola*. *International Journal of Phytomedicine*; 3 (2011): 439-447

Kim, J.; Kang, M.; Choi, H.; Jeong, S.; Lee, Y.; Kim J. (2011) Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice*; 5(2): 107-111.

Krentz, A.; Bailey, C. (2005) Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*; 65 :385-411.

Lebovitz, H. (2009). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*; 539–551

Li, Y., & Ding, Y. (2012). Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 19-25.

Li, Y.; Nishimura, T.; Teruya, K.; Maki, T.; Komatsu, T.; Hamasaki, T.; Kashiwagi, T.K.; Shigeru, S.S.; Katakura, Y.; Osada, K.; Takeshi, K.; Kazumichi, O.; Shinkatsu, M.; Yoshitoki, I.; Zbigniew Gadek & Shirahata S. (2002) Protective mechanism of reduced water against alloxan-induced pancreatic β -cell damage: Scavenging effect against reactive oxygen species *Cytotechnology*. Kluwer Academic Publishers.

Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Menichini, F.; Mastellone, V.; Avallone, L. & Menichini, F. (2012) Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total

phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*; 25(2): 179–184.

Mata, R.; Sol C., Sonia E., Krutzkaya J., and Rivero C.I., (2013) Mexican antidiabetic herbs: Valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products*.

Meng, Y., Su, A., Yuan, S., Zhao, H., Tan, S., Hu, C., ... & Guo, Y. (2016). Evaluation of Total Flavonoids, Myricetin, and Quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. As Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 444-449.

Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. (2007). *Harper bioquímica ilustrada*. 28ª edición. McGraw-Hill; 184-192

Norma Oficial Mexicana, NOM (2010). Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. NOM-015-SSA2-2010

Ocegueda, S.; Moreno, E.; Koleff, P. (2005) Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas* 2005; 62:12-15

Organización Mundial de la Salud (OMS) Nota descriptiva N°312. 2014

Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe mundial sobre la diabetes. 2016

Quispe, A.; Callacondo-Riva, D.; Rojas-Camayo, J.; Zavala-Curzo, D.; Posso-Rivera, M.C.; Vaisberg-Wolach, A.J. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *Acta Médica Peruana*; 26(3):156–161.

Ramírez, R.; Mora, F.; Avila, J. (2011) Composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). Revista de la facultad de farmacia, Madrid; 53(2): 2-6

Rang, R., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2008). Rang & Dale Farmacología. Elsevier Brasil. 238-2341

Rosak, C.; Mertes, G. (2012) Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. Alemania.

Solares J. I. (2015) Actividad antidiabética y efecto sobre algunos marcadores de estrés oxidativo a partir del extracto etanólico de las hojas de *Annona cherimola* Mill. en ratas con diabetes mellitus. Tesis de maestría, México, 2015.

Stuart, F. (2012). Fisiología humana. McGraw-Hill Interamericana. 12ª edición; 675-677

Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. Journal of nutritional science and vitaminology, 52(2), 149-153.

Tan, B. K. H., & Ong, K. W. (2014). Influence of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. Polyphenols in Human Health and Disease. San Diego: Academic, 95-111.

Tébar, F.; Escobar, F. (2009) La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica. Panamericana. España, 3-7

Vinayagam, R.; Xu, B. (2015) Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. Nutrition & Metabolism. China, 2015.

Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014). α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3(3), 136-174.

Zhang, L.; Yan. (2009) Research progress in anti-microbial of flavonoids. *Anti-Infection Pharmacy*. 6, 92–95.