

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY**

**CAMPUS MONTERREY
DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGIA Y ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGIA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.**

**ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HARINA DE NOPAL
(*OPUNTIA* SPP.) Y SU EFECTO *IN VITRO* EN SECRECIÓN DE INSULINA**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR:

LILIANA SANTOS ZEA

MONTERREY, N.L.

MAYO DE 2010

Resumen

Los nopales son un grupo de especies vegetales pertenecientes a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, miembros de la familia *Cactaceae* que forman parte de la tradición alimenticia, medicinal y religiosa de México, siendo este país el principal productor y exportador a nivel mundial. Entre las propiedades estudiadas se encuentra que posee actividad antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolémica e hipoglucemiante. La información reportada sobre su contenido fitoquímico demuestra la presencia de compuestos de la familia de las pironas, como el opuntiol y sus derivados, y flavonoles que incluyen glicósidos de kaempferol, quercetina e isorhamnetina, entre otros. Además se ha documentado que posee un alto contenido de fibra dietética.

El consumo de nopal se ha asociado con efectos antidiabéticos, los cuales han sido atribuidos principalmente a la fibra. Sin embargo poco se sabe de los metabolitos del nopal en cuanto a su mecanismo de acción contra diversas enfermedades y la relación con su efecto antioxidante.

El objetivo de este trabajo es determinar el perfil de compuestos fenólicos de la harina de diez variedades de nopal mexicano (*Opuntia* spp. y *Nopalea* sp.), así como su actividad antioxidante y el efecto *in vitro* en la secreción de insulina en la línea celular de páncreas, RIN-5F.

Los resultados obtenidos demostraron que las muestras se encontraban en diferentes estados de madurez, y se encontraron diferencias en la composición proximal de las muestras, incluso en variedades pertenecientes al mismo genotipo. La cantidad de fibra dietética varió de acuerdo con el grado de madurez, exhibiendo mayor fibra insoluble y menor soluble aquellas con mayor madurez. El contenido de compuestos fenólicos se encontró debajo de lo reportado en la literatura, posiblemente debido al procesamiento para la obtención de las harinas, pero manteniendo una actividad oxidante comparable a frutas como las fresas, zarzamoras y arándanos. El análisis de flavonoides elucidó cuatro glicósidos de isorhamnetina y dos de kaempferol, así como la presencia de las agliconas de tres flavonoles: kaempferol, quercetina y un tercero que pudiera ser considerado

isorhamnetina. Las cinéticas de hidrólisis determinaron que este proceso depende de la concentración de los glicósidos en el extracto crudo.

A pesar de que algunos compuestos fenólicos tienen la capacidad de inducir la secreción de insulina, los resultados del ensayo *in vitro* mostraron el efecto contrario al esperado, una disminución en la secreción de insulina.

En conclusión, en este trabajo se determinó el potencial del nopal en el mercado de alimentos funcionales y suplementos alimenticios, principalmente debido a su alto contenido de fibra dietética, la presencia de tres flavonoides y su actividad antioxidante.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo muy especialmente a mi abuelo Don Lauro Zea Castillo, por todo el cariño que nos dio y por siempre impulsarnos a salir adelante. Te quiero mucho.

A mis padres, por haber apoyado mi decisión en seguir una carrera en búsqueda de la ciencia y el conocimiento. Gracias por enseñarme a ir más allá y ser un ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Alfredo y David, por estar ahí conmigo, en las buenas y en las malas. A mis abuelas y abuelo, por estar al pendiente de mi progreso en esta vida. A toda mi familia por su apoyo.

¡Muchas gracias, los quiero mucho a todos!

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi asesor, el Dr. Sergio Serna, por dejarme formar parte de su equipo de trabajo, por compartir sus conocimientos, por ser un excelente asesor y profesor, y depositar su confianza en mí para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Janet Gutiérrez por estar pendiente de mi trabajo, ser siempre positiva y no dejarme renunciar en ningún momento.

A mis sinodales, el Dr. Silverio García y el M.C. Víctor Lara por aportar su punto de vista para culminar este trabajo de manera exitosa.

A la Dra. Esther Pérez y la M.C. Irasema Romo, porque sin sus consejos y seguimiento constante no habría podido llevar a cabo este proyecto.

A todos los profesores del posgrado, por entregar sus conocimientos y ayudar a mi formación en la ciencia.

A toda mi familia por haberme apoyado estos dos años, en especial durante los últimos meses.

A mis amigos del laboratorio y del posgrado Daniel, Raúl, Perla, Ana, Naty, Cristy, Marysol, Alma, Lidia, Jessy, Karla, Erick, Fede, Héctor y Miguel, por haber estado a mi lado y apoyado en todo momento con sus ánimos, su ayuda y sus conocimientos.

A Dios por permitirme dar un paso más en la vida.

Índice General

Resumen	i
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice General	v
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	Xii
Capítulo I: Introducción	1
Capítulo II: Antecedentes	4
2.1. El nopal (<i>Opuntia</i> spp.)	4
2.1.1. Composición química	6
2.1.1.1. Análisis fitoquímicos previos	7
2.1.1.2. Fibra dietética	13
2.2. Diabetes mellitus	15
2.2.1. Criterios de diagnóstico	17
2.2.2. Aberraciones metabólicas	18
2.2.3. Secreción de insulina	21
2.2.4. Tratamiento	23
2.2.5. Evidencia antidiabética del consumo de nopal y extractos del mismo	27
2.2.5.1. Estudios <i>in vitro</i>	28
2.2.5.2. Estudios <i>in vivo</i>	29

2.1.2.3. Estudios clínicos	32
Capítulo III: Materiales y Métodos	34
3.1. Material y reactivos	34
3.2. Caracterización de la materia prima	35
3.2.1. Estimación del índice de madurez	35
3.2.1.1. Cuantificación de azúcares solubles	35
3.2.1.2. Determinación de acidez titulable	36
3.2.2. Análisis bromatológico	37
3.2.3. Caracterización de fibra dietética	37
3.3. Extracción de compuestos	39
3.4. Análisis fitoquímicos de los extractos	39
3.4.1. Cuantificación de fenólicos libres	39
3.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)	39
3.4.3. Hidrólisis de los extractos	40
3.4.4. Detección de compuestos por HPLC-PDA	41
3.5. Bioensayo de secreción de insulina	42
3.5.1. Mantenimiento de las células	42
3.5.2. Bioensayo de estimulación de insulina	43
3.5.3. Cuantificación de insulina	44
3.6. Análisis estadístico	44
Capítulo IV: Resultados y discusión	45
4.1. Caracterización de la materia prima	45
4.1.1. Estimación del índice de madurez	45

4.1.2. Análisis bromatológico	46
4.1.3. Caracterización de fibra dietética	48
4.2. Comparación del perfil fitoquímico	50
4.2.1. Cuantificación de fenólicos libres	50
4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)	53
4.2.3. Hidrólisis de los extractos	54
4.2.4. Análisis de flavonoides por HPLC-PDA	57
4.3. Bioensayo de secreción de insulina	65
Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones	67
Referencias	70
Anexo A: Cromatogramas de los extractos crudos	82
Anexo B: Cromatogramas de los extractos hidrolizados	87
Anexo C: Espectros de absorción UV-visible de los glicósidos	92

Índice de Tablas

Tabla 2.1	Información taxonómica del nopal	4
Tabla 2.2	Análisis proximal de distintas variedades de nopal	6
Tabla 2.3	Rendimiento de los metabolitos de <i>Opuntia</i> spp.	12
Tabla 2.4	Contenido de fibra dietética en nopal	14
Tabla 2.5	Comparación entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2	17
Tabla 2.6	Criterios de diagnóstico de diabetes mellitus y otras categorías de hiperglucemia	18
Tabla 2.7	Estimulantes de secreción de insulina	22
Tabla 2.8	Tipos de insulina	24
Tabla 2.9	Medicamentos hipoglucemiantes	25
Tabla 2.10	Resumen de los estudios <i>in vivo</i> con nopal	31
Tabla 3.1	Variedades de nopal analizadas	34
Tabla 3.2	Espectros de absorción reportados	42
Tabla 3.3	Gradiente utilizado para la separación	42
Tabla 3.4	Controles utilizados en el bioensayo	44
Tabla 4.1	Estimación del índice de madurez	46
Tabla 4.2	Análisis bromatológico de 10 variedades de nopal mexicano	47
Tabla 4.3	Contenido de fibra dietética total en 10 variedades de nopal mexicano	49
Tabla 4.4	Contenido de fenólicos libres y actividad antioxidante por variedad de nopal	51
Tabla 4.5	Características de los flavonoides identificados	59
Tabla 4.6	Flavonoides identificados en diez variedades de nopal	62
Tabla 4.7	Eficiencia de la hidrólisis ácida de los flavonoides a los 20min	64
Tabla 4.7	Índice de secreción de insulina	65

Índice de Figuras

Figura 2.1	Estructuras químicas de tres compuestos aislados e identificados en <i>Opuntia dillenii</i> .	8
Figura 2.2	Estructura de tres isómeros de quercetina aislados de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>	9
Figura 2.3	Estructuras de tres compuestos aislados de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>	11
Figura 2.4	Cambios en el metabolismo y consecuencias en la salud	19
Figura 2.5	Mecanismo de secreción de insulina	23
Figura 3.1	Procedimiento para determinación de fibra dietética total	38
Figura 3.2	Hidrólisis y obtención de la fracción de interés	41
Figura 4.1	Concentración de kaempferol en función del tiempo de hidrólisis para las variedades <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i> y <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i>	54
Figura 4.2	Concentración de quercetina en función del tiempo de hidrólisis para las variedades <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i> y <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i>	55
Figura 4.3	Concentración de flavonoide-3 en función del tiempo de hidrólisis para las variedades <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i> y <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i>	56
Figura 4.4	(A) Cromatograma del extracto crudo de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i> . (B) Cromatograma del extracto hidrolizado durante 20 min de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i>	58
Figura 4.5	Espectros de absorción en el rango UV-visible de (A) Quercetina en el extracto hidrolizado de la variedad <i>Jalpa</i> . (B) Estándar de quercetina.	59
Figura 4.6	Espectros de absorción en el rango UV-visible de (A) Kaempferol en el extracto hidrolizado de la variedad <i>Jalpa</i> . (B) Estándar de kaempferol.	60
Figura 4.7	Espectro de absorción en el rango UV-visible del flavonoide 3	61

Figura A.1	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i>	82
Figura A.2	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. lindheimeri</i> var. <i>silvestre Santa Emilia</i>	82
Figura A.3	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i>	83
Figura A.4	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. streptacantha</i> var. <i>Cardón</i>	83
Figura A.5	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. undulata</i> var. <i>Oreja de elefante</i>	84
Figura A.6	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. rastrera</i>	84
Figura A.7	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. robusta</i> var. <i>Tapón</i>	85
Figura A.8	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. leucotricha</i> var. <i>Duraznillo</i>	85
Figura A.9	Cromatograma del extracto crudo de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Villanueva</i>	86
Figura A.10	Cromatograma del extracto crudo de <i>N. cochenillifera</i> var. <i>Santa Emilia</i>	86
Figura B.1	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i>	87
Figura B.2	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. lindheimeri</i> var. <i>silvestre Santa Emilia</i>	87
Figura B.3	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i>	88
Figura B.4	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. streptacantha</i> var. <i>Cardón</i>	88
Figura B.5	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. undulata</i> var. <i>Oreja de elefante</i>	89
Figura B.6	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. rastrera</i>	89
Figura B.7	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. robusta</i> var. <i>Tapón</i>	90

Figura B.8	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. leucotricha</i> var. <i>Duraznillo</i>	90
Figura B.9	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>O. ficus-indica</i> var. <i>Villanueva</i>	91
Figura B.10	Cromatograma del extracto hidrolizado de <i>N. cochenillifera</i> var. <i>Santa Emilia</i>	91
Figura C.1	Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnosil-rhamnósido	92
Figura C.2	Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido	92
Figura C.3	Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnosido	92
Figura C.4	Espectro de absorción UV-visible de kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido	92
Figura C.5	Espectro de absorción UV-visible de kaempferol-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnósido	93
Figura C.6	Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosil-rhamósido	93

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	centígrados
•O ₂ ⁻	Radical superóxido
λ _{max}	Longitud de onda de máxima absorción
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micras
μM	micromolar
μmol	micromol
AAPH	2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina)dihidrocloruro
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido deoxiribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
AGV	Ácido graso volátil
ATP	Adenosintrifosfato
bs	Base seca
Ca ⁺² -CM	Complejo calcio-calmodulina
cAMP	Adenilato cíclico
CHCl ₃	cloroformo
cm	centímetros
cm ²	centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
DAG	diacilglicerol
dL	decilitro
DM	Diabetes mellitus
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DPPH	Radical difenilpicrilhidracil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAM	Equivalentes de ácido málico
ECG	Epicatequina
ED ₅₀	Dosis efectiva al 50%
EG	Equivalentes de glucosa

EGCG	Epigallocatequina
ELN	Extracto libre de nitrógeno
ET	Equivalentes de Trolox
EtOH	Etanol
F3	Flavonoide 3
FDI	Fibra dietética insoluble
FDS	Fibra dietética soluble
FDT	Fibra dietética total
FLC	Fosfolipasa C
FPG	Glucosa plasmática en ayunas
g	gramo
g	gravidades
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
G6P	Glucosa-6-fosfato
h	hora
H ₂ O	Agua
I1	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnosil-rhamnósido
I2	Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido
I3	Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnosido
I4	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosil-rhamósido
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IFG	Alteración en glucemia en ayunas
IGT	Disminución de la tolerancia a la glucosa
IL	interleucina
ind.	inducción
IP ₃	Inositol trifosfato
K	Kaempferol
K1	Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido
K2	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnósido
kcal	kilocalorías
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
LPL	lipoproteinlipasa
M	molar

Lista de abreviaturas

MeOH	metanol
mg	miligramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	minutos
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	milimolar
M-PER	Reactivo de extracción de proteína de mamífero
mU	miliunidades
m/v	masa/volumen
N	normalidad
NC	<i>N. cochenillifera</i>
ND	Dato no disponible/no detectable
ng	nanogramo
nm	nanómetro
OFI-J	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Jalpa</i>
OFI-V	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Villanueva</i>
OGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
OL	<i>O. lindheimeri</i> var. <i>silvestre Santa Emilia</i>
OL-D	<i>O. leucotricha</i> var. <i>duraznillo</i>
OM	Extracto metanólico
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
OR-G	<i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i>
OR-R	<i>O. rastrera</i> var. <i>rastrero</i>
OR-T	<i>O. robusta</i> var. <i>Tapón</i>
P	Fósforo
PAM	Presión media arterial
PBS	Buffer de fosfatos
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
POMC	Polisacáridos de <i>O. monacantha</i>
Proteínquinasa A	PQA
Q	Quercetina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto

Lista de abreviaturas

SBF	Suero bovino fetal
STZ	Estreptozotocina
SU	Sulfonilureas
TGL	Triglicérido
TMB	3,3,5,5-Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV-vis	Ultravioleta-visible
var.	Variedad
v/v	volumen/volumen

Capítulo I: Introducción

La diabetes mellitus es el mayor desorden endocrino a nivel mundial, con más de 197 millones de personas con alteraciones de tolerancia a la glucosa, y se espera que esta tendencia continúe a la alza, alcanzando 420 millones para el 2025 (Hossain *et al.*, 2007). Es la primera causa de mortalidad en México, provocando 70,512 defunciones en el 2007, lo que equivale al 13.7% del total registrado por la Secretaría de Salud (SINAIS, 2007). La Organización Mundial de la Salud estima que en México el número de pacientes que presentan esta enfermedad se incrementará de 2.179 millones en el 2000 a 6.130 en el 2030 (OMS, 2010). En Estados Unidos se estima que 23.6 millones de personas padecen diabetes, equivalente al 7.8% de la población, de los cuales sólo 17.9 millones de casos han sido diagnosticados (NIDDK, 2010).

En Estados Unidos se han realizado estudios epidemiológicos sobre la diabetes y su prevalencia en distintos grupos de edad y raza. Se determinó que dentro de la población estadounidense el riesgo de padecer esta enfermedad es 2 a 5 veces mayor en personas afro-americanas, hispanicas y nativo-americanas (Sereday y Martí, 2006). Estas cifras indican que la población latinoamericana es un grupo con alto riesgo para el desarrollo de este padecimiento.

A esta predisposición se añade el factor socioeconómico, ya que países como México han sufrido un cambio en el estilo de vida, incrementando la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, incluyendo la diabetes (Sereday y Martí, 2006). La adopción del llamado *estilo de vida occidental*, que involucra una menor actividad física y el consumo de alimentos baratos y de alta densidad energética contribuyen al aumento de padecimientos ligados a la obesidad, como el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina (Hossain *et al.*, 2007).

Actualmente existen terapias para el control de la diabetes, incluyendo manejo de la dieta, uso de medicamentos hipoglucemiantes, aplicación de insulina y actividad física, para ayudar al paciente a mantener una calidad de vida cercana a lo normal, así como retardar o prevenir las complicaciones a largo plazo (Garibay-Bagnis y San Martín-Martínez, 2006). Entre las principales desventajas de la terapia convencional se

encuentran los efectos secundarios, como episodios de hipoglucemia y aumento de peso, además que poblaciones de bajos recursos no tienen acceso a estos medicamentos (Sharma *et al.*, 2008).

En México es común el uso de terapias alternativas para el manejo de esta enfermedad, tales como el empleo de plantas medicinales, ya sea como reemplazo o complemento de los tratamientos convencionales (Andrade-Cetto *et al.*, 2005). A través de los datos aportados por la tradición herbolaria, se han estudiado diversas plantas, y se ha logrado aislar una variedad de compuestos con actividad antidiabética, incluyendo cumarinas, flavonoides, terpenoides y otros metabolitos secundarios, como arginina y ácido glutámico (Ross, 2009). En México se ha documentado información de al menos 306 plantas con efecto hipoglucemiante, pertenecientes a 235 géneros y 93 familias, entre las que se encuentran Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae (Andrade-Cetto *et al.*, 2005) y Rubiaceae (Guerrero-Analco *et al.*, 2007).

Una de las familias más prometedoras por su efecto antidiabético es la Cactaceae, particularmente el género *Opuntia*, al cual pertenece el nopal. Esta planta ha sido utilizada por los indígenas por sus efectos benéficos para la salud. Entre las propiedades estudiadas se encuentra que posee actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2002), antiinflamatoria (Cho *et al.*, 2006), así como hipocolesterolémica (Budinsky *et al.*, 2001), y recientemente se ha publicado un estudio sobre la reducción de glucosa sanguínea (Santos *et al.*, 2006).

Se han realizado diversos estudios para la identificación con metabolitos del nopal con potencial actividad biológica, principalmente por su efecto antioxidante, en diversas especies, incluyendo una especie asiática (*O. dillenii*) y una de amplia distribución a nivel mundial (*O. ficus-indica*), de esta última siendo estudiadas diferentes variedades. De estos trabajos se han identificado y aislado una gama de compuestos, incluyendo miembros de familia como la de las pironas (Opuntiol) (Qiu *et al.*, 2002; Ganguly *et al.*, 1965, Telang *et al.*, 1973), flavonoides (kaempferol, quercetina e isorhamnetina) (Ginestra *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2002; Saleem *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2003), principalmente. Además es importante recalcar que en las diferentes variedades analizadas se reportan diferentes perfiles fitoquímicos. Estos compuestos han sido

relacionados con actividad hipotensiva (Saleem *et al.*, 2005), antioxidante (Qiu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003) y neuroprotectora (Lee *et al.*, 2003).

En este trabajo se espera determinar el contenido de compuestos fenólicos en extractos de harinas de diez variedades de nopal mexicano (*Opuntia* spp. y *Nopalea* sp.), así como su actividad antioxidante. Se identificarán y cuantificarán los flavonoides presentes en dicho extracto, para lo cual se llevará a cabo una hidrólisis ácida. Posteriormente se probará la variedad con mayor capacidad antioxidante para analizar su efecto en la secreción de insulina por medio de un ensayo *in vitro* en la línea celular RIN-5F. Este tipo de células provienen de la clona de línea RIN-m de tumor de células β de rata las cuales están encargadas de secretar insulina en respuesta a una elevación en la concentración de glucosa.

Se espera por medio de estos ensayos elucidar un posible mecanismo de acción con respecto al efecto hipoglucémico del nopal ajeno a la fibra dietética. Esto permitirá relacionar el contenido fitoquímico de estas plantas con los beneficios en la salud humana, y la acción sinérgica con la fibra dietética. Finalmente, se elegirá la o las variedades con mayor potencial como nutracéutico.

Capítulo II: Antecedentes

2.1 El nopal (*Opuntia* spp.)

Se les denomina nopales a un grupo de especies vegetales pertenecientes a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, miembros de la familia *Cactaceae* (Vigueras y Portillo, 2001; de la Rosa Hernández y Santana Amaro, 1998), como se muestra en la Tabla 2.1. Estas plantas han sido utilizadas en México desde la época prehispánica como parte importante en la agro-economía del imperio Azteca, junto con el maíz (*Zea mays*) y el agave (*Agave* spp.) (Reynolds y Arías-Jiménez, 2003). El nopal forma parte de la tradición social y religiosa de los nahuas, quienes lo consideraban un talismán para alejar malos espíritus, además de emplearlo como remedio en la curación de enfermedades (Granados-Sánchez y Castañeda-Pérez, 1991).

Tabla 2.1: Información taxonómica del nopal^a

Reino	<i>Vegetal</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Orden	<i>Opuntiales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Género	<i>Opuntia</i> , <i>Nopalea</i>

^ade la Rosa-Hernández y Santana-Amaro (1998)

Las Cactáceas son originarias del continente americano, principalmente crecen en regiones áridas y semiáridas (de la Rosa-Hernández y Santana-Amaro, 1998). El nopal puede encontrarse distribuido desde la provincia de Alberta en Canadá hasta la Patagonia en Argentina (Granados-Sánchez y Castañeda-Pérez, 1991), además de que se ha difundido a África, Asia, Europa y Oceanía, tanto de manera cultivada como silvestre (Sáenz, 2006).

Físicamente, el nopal es una planta perenne, suculenta y espinosa, con órganos especializados llamados areolas. De estos órganos complejos nacen las flores, espinas y glándulas (Britton y Rose, 1919). Son cactáceas arborescentes, arbustivas o rastreras, con tallos cilíndricos, claviformes y cladodios ramificados (de la Rosa-Hernández y Santana-Amaro, 1998). Otras adaptaciones fisiológicas de estos organismos son la capa cerosa

que los recubre, el grosor de la cutícula y la alta concentración de mucílagos, relacionadas con su resistencia a ambientes secos (Granados-Sánchez y Castañeda-Pérez, 1991).

Se conocen alrededor de 300 especies del género *Opuntia*, aunque únicamente son utilizadas por el hombre menos de 20 de estas para propósitos de alimentación, forraje y obtención de colorantes. Entre las más cultivadas se pueden mencionar *O. ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. megacantha* y *O. streptacantha* (Sáenz, 2006).

En México, hasta el 30 de noviembre del 2009 se tiene una superficie cultivada de 12,041 ha, con una producción de 658,266 ton, dando un rendimiento de 59.685 ton/ha (SIAP, 2009). Se han identificado cuatro zonas nopaleras en el país: centro-sur (Puebla, Querétaro y Oaxaca), altiplano (Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Durango, Guanajuato y Jalisco), norte (Chihuahua y Coahuila) y Golfo de México (Nuevo León y Tamaulipas) (López-García *et al.*, 2003).

A nivel mundial, México es el principal productor de nopal, contando con el 90% de la producción, y es líder mundial en exportación a países como México también es el líder en el comercio mundial al ser exportador a Estados Unidos, Canadá, Japón y países europeos (SFA, 2010). Entre otros países productores y exportadores de nopal se encuentran China, Corea, Estados Unidos y Sudáfrica (Proméxico, 2007).

En México, el nopal constituye un elemento importante en la alimentación, y es consumido de diversas maneras: en ensalada, con tortilla, nopalitos con queso y revoltijos: mezcla de nopal con papas y camarones en mole rojo (Gutiérrez, 1998). Además, el fruto producido por esta planta, la tuna, es comestible fundamentalmente en estado fresco y maduro (Flores-Valdez *et al.*, 1995). Tanto los cladodios como el fruto han sido utilizados como productos naturales medicinales para disminuir el azúcar y colesterol sanguíneo, ya sea consumidas en la dieta o como suplementos (Vigueras y Portillo, 2001).

2.1.1. Composición química

La composición química del nopal es diferente para cada variedad, estado de madurez, considerándose maduro entre los 24 y 48 días (Rodríguez-García *et al.*, 2007). Otro factor de importancia que afecta la composición de la planta son las características del suelo como la acidez, salinidad, conductividad, humedad, textura y disposición de nutrientes (Granados-Sánchez y Castañeda-Pérez, 1991). Stintzing y Carle, (2005) documentaron en una revisión que los cladodios más jóvenes contienen más proteína, agua y extracto libre de nitrógeno. Entre los minerales predominantes en el nopal se encuentran el calcio (Ca) y el fósforo (P), los cuales varían en función de la madurez de la planta. Rodríguez-García *et al.*, (2007) identificaron que el porcentaje calcio aumenta, de 1.56% a los 22 días hasta 3.72% a los 64, tiempo en el que llega a saturación. El fósforo, por su lado, disminuye a lo largo de estas mismas etapas, de 0.43% a 0.27%.

Tabla 2.2: Análisis proximal de distintas variedades de nopal

Variedad	Tipo de muestra	Proteína(%)	Grasa(%)	Cenizas(%)	Fibra(%)	ELN(%)
<i>O. ficus-indica</i> ^a	Harina seca	13.1	2.87	19.61	ND	ND
<i>O. ficus-indica</i> ^b	Nopal seco y molido	1.99	1.81	15.00	6.24	74.96
<i>O. amyclaea</i> ^c	Nopal fresco	15.80	2.20	15.00	14.30	52.60
<i>O. ficus-indica</i> ^c	Nopal fresco	12.00	2.70	14.30	12.90	58.10
<i>O. inermis</i> ^c	Nopal fresco	12.20	2.30	16.80	13.80	55.50
<i>O. ficus indica</i> f. <i>amyloceae</i> ^d	Cladodios frescos	8.74	3.95	25.65	ND	60.36
<i>O. ficus indica</i> f. <i>inermis</i> ^d	Cladodios frescos	8.88	4.69	23.3	ND	60.93

^aRodríguez-García *et al.*, (2007)

^bCárdenas-Medellín (1996)

^cRodríguez-Feliz y Cantwell, (1987)

^dAyadi *et al.*, (2009)

ELN = Extracto libre de nitrógeno

ND = Dato no disponible

El análisis proximal de algunas variedades de nopal ha sido publicado por diversos autores (Tabla 2.2) donde se observan las diferencias en el perfil bioquímico incluso en muestras de la misma especie, como es el caso de *O. ficus-indica*, principalmente en cenizas y proteína. Para el caso de las cenizas, la composición del suelo es determinante, por lo que la misma especie creciendo en diferentes ambientes presenta contenido distinto de minerales (Granados-Sánchez y Castañeda-Pérez, 1991). En cuanto a la fibra cruda, el valor obtenido no es representativo para la cantidad real de fibra que contiene esta planta.

Esto es debido a que las fibras soluble e insoluble son fácilmente degradadas por los tratamientos ácidos y alcalinos del método oficial de la AOAC para cuantificarla (Norman, 1935).

2.1.1.1. Análisis fitoquímicos previos

El contenido fitoquímico del nopal ha sido estudiado para aislar metabolitos que posean actividad biológica. Compuestos de distintas familias han sido identificados, incluyendo carotenoides, fenólicos, vitaminas, ácidos grasos, terpenoides y polisacáridos (Stintzing y Carle, 2005). Cabe mencionar que los estudios se han realizado en diversas variedades y especies, aunque sobresale *O. ficus-indica* como modelo de estudio del nopal.

Uno de los primeros metabolitos encontrados en la especie *Opuntia cylindrica* es la mescalina (Turner y Heyman, 1960). Un reporte previo sobre este compuesto, indica que indujo un breve estado de psicosis en dosis de 5 a 11.5g/kg en 34 sujetos. Turner y Heyman (1960) encontraron la mescalina presente en una concentración de 9mg/g en la planta seca. Por análisis de espectros de masas se ha determinado la presencia de mescalina en las especies *O. acanthocarpa*, *O. basilaria* y *O. echinocarpa* (Ma *et al.*, 1986), sin embargo no se cuantificó su concentración o rendimiento.

Qiu *et al.*, (2002) elucidaron la estructura de cuatro compuestos de un extracto acuoso-etanólico (20:80) de los cladodios de *O. dillenii*, tres de los cuales pertenecen a la familia de las pironas y un glucósido de kaempferol. Las estructuras químicas se presentan en la Figura 2.1. Se analizó además la actividad antioxidante de estos y otros fenólicos presentes en el extracto por medio de los ensayos DPPH y secuestro del radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). El opuntiol y opuntióside tuvieron baja actividad ($\text{IC}_{50} > 100\mu\text{M}$) para uno o ambos de los ensayos, en comparación a otros metabolitos con $\text{IC}_{50} < 10\mu\text{M}$ que incluyen rutina, un glicósido de *O*-metil-quercetina, *O*-metil-quercetina, quercetina, manghaslina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y etil 3,4-dihidroxibenzoato, compuestos que también se aislaron del extracto etanólico.

Posteriormente Saleem *et al.* (2005) evaluaron en ratas la actividad hipotensiva del extracto metanólico (OM) de *O. dillenii*, y diversas fracciones del mismo (OM-1 a OM-

4). El extracto crudo causó una disminución del 54.12% en la presión arterial media (PAM) a una dosis única de 10mg/kg administrada por vía intravenosa. La fracción OM-1, de la cual se purificó el opuntiol, fue la que mostró mayor actividad (61.72% de reducción en PAM) seguida de las fracciones OM-2 (44.00%) y OM-3 (27.03%). Todas estas fracciones fueron probadas a una dosis intravenosa de de 10mg/kg. La fracción OM-4 administrada de la misma manera a una dosis de 30 mg/kg mostró también buena actividad (36.01%). La duración del efecto para todos los casos fue menor a 10min, excepto en el caso de OM-1 (37.20 min). Sin embargo, el efecto crónico de la administración intraperitoneal para OM y oral para el opuntióside I (aislado de OM-2) a dosis de 1000mg/kg y 100mg/kg respectivamente presentó efectos toxicológicos a nivel hepático y del bazo. Estas dosis equivalen al consumo de 110g/kg y 208g/kg de nopal fresco, es decir, una persona de 60 kg requeriría de consumir 6.6 kg de nopal fresco de la especie *O. dillenii*, siendo que la dosis efectiva de OM-1 es de 10 a 100 veces menor.

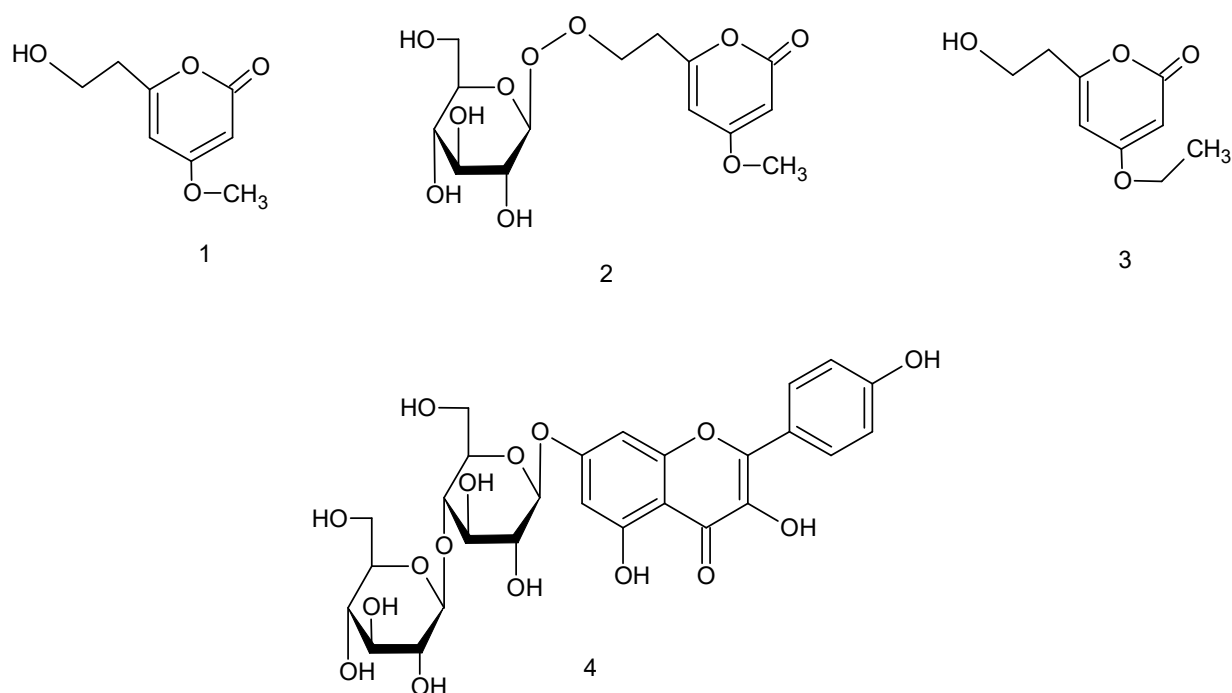


Figura 2.1: Estructuras químicas de tres compuestos aislados e identificados en *Opuntia dillenii*. (1) Opuntiol, (2) Opuntióside I, (3) 4-etoxi-6-hidroximetil- α -pirona, (4) kaempferol 7-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido. Adaptado de Qiu *et al.*, (2002)

Las propiedades antioxidantes analizadas por diversos métodos del extracto etanólico de *O. ficus-indica* var. *Saboten* fueron reportadas por Lee *et al.*, (2002). Se encontró que la IC₅₀ para radicales DPPH fue de 9.3µg/mL, así como 2mg/mL para la oxidación ácido linoléico y degradación de deoxiribosa. En otra prueba, los mismos autores reportaron actividad protectora del ADN (preservarlo en su forma de doble cadena y minimizando discontinuidades o *nicks*) a una concentración de 1µg/µL. Por otro lado, se determinó que el extracto tuvo un efecto protector contra el daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en esplenocitos (glóbulos blancos aislados del bazo) a 100µg/mL, ocasionado por exposición a un sistema glucosa/glucosa oxidasa (10mM/10mU/mL). Se determinó que tanto la actividad antioxidante como el contenido de fenólicos del extracto etanólico de nopal fueron mayores que en otras plantas Coreanas, como jengibre y espinacas.

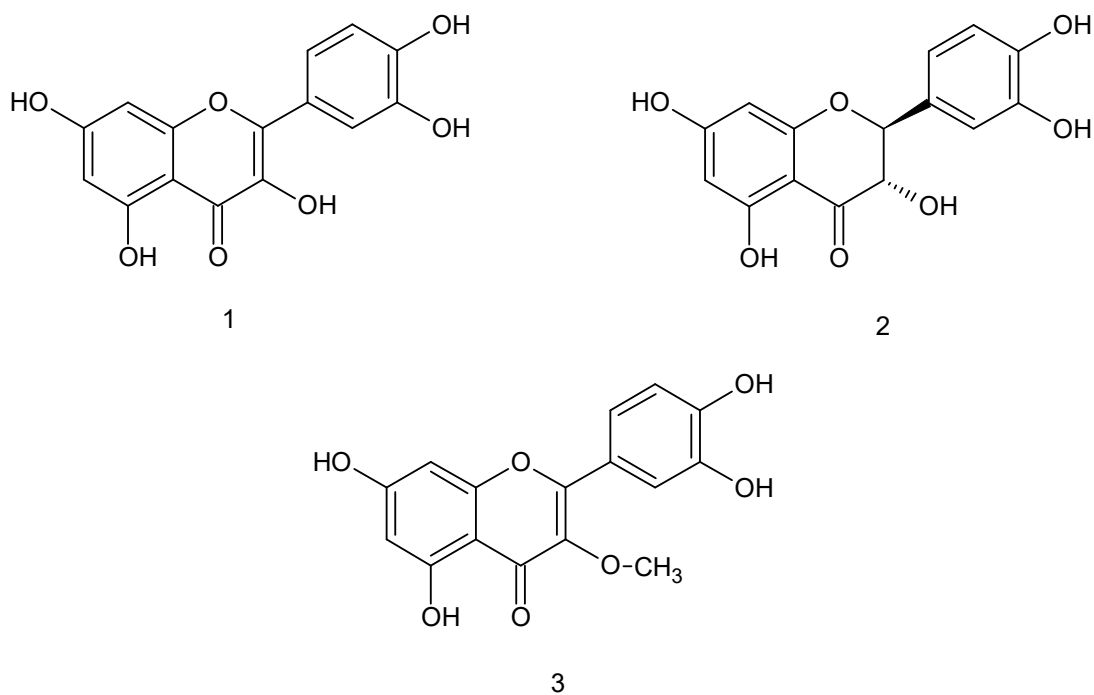


Figura 2.2: Estructura de tres isómeros de quercetina aislados de *O. ficus-indica* var. *Saboten*. (1) Quercetina, (2) (+)-dihidroquercetina, (3) 3-metil éter-quercetina. Adaptado de Dok-Go *et al.*, (2003).

En otro estudio realizado con *O. ficus-indica* var. *Saboten* se determinó el efecto neuroprotector de tres flavonoides aislados: quercetina, (+)-dihidroquercetina y 3-metil éter- quercetina (Dok-Go *et al.*, 2003), los cuales se presentan en la Figura 2.2. Las IC₅₀ para inhibir el daño en células corticales de rata causado por xantina/xantina oxidasa fueron 4-5µg/mL para la quercetina, 7-16µg/mL para (+)-dihidroquercetina y 0.6-0.7 para 3-metil éter-quercetina, siendo este último compuesto el más efectivo *in vitro*. Los autores atribuyen este hecho a la mayor hidrofobicidad de este compuesto comparado con los otros utilizados en el estudio, por lo que su acción podría estar dirigida a prevenir la oxidación de los lípidos de la membrana.

Posteriormente, de esta misma variedad, se aislaron el glucósido de isorhamnetina y dos isómeros glicosilados de megastigmadienona, denominados A y B, cuyas estructuras se muestran en la Figura 2.3 (Saleem *et al.*, 2006). Los autores no analizaron la actividad biológica de estos compuestos, aunque con los datos presentados por Lee *et al.*, (2002) se puede realizar la hipótesis de que alguno de estos compuestos podría ser uno de los principio activos que confiere actividad antihipertensiva y antioxidante, además de los reportados por Dok-Go *et al.*, (2003).

La variedad de *O. ficus-indica* (L.) Mill. también ha sido estudiada para la identificación de fenólicos y flavonoides (Ginestra *et al.*, 2009). En un extracto etanólico se encontraron tres flavonoides: kaempferol, isorhamnetina y quercetina, reportando valores de 29.640, 398.392 y 35.568µg/g en base seca, respectivamente, como total para cada una de las agliconas.

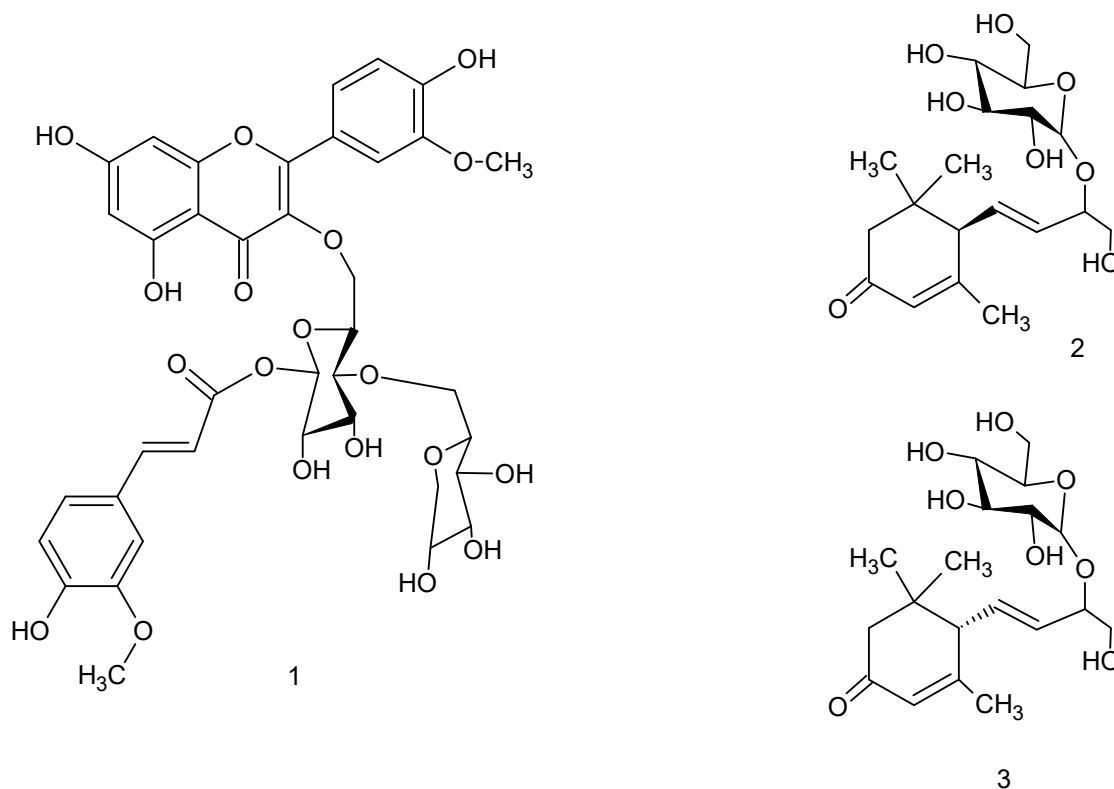


Figura 2.3: Estructuras de tres compuestos aislados de *O. ficus-indica* var. Saboten. (1) isorhamnetina-3-*O*-(600-*O*-*E*-feruloil)neohesperidosido, (2) (6*R*)-9,10-dihidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona-9-*O*- β -D-glucopiranosido, (3) (6*S*)-9,10-Dihidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona-9-*O*- β -D-glucopiranosido. Adaptado de Saleem *et al.*, (2006).

Como se mencionó, la especie más estudiada es *O. ficus-indica*. Kim y Park, (2009) realizaron una comparación del perfil de flavonoides de esta variedad con *O. humifusa*, ambas cosechadas en dos regiones de Corea, utilizando cromatografía líquida acoplada a masas y tándem masas. Entre los compuestos detectados se pueden mencionar ocho glucósidos de isorhamnetina, cuatro de kaempferol y tres de quercetina. Se determinó por análisis estadístico que el contenido de kaempferol glicosilado fue más abundante en *O. humifusa* que en *O. ficus-indica*, sin embargo, no se reportaron rendimientos para los compuestos.

Cabe mencionar que todos estos compuestos se encuentran en bajas cantidades en el nopal, y que su concentración puede variar no sólo dependiendo de la variedad analizada, sino también del estrés al que la planta esté sometida. En particular, se ha determinado

que los flavonoides se acumulan en condiciones de alta radiación ultravioleta y visible como factor de protección contra el daño oxidativo (Havaux y Kloppstech, 2001).

Los rendimientos de algunos de los metabolitos presentados se reportan en la Tabla 2.3, incluyendo el método de obtención del extracto crudo a partir de la planta. Se puede observar que la mayor concentración de Opuntiol (542.86µg/g) se obtuvo en un extracto clorofórmico de *O. eliator*. Para los flavonoides no se puede especificar en qué variedad se encontró la mayor cantidad, ya que, por ejemplo, Qiu *et al.*, (2002) reportan únicamente un glucósido, mientras que Ginestra *et al.*, (2009) cuantificaron varios glucósidos y el valor reportado fue la suma de estos.

Tabla 2.3: Rendimientos de los metabolitos de *Opuntia* spp.

Compuesto	Rendimiento (µg/g bs)	Solvente	Variedad
Opuntiol ^a	32.00	EtOH 80%	<i>O. dillenii</i>
Opuntiol ^b	542.86	CHCl ₃	<i>O. eliator</i>
Opuntiol ^c	5.00	EtOH:AcOH (95:5)	<i>O. polycantha</i>
Opuntiosido I ^a	780.00	EtOH 80%	<i>O. dillenii</i>
Kaempferol ^f	29.64	EtOH 70%	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
Kaempferol-7- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido ^a	1.90	EtOH 80%	<i>O. dillenii</i>
Isorhamnetina ^f	398.39	EtOH 70%	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
Isorhamnetina-3- <i>O</i> -(6 <i>00</i> - <i>O</i> - <i>E</i> -feruloil)neohesperidosido ^e	10.00	EtOH:H ₂ O (1:1) a 80°C	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>
Quercetina ^d	80.00	MeOH	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>
Quercetina ^f	35.57	EtOH 70%	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
3-metil éter-quercetina ^d	2.22	MeOH	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>
(+)-Dihydroquercetina ^d	23.80	MeOH	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>
(6 <i>R</i>)-9,10-dihidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona-9- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido ^e	18.00	EtOH:H ₂ O (1:1) a 80°C	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>
(6 <i>S</i>)-9,10-Dihidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona-9- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido ^e	7.80	EtOH:H ₂ O (1:1) a 80°C	<i>O. ficus-indica</i> var. <i>Saboten</i>

^aQiu *et al.*, (2002)

^bGanguly *et al.*, (1965)

^cTelang, (1973)

^dLee *et al.*, (2003)

^eSaleem *et al.*, (2006)

^fGinestra *et al.*, (2009)

2.1.1.2. Fibra dietética

Uno de los principales componentes del nopal es la fibra dietética, es decir, la porción del cladodio que es resistente a las enzimas digestivas humanas (Sáenz, 1997). Esta se constituye de dos grupos principales: soluble e insoluble según sus propiedades físicas. La celulosa, lignina y una parte de la hemicelulosa de la pared celular son los componentes de la fibra insoluble, mientras que pectinas, mucílagos, β -glucanos, fructooligosacáridos y el resto de la hemicelulosa conforman la fibra soluble (Kushi *et al.*, 1999). Es importante resaltar que el contenido y composición de la fibra varía de acuerdo con el estado de madurez de la planta, aumentando la cantidad de fibra insoluble y disminuyendo la de soluble (Sáenz, 1997). Por esta razón, para propósitos comerciales, los cladodios tiernos se usan para la producción de nopalitas, mientras que los que están parcialmente lignificados (2-3 años) son apropiados para la elaboración de harinas y otros productos (Abraján-Villaseñor, 2008)

La fibra soluble es de particular importancia desde el punto de vista nutricional, ya que tiene la capacidad de retener agua y formar geles, afectando la motilidad intestinal y retrasando la absorción de nutrientes (Matarese y Gottschlich, 2004), incluyendo glucosa, triglicéridos y colesterol (Chandalia *et al.*, 2000). Además, la fibra soluble puede ser fermentada por la microflora del intestino grueso, produciendo ácidos grasos volátiles (AGVs), los cuales interfieren en la síntesis de colesterol a nivel hepático (Inagaki y Sakata, 2001). Estas propiedades hacen que la fibra sea un elemento que contribuya a la regulación del metabolismo en personas sanas y diabéticas.

El nopal es una planta con alto contenido de fibra dietética, tanto soluble como insoluble. La Tabla 2.4 presenta valores reportados en la literatura. Los niveles son variables, pero se reporta entre 28 y 34% de fibra insoluble, así como de 14 a 20% de soluble, mientras que la fibra dietética total se encuentra del 40 al 50% del peso seco. Entre los elementos principales que se han analizado se encuentran pectinas y mucílagos, en rangos de 5.32-14.19% y 3.78 y 8.5% respectivamente (Pena-Valdivia y Sanchez-Urdaneta, 2006). Estas sustancias han generado interés desde el punto de vista comercial, ya que pueden ser utilizados en la industria de alimentos, suplementos dietarios, farmacéutica y desarrollo de materiales (Goycoolea y Cárdenas, 2003). Las tabletas y

cápsulas de nopal se encuentran en el mercado en México y se comercializan para el control de la obesidad y diabetes (Abraján-Villaseñor, 2008).

En comparación con otros vegetales mexicanos, como el frijol y el apio, el nopal tiene un mayor contenido de fibra dietética total. Sánchez-Castillo *et al.*, (1995) analizaron la cantidad y composición de fibra de una variedad de plantas mexicanas, sin incluir al nopal. El nivel más alto de fibra total encontrado fue para las hojas de apio (31.3% del peso seco), que se encuentra debajo de los valores documentados para el nopal. De acuerdo a los datos reportados por Sánchez-Castillo *et al.*, (1995) y en la Tabla 2.4 el nopal contiene casi dos veces la fibra insoluble de los alimentos típicamente consumidos en la dieta mexicana, siendo los más altos hojas de apio y cáscara de pepino (18.2% y 18.5%), mientras que la fibra soluble del frijol es comparable al nopal (17.5%), comparando los valores en base seca. Estos datos demuestran claramente que el nopal es una excelente fuente de fibra dietética.

Tabla 2.4: Contenido de fibra dietética en nopal

Especie	Insoluble(%)	Soluble(%)	Total(%)
<i>O. sp.</i> ^a	28.45	14.54	42.99
<i>O. ficus-indica</i> var. Redonda ^{b,c}	33.21	18.21	51.42
<i>O. ficus-indica</i> crudo ^d	ND	ND	42.80
<i>O. ficus-indica</i> cocido ^d	ND	ND	41.26
<i>O. ficus indica</i> f. <i>amyloceae</i> ^e	34.58	12.98	51.24
<i>O. ficus indica</i> f. <i>inermis</i> ^e	30.36	8.78	41.83

^aSáenz *et al.*, (2002)

^bRodríguez-García *et al.*, (2007)

^cHarina seca de nopal proveniente de muestras cosechadas a los 60 días

^dCárdenas-Medellín, (1996)

^eAyadi *et al.*, (2009)

2.2. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es el desorden endocrino más común (Sherwood, 2004), siendo un grupo de enfermedades caracterizadas por hiperglucemia. Debido a que las concentraciones de glucosa en la sangre son reguladas por acción de la insulina (Sherwood, 2004), la diabetes resulta de defectos en la secreción y la acción de esta hormona o ambas condiciones a la vez (Mahan y Escott-Stump, 2001). Es un desorden metabólico de etiología múltiple con perturbaciones en la asimilación de carbohidratos, grasas y proteínas (Alberti y Zimmet, 1998).

El término *diabetes* literalmente significa “sifón”, refiriéndose a los abundantes volúmenes de orina que se presentan en esta enfermedad (poliuria), y *mellitus* denota la presencia de glucosa o glucosuria (Sherwood, 2004). Otros síntomas característicos son sed, visión borrosa y pérdida de peso (Alberti y Zimmet, 1998). Además, en formas severas o avanzadas pueden ocurrir complicaciones, tanto agudas, incluyendo cetoacidosis y síndrome osmolar no cetósico (Alberti y Zimmet, 1998), como crónicas, entre las que destacan enfermedades cardiovasculares, retinopatía y neuropatía (Mahan y Escott-Stump, 2001).

Existen predominantemente dos tipos de diabetes: diabetes tipo 1 es aquel en el que los pacientes no producen suficiente insulina debido a procesos autoinmunes o diabetes tipo 2 que se relaciona con resistencia a la insulina (Tuomi, 2005). Entre otras clasificaciones se pueden mencionar diabetes gestacional, la cual puede ocurrir durante el embarazo (Mahan y Escott-Stump, 2001) o como condición secundaria a otros trastornos, tales como: pancreatitis, cirrosis, fibrosis quística del páncreas, insulinomas (tumores del páncreas) o disfunción en otras glándulas (Anderson *et al.*, 1985). DM tipo 1 y 2 son los padecimientos más comunes de esta categoría, y la relación entre estos padecimientos es de 1:9 respectivamente (Klöppel y Clemens, 1996).

La DM tipo 1 o insulino dependiente (DMID) es el resultado de una deficiencia de insulina debido a la falta de secreción en los islotes de Langerhans del páncreas. Esta puede ser de origen inmunológico o estar relacionada con el funcionamiento de otras glándulas, tales como la corteza suprarrenal, la tiroides, la glándula hipófisis anterior u

otras (Escott-Stump, 2005). Es el tipo de diabetes más severo, ya que el paciente requiere inyecciones de insulina durante toda su vida (Lernmark, 1999). Este tipo de diabetes se presenta principalmente en personas menores de 40 años, el inicio es repentino y usualmente se diagnostica al presentarse cetoacidosis y pérdida de peso (Anderson *et al.*, 1985). Dentro de los síntomas más comunes que presentan los pacientes con DM tipo 1 son hiperglucemia, poliuria, polidipsia, baja de peso, deshidratación, trastornos electrolíticos y cetoacidosis (Mahan y Escott-Stump, 2001). Los marcadores de inmunidad que se encuentran en 85-90% de los pacientes que padecen este tipo de DM son auto-anticuerpos de los islotes de Langerhans y de insulina, así como descarboxilasa del ácido glutámico (Alberti y Zimmet, 1998).

La etiología de este padecimiento aún no se entiende completamente, aunque se han identificado tanto susceptibilidad genética, como la relevancia de factores ambientales (Lernmark, 1999). Entre los genes que se han relacionado con la aparición de DM tipo 1 se encuentran los que codifican el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), localizados en el cromosoma 6p21 (Lie *et al.*, 1999). Entre los factores ambientales que desencadenan la enfermedad, dada cierta predisposición genética, se encuentran infecciones por enterovirus (Richer y Horwitz, 2009), consumo de leche de vaca y avitaminosis D (Merriman, 2009).

La DM tipo 2 se presenta con mayor frecuencia, y se caracteriza por ser un desorden tanto de secreción, como de acción de la insulina, presentándose usualmente ambas condiciones a la hora en que se manifiesta clínicamente (Alberti y Zimmet, 1998). Entre los factores de riesgo para esta variante de diabetes se encuentran edad avanzada, obesidad, antecedente familiar de diabetes, historial de diabetes gestacional, alteración en la homeostasis de la glucosa, inactividad física y etnicidad (Mahan y Stump, 2001). Las personas que presentan este tipo de diabetes usualmente no requieren tratamiento de insulina para su supervivencia (Alberti y Zimmet, 1998).

La hiperglucemia en DM tipo 2 se desarrolla de forma gradual, por lo que su diagnóstico temprano se dificulta, ya que no hay manifestación clínica (Mahan y Stump, 2001). Los síntomas que se presentan en los pacientes son variables, e incluyen hiperglucemia, sed excesiva, micción frecuente, polifagia y pérdida de peso (Mahan y

Stump, 2001). Otros signos clínicos característicos son la fatiga, síntomas neurológicos y visión borrosa (Camacho *et al.*, 2003).

El origen de DM tipo 2 se relaciona principalmente con la resistencia a la insulina, el cual es un estado en que el cuerpo no puede utilizar esta hormona, a pesar que es sintetizada por el páncreas (Sherwood, 2004). La sensibilidad de las células a la acción de la insulina se debe a factores genéticos y adquiridos (Saltiel y Kahn, 2001), alterando la secuencia, niveles de expresión o modificación de las proteínas participantes en la vía de señalización de la insulina (Virkamäki *et al.*, 1999). La Tabla 2.5 presenta una comparación entre las características de DM tipo 1 y tipo 2. Se puede observar que la DM tipo 2 puede controlarse sin necesidad de insulina, principalmente mediante el manejo de la dieta, ya que el cuerpo la sintetiza, y su desarrollo es más lento que de tipo 1, además que la DM tipo 1 no está ligada a la obesidad y puede aparecer en la niñez.

Tabla 2.5: Comparación entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2^a

Característica	DM Tipo 1	DM Tipo 2
Nivel de secreción de insulina	Nulo o muy bajo	Puede ser normal o excesiva
Edad típica de aparición	Niñez o juventud	Adulthood
Porcentaje de diabéticos	10-20%	80-90%
Defectos básicos	Destrucción de células β	Resistencia a la insulina
¿Obesidad?	No	Usualmente
Factores	Genéticos y ambientales	Genéticos y ambientales
Rapidez de desarrollo	Rápido	Lento
Cetoacidosis	Común sin tratamiento	Raro
Tratamiento	Insulina, manejo de la dieta, ejercicio	Control de la dieta, reducción de peso, ejercicio, uso de medicamentos hipoglucemiantes

^aSherwood (2004)

2.2.1. Criterios de diagnóstico

Hay diversos métodos para el diagnóstico de DM, incluyendo métodos moleculares, ya que se han identificado genes como PPARG, KCNJ11 y CAPN10 que están involucrados en la patogénesis de DM2 (McCarthy, 2004). La prueba de glucosa plasmática en ayunas (FPG por sus siglas en inglés) es la más recomendada, sin embargo también se utiliza la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) y el análisis de

glucosa plasmática no en ayunas (Mahan y Escott-Stump, 2001), usualmente midiendo dos horas después del consumo de alimentos (Anderson *et al.*, 1985). Aunado a esto, se toma en cuenta la presencia de los síntomas clásicos de diabetes, aunque para individuos propensos asintomáticos no diagnosticados se recomienda realizar pruebas diagnósticas a partir de los 45 años (Mahan y Escott-Stump, 2001).

Se considera que una persona padece diabetes si tiene un valor de glucosa plasmática en ayunas de 126 mg/dL o mayor, glucemia plasmática no en ayuno superior a 200mg/dL ante la existencia de síntomas o más de 200 mg/dL después de la OGTT, para la población en general (Mahan y Escott-Stump, 2001). En la Tabla 2.6 se presentan los diferentes criterios utilizados para diabetes y otras categorías de hiperglucemia.

Tabla 2.6: Criterios de diagnóstico de diabetes mellitus y otras categorías de hiperglucemia ^a

		Concentración de glucosa (mg/dL)		
		Sangre		Plasma
		Venosa	Capilar	Venosa
Diabetes Mellitus:				
	En ayunas	≥ 110	≥ 110	≥ 126
	OGTT	≥ 180	≥ 200	≥ 200
Disminución de tolerancia a la glucosa (IGT)				
	En ayunas	≥ 110	≥ 110	≥ 126
	OGTT	≥ 120	≥ 140	≥ 140
Alteración en glicemia en ayunas (IFG):				
	En ayunas	100 ≤ x < 110	100 ≤ x < 110	100 ≤ x < 126
	OGTT	100 ≤ x < 120	100 ≤ x < 140	100 ≤ x < 140

^aAlberti y Zimmet, (1998)

2.2.2. Aberraciones metabólicas

La insulina y el glucagón son las hormonas que se encargan de regular el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas; la insulina disminuye la concentración de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos en sangre promoviendo su almacenamiento en

las células y el glucagón dirige las rutas metabólicas en la dirección opuesta (Sherwood, 2004). Por esta razón, más que la concentración absoluta de cualquiera de las dos hormonas, la relación entre ellas determina la respuesta del hígado y otros tejidos a un cambio en la concentración de glucosa en la sangre (Gagliardino *et al.*, 2006).

En términos generales, los pacientes diabéticos presentan una disminución en la concentración de insulina o pérdida de sensibilidad a su acción, así como un incremento en la cantidad de glucagón en plasma (Stachura, 1996). Esta descompensación entre la acción de ambas hormonas conlleva a una desregulación del metabolismo con consecuencias en diversos órganos del cuerpo, como se muestra en la Fig. 1.4.

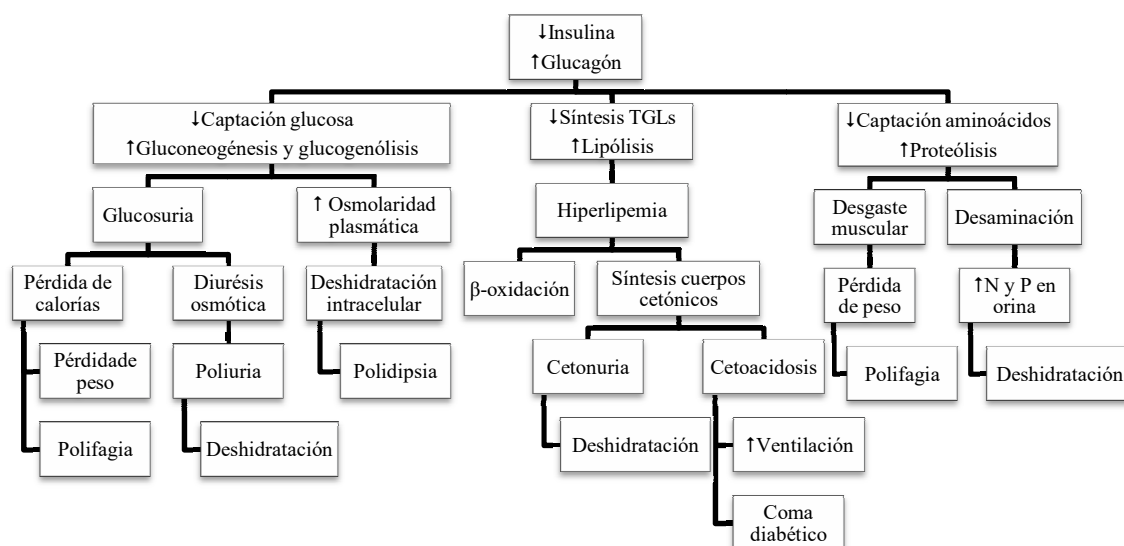


Figura 2.4: Cambios en el metabolismo y consecuencias en la salud. Adaptada de Sherwood, (2004) y Anderson *et al.*, (1985)

Como se muestra en la Figura 2.4, una disminución en la relación insulina/glucagón tiene un efecto negativo en la captación de glucosa, además que un exceso de glucagón promueve la hidrólisis del glucógeno (glucogenólisis) y la síntesis hepática de glucosa (gluconeogénesis), causando hiperglucemia (Frechtel y Lucentini, 2006). Este exceso de glucosa llega a los riñones, y cuando satura la capacidad de los túbulos renales (alrededor

de 160mg/100mL) es excretada en la orina, generando glucosuria y poliuria por requerimiento adicional de agua para su arrastre (Anderson *et al.*, 1985). La eliminación excesiva de agua, electrolitos y nutrientes ocasiona en el paciente sed excesiva (polidipsia) y hambre excesiva (polifagia) (Gagliardino *et al.*, 2006). Si el paciente no es tratado, la saturación de los túbulos renales conlleva a una eventual falla renal (Sherwood, 2004).

Por otro lado, el metabolismo de grasas también se ve afectado por el estado diabético, ya que la insulina activa la lipoproteinlipasa (LPL) para captar los triglicéridos sanguíneos en el tejido adiposo (Gagliardino *et al.*, 2006), y el glucagón promueve la lipólisis, liberando ácidos grasos a la circulación (Frechtel y Lucentini, 2006). Dado a que las células no tienen la posibilidad de obtener energía de la glucosa, estas utilizan los ácidos grasos como sustratos por medio de la β -oxidación, generando cuerpos cetónicos, incluyendo ácido acetoacético, acetona y ácido β -hidroxibutírico, (Anderson *et al.*, 1985). Los cuerpos cetónicos son excretados por la orina (cetonuria) además que provocan náusea y vómito (Frechtel y Lucentini, 2006), lo que ocasiona mayor deshidratación, y aquellos que son volátiles se excretan por el aliento con un olor “frutal” (Sherwood, 2004). Además, la acumulación de cetoácidos en el cuerpo ocasiona acidosis metabólica, bajando el pH sanguíneo y la presión parcial de CO₂ por la utilización de los buffers de carbonato presentes en el organismo (Molitch, 1996). Sin tratamiento, la cetoacidosis puede ocasionar coma diabético e incluso la muerte en cuestión de horas (Sherwood, 2004).

Finalmente, la alteración hormonal también tiene consecuencias en el metabolismo de proteínas, disminuyendo la captación de aminoácidos y favoreciendo la proteólisis de las células musculares (Anderson *et al.*, 1985), ocasionando desgaste muscular, pérdida de peso, retraso en el crecimiento en niños y polifagia (Sherwood, 2004). Los aminoácidos liberados sufren una desaminación para ser utilizados para la obtención de energía. Esto aumenta la síntesis de urea y la excreción de agua que a su vez acarrea potasio. Esto agrava la deshidratación y pérdida de electrolitos (Frechtel y Lucentini, 2006).

Es importante mencionar que no todos los diabéticos presentan todos los efectos mencionados. En diabetes tipo 2 la glucogenólisis y gluconeogénesis no se encuentran

tan gravemente aumentadas como en la DM tipo 1. La síntesis y β -oxidación de ácidos grasos también es menor, por lo que la producción de cuerpos cetónicos no llega a niveles críticos, es decir, no se produce cetosis (Frechtel y Lucentini, 2006).

2.2.3. Secreción de insulina

Como se mencionó anteriormente, la insulina es la hormona encargada de evitar el aumento de la concentración de la glucosa en sangre. Esta, junto con otros péptidos reguladores del metabolismo, es sintetizada en la porción endocrina del páncreas, conocida como los islotes de Langerhans (Gagliardino *et al.*, 2006). Los islotes están formados por clusters de tejido endocrino dispersos en el páncreas exocrino, es decir, que no produce hormonas (Banner-Weir y Smith, 1994). Existen diversos tipos de células que conforman los islotes, siendo las más abundantes las β , representando del 70 al 80% de la masa endocrina del páncreas (Gagliardino *et al.*, 2006). El resto está compuesto principalmente por células α y PP (15-20%) y δ (5%) (Banner-Weir y Smith, 1994). Estos cuatro tipos de células secretan las principales hormonas metabólicas: insulina, glucagón, polipéptido pancreático y somatostatina, respectivamente (Stachura, 1996).

La insulina es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso (RER), siendo traducida del ARNm como un péptido precursor, llamado preproinsulina (Shoelson y Halban, 1994). La preproinsulina está constituida por un péptido señal de alrededor de 25 residuos, es rico en aminoácidos hidrofóbicos, así como las cadenas A (ácida) y B (básica) de la insulina y el péptido conector (Shoelson y Halban, 1994). Una peptidasa elimina al péptido señal, generando proinsulina (9kDa), y posteriormente sufre una digestión enzimática, separando a la insulina (6kDa) y al péptido C. Las cadenas A y B están unidas por puentes disulfuro entre los residuos 7A-7B y 20A-19B (Gagliardino *et al.*, 2006). Esta se almacena en gránulos hasta su liberación (Shoelson y Halban, 1994).

La secreción de insulina está regulada desde varios niveles. Primeramente, la transcripción del gen es modulada por la concentración de nutrientes, como se muestra en la Tabla 2.7, citocinas proinflamatorias (IL-1b, TNF α) y por sí misma (Campillo-Álvarez, 2009). Sin embargo, el principal estimulante de la síntesis y liberación de esta hormona es la glucosa. Una concentración cercana a 100mg/dL provoca una secreción

rápida y breve (monofásica), mientras que de 150 a 200mg/dL ocasiona una respuesta bifásica, es decir lenta y prolongada, ya que la célula β requiere recurrir a la síntesis de insulina (Gagliardino *et al.*, 2006).

Tabla 2.7: Estimulantes de secreción de insulina^a

Familia de compuestos	Ejemplos
Carbohidratos	Glucosa, manosa, gliceraldehído
Aminoácidos	Lisina, leucina, histidina
Ácidos grasos	
Cuerpos cetónicos	
Electrolitos	K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Ba^{2+} , Li^+
Medicamentos	Sulfonilureas, derivados de ác. benzoico

^aGagliardino et al., (2006)

En la liberación de insulina de las células β están involucrados mecanismos celulares dependientes de la polarización de la membrana, interviniendo principalmente el transporte de K^+ y Ca^{2+} al citosol (Campillo-Álvarez, 2009). En la Figura 2.5 se muestra la cadena de eventos generada por la estimulación de la célula. El proceso inicia cuando la célula β percibe un aumento en glucosa por medio del transportador GLUT-2, que se encarga de equilibrar la concentración de ambos lados de la membrana. La glucosa es fosforilada (G6P) para activar su metabolismo, lo que ocasiona un aumento en la relación ATP/ADP en el citoplasma, induciendo la salida de potasio a través de canales (Campillo-Álvarez, 2009). Por otro lado, en la membrana de la célula existen receptores asociados a proteínas G, las cuales activan enzimas como adenilato ciclasa y fosfolipasa C (FLC). La adenilato ciclasa genera cAMP a partir de ATP, y esta molécula a su vez activa la proteinquinasa A (PQA), encargada de estimular los canales de calcio, mientras que la FLC genera diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). DAG estimula la entrada de calcio al citosol activando los canales por medio de la generación de ácido fosfatídico, mientras que IP_3 favorece la salida de calcio del retículo endoplásmico (Gagliardino *et al.*, 2006).

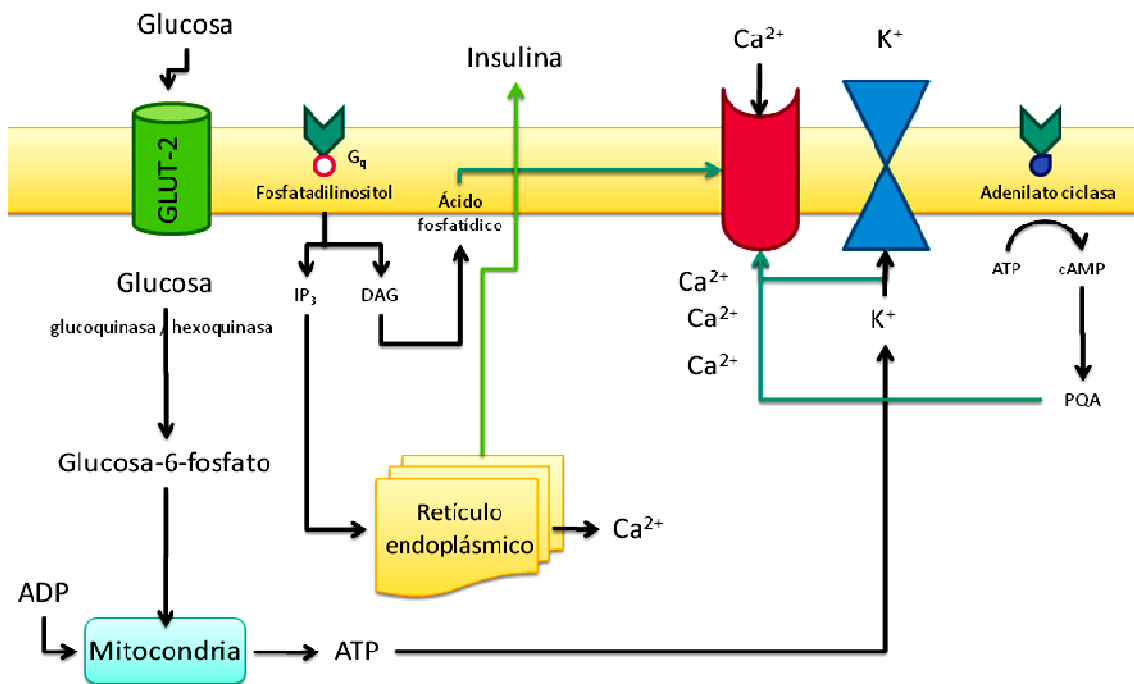


Figura 2.5: Mecanismo de secreción de insulina. Adaptado de Gagliardino *et al.*, (2006)

El movimiento de K^+ hacia afuera de la célula depolariza la membrana, y este cambio de voltaje es compensado al entrar Ca^{2+} al citosol. El aumento de la concentración de calcio también genera un aumento en el complejo Ca^{+2} -calmodulina (Ca^{+2} -CM), el cual activa la vía de fosforilación de proteínas del citoesqueleto (Gagliardino *et al.*, 2006), favoreciendo la fusión de la membrana del gránulo con la membrana celular y su salida al torrente sanguíneo por exocitosis (Campillo-Álvarez, 2009).

2.2.4. Tratamiento

Actualmente no existe cura para la diabetes, sin embargo, hay maneras de normalizar el metabolismo del paciente, por medio de la dieta, ejercicio y/o el uso de medicamentos, como la insulina inyectada o hipoglucemiantes orales (Trejo-González *et al.*, 1996). Los objetivos principales de la terapia son educar al paciente sobre el estilo de vida saludable que debe llevar, alertarlo sobre la posibilidad de complicaciones, normalizar los niveles de glucosa, reducir el riesgo cardiovascular y omitir fármacos que puedan agravar las

alteraciones en el metabolismo (Díaz-Medina y Burguera-González, 2009). Cabe mencionar que, aunque los objetivos son los mismos, el tratamiento para DM1 y DM2 es diferente, debido a las diferencias en la naturaleza de la enfermedad.

Los pacientes de diabetes tipo 1 requieren de insulina exógena de manera obligada, ya que su cuerpo no es capaz de producirla. En el caso de los DM2, la insulina se prescribe cuando existe alguna condición que eleve la concentración de antagonistas de la insulina, terapia nutrimental fallida, falla de o hipersensibilidad a los medicamentos hipoglucemiantes, estilo de vida que afecte los horarios u opciones de alimentación. Existen diferentes tipos de insulina, que varían en la velocidad de inicio del efecto, pico y duración de su acción, como se muestra en la Tabla 2.8 (Thom, 1996).

Tabla 2.8: Tipos de insulina^a

Tipo	Inicio (h)	Pico (h)	Duración (h)
Regular	0.5-1	2-4	6-8
Aspart	0.3	1-3	3-5
Lispro	0.25	1-2	3-5
NPH/Lente	2-4	8-12	12-18
Ultralente	3-5	9-14	18-24
Glargine	1-4	Sin pico	24-30

^aAbu-Lebdeh, (2003)

La dieta es parte importante del tratamiento, aunque en el caso de DM1 es insuficiente (Abu-Lebdeh, 2003), mientras que para DM2 ayuda a combatir el sobrepeso y a normalizar el control metabólico (Díaz-Medina y Burguera-González, 2009). En ambos casos, además de la dieta, se utiliza insulina o medicamentos hipoglucemiantes para un mejor control de la glucosa, además que se enfatiza el uso de dietas individualizadas (Powers, 2003), sin embargo existen algunas recomendaciones en cuanto a los porcentajes de cada tipo de nutriente que deben incluirse en la dieta.

Para pacientes de DM1 la ingesta general debe ser de 10 a 20% proteína, 60 a 70% ácidos grasos monoinsaturados y carbohidratos, asimismo se sugiere consumir ácidos grasos omega 3, y determinar el nivel adecuado de calorías para la edad y condición fisiológica (Escott-Stump, 2002). Si al paciente se le determinó pérdida de peso significativa, poliuria (orina frecuente) y polidipsia, se debe tomar en cuenta al elaborar

la dieta, para recuperar la masa muscular, los depósitos de glucógeno y los de grasa (Powers, 2003).

En el caso de los pacientes de DM2, lo más recomendable es enfocar la dieta para lograr una reducción de peso, ya que se ha reportado que programas orientados a reducir 5-10% de peso de 3 a 4 meses contribuyen a un mejor control de la glucemia e incluso su normalización (Abu-Lebdeh, 2003). La división de la ingesta de alimentos en 4 o 5 comidas también ayuda a reducir la glucemia, ya que permite mayor compatibilidad entre la elevación de glucosa post-prandial (después de tomar el alimento) y la concentración de insulina endógena (Powers, 2003). La recomendación en cuanto al consumo de calorías es entre 35 y 40kcal/kg, dependiendo del nivel de actividad del paciente, mientras que dietas con un muy bajo nivel calórico debe realizarse únicamente bajo supervisión hospitalaria (Escott-Stump, 2002).

Por otro lado, existen varios medicamentos que se utilizan para el control de la glucosa en DM2, ya sea induciendo la secreción de insulina endógena (secretagogos), sensibilizando las células a la acción de la hormona (insulinosensibilizadores) o inhibiendo la α -glucosidasa (Ruiz y Giannaula, 2006). En la Tabla 2.9 se presentan algunas de las características de estos medicamentos.

Tabla 2.9: Medicamentos hipoglucemiantes^a

Mecanismo	Efectos secundarios	Ejemplos
Acción diversa de estímulo en las células β del páncreas.	Hipoglucemia, reacción cutánea, náusea, vómito, retención de agua.	Sulfonilureas y meliglinidas
Inhibición gluconeogénesis, disminución de absorción de glucosa, aumento de sensibilidad a la glucosa.	Anorexia, náuseas, diarrea, acidosis láctica.	Biguanidas, benefluodex y glitazonas.
Inhibición de α -glucosidasa en la mucosa intestinal, retardo en la absorción de carbohidratos.	Flatulencia, diarrea, hipoglucemia en presencia de otros medicamentos.	Acarbosa, migitol.

^aRuiz y Giannaula, (2006)

De particular interés para la línea de investigación que se persigue son los medicamentos secretagogos. Las sulfonilureas (SU), por ejemplo, aumentan la secreción de insulina, siempre y cuando queden suficientes células β funcionales en el páncreas (Hermansen *et al.*, 2008). Estos pueden afectar la secreción de insulina endógena de diversas maneras, incluyendo acción betacitotrófica, aumento de la translocación de GLUT-2, incremento de AMPc e inhibición de la salida de calcio (Ruiz y Giannula, 2006). Sin embargo, además de los efectos secundarios mencionados en la tabla, se ha comprobado que las SU ocasionan aumento de peso y riesgo cardiovascular (Hermansen *et al.*, 2008).

Por esta razón, y en particular porque los derivados del ácido benzoico son estimulantes de insulina (Tabla 2.7), se ha generado interés por buscar compuestos de origen natural que ayuden a incrementar la secreción de insulina, y de esta manera disminuir la hiperglucemia en pacientes con DM2. Shame-McWhorther, (2001) en una revisión documentó la información de diversas plantas utilizadas para el tratamiento de la diabetes, y encontró que plantas como *Gymnema sylvestre* y ginseng tienen actividad secretagoga.

Entre los metabolitos activos del ginseng se encuentran los llamados ginsenósidos. Park *et al.*, (2008) analizaron el efecto de los compuestos Rb1 y Rg1 (20 μ M para ambos compuestos) en internalización de insulina por adipocitos, así como en secreción de esta hormona en insulinoma de ratón. Rg3, el cual inhibe la apoptosis de las células β del páncreas por modulación de la activación de p44/42 MAPK a una concentración 5 μ M (Kim *et al.*, 2010).

La actividad de un extracto de *Gymnema sylvestre* fue analizada *in vitro* con la línea insulinosecretora MIN6 por Liu *et al.*, (2009). Se encontró que concentraciones de 0.25 a 0.5mg/g bs del extracto estimularon a las células secretoras de insulina, manteniendo más de un 90% de viabilidad, la cual decreció al aumentar la concentración, al igual que la actividad.

En ensayos *in vitro* con líneas de células secretoras de insulina (INS-1, MIN6, RIN-5F) se han obtenido resultados de diversos tipos de compuestos activos. Liu *et al.*, (2006)

encontraron que la genisteína de soya estimula la secreción de insulina en presencia de glucosa por medio de la activación de la vía AMPc dependiente a una dosis 5 μ M, y hay actividad desde concentraciones tan bajas como 10nM. El nivel de cAMP inducido por genisteína fue aproximadamente el 33% del resultado logrado con forskolin, un estimulante conocido.

Los polifenoles del té verde: galato de epigallocatequina (EGCG) y galato de epicatequina (ECG) son inhibidores alostéricos de la enzima glutamato dehidrogenasa (Li *et al.*, 2006), la cual interviene en el proceso de generación de ATP en la mitocondria, y su inhibición aumenta la relación ATP/ADP. Estos compuestos reportaron actividad con una ED₅₀ aproximada de 300nM.

También *in vitro* se ha estudiado el efecto de las amidas de ácido ferúlico en la síntesis de insulina (Nomura *et al.*, 2003). Los autores probaron diversos derivados amídicos de este ácido fenólico en la línea celular RIN-5F, obteniendo un aumento de 6 a 8 veces en la secreción de insulina en una concentración de 100 μ M con respecto al control negativo. Además se demostró que el efecto de los sustituyentes es importante, ya que algunos derivados resultaron más activos que otros, ya que el agregar cadenas de 4 a 5 carbonos al ácido ferúlico potenció su actividad, en comparación a aquellos con cadenas más largas o cortas (3-5 veces el aumento con respecto al control negativo). A esto se añade que los compuestos no causaron citotoxicidad notable a los cultivos, ya que se reporta del 85 al 98% de viabilidad.

2.2.5. Evidencia antidiabética del consumo de nopal y extractos del mismo.

El nopal es una de las plantas que se ha utilizado tradicionalmente para el control de glucosa en pacientes diabéticos, propiedad demostrada inicialmente en estudios de la medicina botánica (Santos *et al.*, 2006). Entre las preparaciones populares para el tratamiento de los síntomas de esta enfermedad se encuentran infusiones, jugos y licuados de los cladodios (Cárdenas-Medellín, 1996). En las últimas décadas se han publicado estudios científicos dirigidos a determinar el efecto antidiabético del nopal, sin embargo, no se ha elucidado claramente su mecanismo de acción. Entre los principios activos propuestos se encuentra la fibra dietética, debido a las propiedades descritas

anteriormente. Estudios recientes han analizado tanto al nopal completo como sus extractos como se muestra a continuación.

2.2.5.1. Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* señalan que los componentes de la fibra dietética del nopal, tanto solubles como insolubles, pueden intervenir en dos procesos importantes del desarrollo de la diabetes. Por un lado es un agente hipoglucémico, pero además tiene la capacidad de disminuir la glicosilación de proteínas, que es una de las consecuencias de la hiperglucemia.

Garibay-Bagnis y San Martín-Martínez, (2006) realizaron una prueba de retención de glucosa *in vitro* con fibra de nopal y el jugo de la misma muestra a pH 2 y pH 4 para simular condiciones de digestión. Se encontró que a pH 2 la glucosa retenida fue de 300mg/g muestra seca para la fibra dietética insoluble utilizada como control y 350mg/g para el jugo, mientras que a pH 4 fue de 1125 y 2250 mg/g respectivamente. Como se puede observar, el jugo de nopal tiene una mayor capacidad de retención de glucosa, por lo que se puede asumir que contiene compuestos hipoglucemiantes, y fibra dietética soluble.

Por otro lado, Zhao *et al.* (2007) estudiaron *in vitro* como los polisacáridos (POMC) aislados de *O. monacantha* contribuyen a inhibir la glicosilación no enzimática de proteínas. La mayor actividad inhibitoria se encontró para una concentración de 1.0 mg/mL, aunque a menores concentraciones también se observó un efecto, y este se incrementó con el tiempo, ya que a las 4 semanas fue mayor que para el control positivo (aminoguanidina). El ensayo se realizó utilizando albúmina de suero bovino (50mg/mL) en buffer de fosfatos a pH 7.4 y 37°C. La inhibición de la glicosilación de proteínas por altas concentraciones de glucosa tiene implicaciones favorables en diabetes, ya que los productos finales de glicosilación resultan en alteraciones de la función de las proteínas afectadas. Además se le ha relacionado con las complicaciones micro y macrovasculares (Boeing *et al.*, 2000).

La información que se ha recopilado indica que la fibra juega un papel importante en el efecto antidiabético. Sin embargo, los resultados presentados por Garibay y San

Martín-Martínez, (2006) señalan que también compuestos fitoquímicos hidrosolubles, como son los ácidos fenólicos, pueden intervenir en el proceso. Por otro lado, no se ha estudiado mecanismos celulares que puedan explicar cómo el nopal ayuda al tratamiento de esta enfermedad, por ejemplo, incrementando síntesis de insulina o disminuyendo la resistencia a su acción.

2.2.5.2. Estudios *in vivo*

Uno de los primeros análisis reportados en la literatura es el realizado por Ibañez-Camacho *et al.*, (1983), quienes determinaron el efecto hipoglucemiante de un jarabe de *O. streptacantha* en tres diferentes modelos animales: conejo pancreatectomizado e inducido con aloxano, perro y rata, a una dosis de 5.0 mL/kg peso vivo. En conejos diabéticos no se observaron cambios significativos con respecto al control negativo. En el modelo de perro si se observó una disminución en los niveles de glucosa a partir de los 180min, tomando el tiempo cero como la administración de una dosis de glucosa y el jarabe. En ratas los resultados no demostraron una reducción en los niveles de glucosa para la prueba de tolerancia a la glucosa, aunque se debe tomar en cuenta que estas eran normoglucémicas. Se concluyó que se requieren más estudios para encontrar un modelo animal adecuado para determinar si el efecto del tratamiento sería reproducible en humanos.

El modelo más común para el estudio de efectos antidiabético son las ratas inducidas con estreptozotocina (STZ), una toxina que destruye selectivamente a las células β del páncreas, simulando diabetes tipo 1 (insulinodependiente) (Rees y Alcolado, 2005). Trejo-González *et al.*, (2006) analizaron el efecto de un extracto de *O. ficus-indica* en los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada utlizando este modelo animal. A estos se les administró una dosis oral de 1mg de extracto alcohólico por kg de peso vivo (~10g de nopal), solo o después de 8h de inyectar insulina (3-5U). En el caso del tratamiento combinado se eliminó la insulina a las 8 semanas de tratamiento, pero se continuó con el extracto durante 7 semanas más. Los resultados mostraron que el efecto combinado de la insulina y el extracto ayudaron a normalizar los niveles de glucosa (<130mg/dL) y hemoglobina glicosilada (<10mg/dL) de las ratas diabéticas, incluso después de suspender la insulina.

García-Verdi *et al.*, (1998) estudiaron el efecto hipoglucémico de la variedad *O. ficus-indica* administrado una dosis de 4.28g de nopal/kg diariamente durante 3 semanas como licuado por vía oral en grupos de ratas inducidas con STZ. Se observó que el licuado provocó una reducción del 30% en los niveles de glucosa en sangre, mientras que las ratas tratadas intragástricamente sólo lograron bajar el nivel de azúcar cerca de un 20%.

Es importante tener en cuenta la dosis que se utiliza al estudiar extractos naturales, ya que en altas concentraciones pueden llegar a causar daños secundarios. Este fue el caso reportado por Bwititi *et al.*, (2000). Se indujo diabetes en ratas con STZ y se les administró 20mg/kg (12.7g de nopal fresco por kg) al día de un extracto etanólico de *O. megacantha* durante 5 semanas. El tratamiento logró reducir los niveles de glucosa sin alterar los de insulina, tanto en ratas diabéticas como en normoglucémicas, sin embargo, no se logró llevar el metabolismo de las ratas diabéticas a su nivel basal. Adicionalmente, el consumo del extracto resultó nefrotóxico, reflejado en las concentraciones de creatinina y urea en plasma. Además los autores comentan que el mecanismo de acción del extracto es insulino-independiente, ya que la hiperglucemia disminuyó sin que aumentara la insulina secretada por el páncreas.

Como se presentó anteriormente, uno de los principales componentes del nopal es la fibra dietética, la cual está compuesta de polisacáridos, cuyo su efecto ha sido estudiado *in vitro*. Yang *et al.*, (2008), en un estudio con ratas inducidas con STZ, demostraron que diversas fracciones de un extracto de polisacáridos de *O. monacantha* tuvieron la capacidad de reducir la concentración de glucosa en sangre a un nivel similar al de la dimetilbiguanida, aunque no regresaron a niveles normoglucémicos. En cuanto a los niveles de insulina, no se encontraron diferencias significativas en comparación con el control positivo. En este caso los autores también concluyeron que el extracto tuvo un mecanismo de acción independiente de la secreción de insulina, y posiblemente semejante al de la dimetilbiguanida (metformina). Este medicamento produce efectos fisiológicos que reducen la glucemia en el músculo, donde aumenta la captación de insulina, y en el hígado, donde disminuye la gluconeogénesis de un 25 a un 40%,

mientras que carece de acción directa sobre las células β y no influye en la secreción de insulina (Soriano-Perera y de Pablos-Velasco, 2009).

En la Tabla 2.10 se presenta un resumen de los estudios *in vivo* analizados, en el que se comparan los distintos modelos animales, la especie de nopal utilizada, la manera en que administró, la dosis y los resultados obtenidos por los diversos autores. En la tabla se puede apreciar que los modelos propuestos por Ibañez-Camacho *et al.*, (1983) no son los adecuados para determinar el efecto antihiper glucémico de una sustancia, ya que no se indujo la enfermedad por drogas o por dieta. Las ratas inducidas con STZ son un modelo ampliamente utilizado, y permite observar diferencias significativas entre una rata sana y una diabética, así como analizar el efecto de las sustancias probadas. Por otro lado, el efecto de la dosis es evidente en los estudios presentados. Aquellos realizados con extractos y no con nopal como parte de la dieta produjeron una respuesta más apreciable, aunque únicamente en el caso que se utilizó insulina como parte del tratamiento se logró llegar a un estado cercano al normoglucémico. Cabe mencionar que es importante analizar el tipo de compuestos contenidos en los extractos, ya que en el caso del estudio de Bwititi *et al.* (2000) se detectó toxicidad.

Tabla 2.10: Resumen de los estudios *in vivo* con nopal

Modelo animal	Especie	Tipo de muestra	Dosis ^a	Resultados principales
Conejo sin páncreas ^b + ind. con aloxano Perro anestesiado Rata	<i>Opuntia streptacantha</i>	Jarabe	10g/kg de nopal fresco	-Conejos diabéticos: No hay diferencia significativa -Perro: Reducción de glucosa a nivel basal -Rata: la Reducción no significativa todo el intervalo
Ratas inducidas por estreptozotocina ^c 50mg/kg	<i>Opuntia fuliginosa</i>	Extracto alcohólico	1mg/kg*día + insulina (3-5 U)	Normalización de niveles de glucosa
Ratas no diabéticas ^d	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Nopal fresco o cocido	6 y 12%	-No hubo diferencia significativa
Ratas inducidas con estreptozotocina ^e	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Licuado	4.28g/kg de nopal fresco	-Reducción del 30% en los niveles de glucosa
Ratas inducidas con estreptozotocina ^f 60mg/kg	<i>Opuntia megacantha</i>	Extracto etanólico	12.7g/kg de nopal fresco	-Reducción en niveles de glucosa sin afectar los niveles basales de insulina -Toxicidad en riñón
Ratas inducidas con estreptozotocina ^g 90mg/kg	<i>Opuntia monacantha</i>	Polisacáridos	100, 200 y 300 mg/kg	-Reducción significativa en nivel de azúcar a las 4 sem. -Glucosa similar al control positivo (biguanida) -Sin cambios importantes en los niveles de insulina

^aDosis dadas por kg de peso vivo

^bIbañez-Camacho *et al.*, (1983)

^cTrejo-González *et al.*, (1996)

^dCárdenas-Medellín *et al.*, (1996)

^eGarcía-Verdi *et al.*, (1998)

^fBwititi *et al.*, (2000)

^gYang *et al.*, (2008)

2.2.5.3 Estudios clínicos

El efecto del consumo de nopal en pacientes diabéticos ha sido validado en los últimos 15 años por medio de estudios clínicos, principalmente en México. Castañeda-Andrade *et al.*, (1997) analizaron el efecto hipoglucémico de un dializado de *O. streptacantha* var. *Lemaire* en pacientes adultos de 48 a 69 años de edad. Se dividieron en grupos y a uno de ellos se le administró 250mg del dializado de nopal en cápsulas y a otro un placebo como control negativo, en ambos casos suspendiendo el uso de medicamentos hipoglucémicos y los pacientes ayunaron 12h. Se midió la glucosa cada 60min hasta los 180min. Los resultados demostraron que aunque el dializado si logró reducir los niveles de glucosa alrededor de 60mg/dL con respecto al tiempo inicial, el placebo logró por sí solo un efecto similar (50mg/dL). Con los datos presentados no se pudo comprobar si la reducción de glucosa se debió al dializado o al “efecto placebo”, el cual es la respuesta psicobiológica del organismo ante un tratamiento “falso”, o de control negativo (Benedetti *et al.*, 2005).

A pesar que en algunos de los estudios realizados con nopal no se observó un aumento en la secreción de insulina, hay publicaciones acerca del efecto inductor de insulina de flavonoides provenientes de otras plantas, como los presentados en la sección 2.4. Dado que los estudios con nopal se llevaron a cabo utilizando extractos crudos o nopal entero, se propone en este trabajo probar el efecto inductor de insulina de un extracto hidrolizado de harina de nopal. Por otro lado, se realizará un análisis de harinas de nopal obtenidas de diez variedades de nopal mexicano, enfocado en la cuantificación de compuestos fenólicos e identificación de flavonoides, así como la medición de su actividad antioxidante.

Capítulo III: Materiales y métodos

3.1. Material y reactivos

Material

Se utilizaron 10 diferentes variedades de nopal mexicano (Tabla 3.1). Las muestras, excepto las variedades Santa Emilia y Villanueva, fueron cosechados durante época de primavera de 2008 en Nuevo León, en Montemorelos y la región “El Peñuelo”. Esta última zona se localiza donde confluyen los estados de Nuevo León, Coahuila y San Luis Potosí, México.

Tabla 3.1: Variedades de nopal analizadas

	Nombre común	Nombre científico	Región	Tipo de muestra
OFI-J	Jalpa	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Montemorelos	Cultivada
OL	silvestre Santa Emilia	<i>Opuntia lindheimeri</i>	Montemorelos	Silvestre
OR-G	Gavia	<i>Opuntia robusta</i>	El Peñuelo	Cultivada
OS	Cardón	<i>Opuntia streptacantha</i>	El Peñuelo	Silvestre
OU	Oreja de elefante	<i>Opuntia undulata</i>	Montemorelos	Cultivada
OR-R	Rastrero	<i>Opuntia rastrera</i>	El Peñuelo	Silvestre
OR-T	Tapón	<i>Opuntia robusta</i>	El Peñuelo	Silvestre
OL-D	Duraznillo	<i>Opuntia leucotricha</i>	El Peñuelo	Silvestre
NC	Santa Emilia	<i>Nopalea cochenillifera</i>	Montemorelos	Cultivada
OFI-V	Villanueva	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Montemorelos	Cultivada

Después de la cosecha las muestras se sanitizaron en agua con cloro (200-400 ppm) durante 10 minutos. Posteriormente se cortaron en tiras o en hojuelas, incluyendo las espinas y se procedió al secado en charolas. Este proceso se llevó a cabo en un secador con aire a 60°C hasta llegar a un 8% de humedad, lo cual tomó de 8 a 9h. Finalmente, las muestras fueron molidas finamente para obtener la harina.

Reactivos

Grado reactivo. Éter de petróleo, ácido sulfúrico, sulfato de cobre, hidróxido de sodio, ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido clorhídrico 0.2N, glicerina, etanol 96%, Celite 545, acetona, metanol, fenolftaleína (DEQ, Monterrey). Sulfato de potasio, indicador mixto, D(+)-glucosa (Merck, Darmstadt). MES hidratado, Trizma base, reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, fluoresceína sal sódica, 2,2'-Azobis(2-

metilpropionamidina) dihidrocloruro, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), l-leucina, ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich, St. Louis), tartrato de sodio y potasio (Jalkmek Científica, San Nicolás de los Garza).

Grado HPLC. Metanol, agua (Honeywell, Morristown). Ácido fórmico, kaempferol, quercetina (Sigma-Aldrich, St. Louis).

Grado cultivo celular. D-MEM alta glucosa (25mM), D-MEM libre de glucosa, tripsina al 0.05% (Invitrogen, Carlsbad). Suero bovino fetal, buffer salino de fosfatos, Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER) (Thermo Scientific, Waltham). Glibenclamida (Laboratorios Silanes, Toluca).

3.2. Caracterización de la materia prima

3.2.1. Estimación del índice de madurez

De acuerdo a la norma mexicana NMX-FF068-SCFI-2006, el estado de madurez del nopal para consumo humano como verdura se determina a través de parámetros físicos. Según la norma, se considera apto para consumo humano el nopal tierno o brote (cladodio joven de 7cm de longitud en adelante que presentan cutícula delgada y el color característico de la variedad).

Dado que las muestras utilizadas en el presente estudio se obtuvieron en forma de harina, se buscó un método alternativo para la estimación de estado de madurez, basado en la cantidad de azúcares solubles y la acidez titulable. El índice se calculó de acuerdo a la ecuación 2.2, expresado como mg de glucosa/g de ácido málico, mayor grado de madurez indicado por una mayor relación.

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\text{azúcares solubles}}{\text{acidez titulable}} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

3.2.1.1. Cuantificación de azúcares solubles

Para la determinación de azúcares se realizó una extracción a partir de 200mg de harina de nopal con 1mL de una solución de etanol al 80% v/v en agua. Las muestras se

agitaron en un vortex (VX100, Labnet International, Edison, N.J.) durante 15 minutos y se realizó la extracción durante la noche con agitación a 160 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Posteriormente se agregaron 600µL de agua destilada y se mezclaron en el vortex por 10 minutos. Finalmente se centrifugaron (Galaxy 16DH, VWR, Westchester, P.A.) las muestras a 11000g durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para la medición se utilizó la metodología del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). El reactivo DNS al 5% m/v se preparó con 5g de ácido dinitrosalicílico, 50mL de hidróxido de sodio 4M, 150g de tartrato de sodio y potasio, aforando a un volumen total de 500mL con agua destilada. La curva de calibración se preparó con glucosa (0.25 a 2mM). Para la curva se tomaron 6mL de solución y de agua destilada como blanco, mientras que de muestra se procesaron 1.5mL, añadiendo el volumen respectivo de DNS para trabajar en relación 3:1. Las muestras se colocaron en baño maría a 100°C durante 5 minutos, y se atemperaron rápidamente en agua fría antes de medir densidad óptica a 540nm en un espectrofotómetro (Genesys 10uv, Thermo Scientific, Waltham, M.A.). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de glucosa por gramo de muestra en base seca.

3.2.1.2. *Determinación de acidez titulable*

La acidez titulable se realizó siguiendo el método 942.12 de la AOAC (1998) de titulación con hidróxido de sodio hasta pH 8.2, utilizando fenolftaleína como indicador. Se pesaron 1.2001g de harina y se agregaron 12mL de agua, agitando en un vortex (Vortex Mixer, Labnet International, Edison, N.J.) para obtener una suspensión. La muestra se centrifugó (Centra MP4R, International Equipment Company, Chattanooga, TN) a 4000 rpm durante 5 minutos y se tomó el sobrenadante para realizar la titulación, previa a la cual se determinó el pH con un potenciómetro (Orion 3 Star, Thermo Scientific, Waltham, M.A.). Los resultados se expresaron como gramos equivalentes de ácido málico por 100 gramos de muestra seca (g ác. málico/100g).

3.2.2. Análisis bromatológico

El análisis bromatológico se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC (1998). Los contenidos de humedad y cenizas se determinaron por gravimetría de acuerdo a los métodos AOAC 925.09 y 923.03. El extracto etéreo se obtuvo con éter de petróleo en un equipo Goldfish (AOAC 920.39). La proteína cruda se determinó por el método micro Kjeldahl (AOAC 978.02), utilizando el factor de conversión $N \times 6.25$ mientras que el contenido de fibra cruda se estimó por el método AOAC 962.09. Finalmente, el extracto libre de nitrógeno (ELN), que da una indicación de los carbohidratos no fibrosos, se calculó por diferencia entre el 100% y la sumatoria de los demás porcentajes.

3.2.3. Caracterización de fibra dietética

La caracterización de fibra dietética soluble e insoluble se realizó utilizando un kit comercial (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow) el cual está basado en el método 991.43 de la AOAC (1998). La Figura 3.1 resume el diagrama de flujo del proceso. Con cada muestra analizada se procesó un blanco, al cual se le añadieron todos los reactivos utilizados sin muestra.

Para calcular, ya sea la fibra dietética soluble o la insoluble, se utilizó la Ecuación 3.1:

$$\%Fibra\ dietética = \left(\frac{R - p - A - B}{m} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (3.1)}$$

donde

R = peso del crisol Gooch con el residuo – peso del crisol Gooch vacío

p = gramos de proteína del residuo

A = gramos de ceniza del residuo

B = residuo del blanco

m = peso de la muestra

La fibra dietética total se calcula como la suma de la fibra insoluble más la fibra soluble.

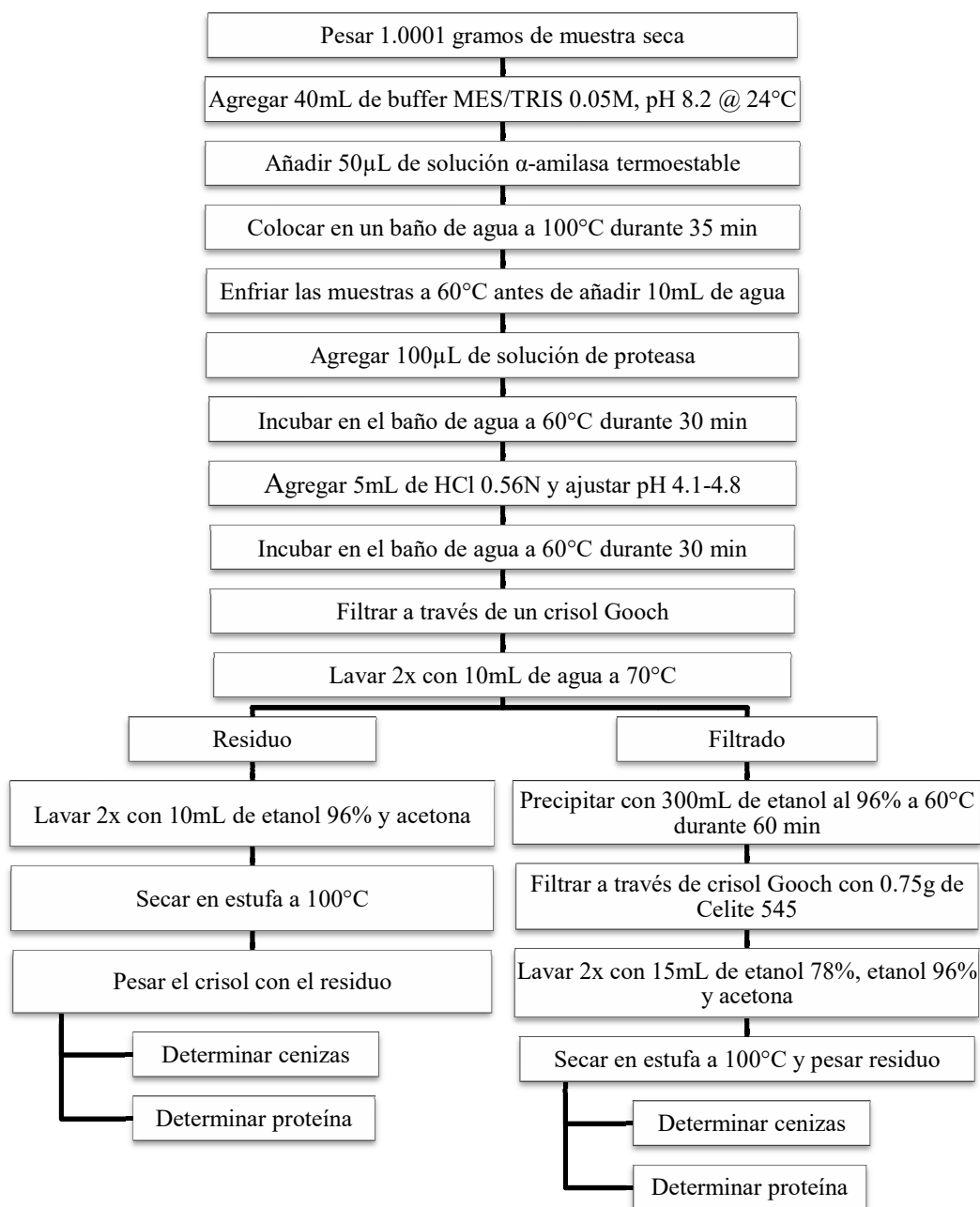


Figura 3.1: Procedimiento para determinación de fibra dietética total (Megazyme International Ireland Ltd., 2005).

3.3. Extracción de compuestos solubles en metanol

La extracción de los compuestos fitoquímicos de cada variedad de nopal se realizó utilizando 20 mL de metanol al 80% por cada 2.0001g de harina. Las muestras se extrajeron a temperatura ambiente y con agitación a 150 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) durante 3 horas. El extracto obtenido se centrifugó (Centra MP4R, International Equipment Company, Chattanooga, TN) a 3000 rpm durante 10 minutos, se colectó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

3.4. Análisis fitoquímicos de los extractos

3.4.1. Cuantificación de fenólicos libres

La cuantificación de los compuestos fenólicos libres se realizó por el método de Folin-Ciocalteau (Vinson *et al.*, 2001). Se colocaron 20µL/pozo de los extractos en placas transparentes de 96 pozos. A cada muestra se añadieron 200µL del reactivo de Folin-Ciocalteau (dilución 1:9 en agua destilada). El estándar utilizado fue ácido gálico. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se leyó la absorbancia a 750nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, V.M.). Los resultados se expresaron como µg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (µg EAG/g).

3.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)

La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos fue realizada por el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), reportado por Prior *et al.*, (2003) con algunas modificaciones. Antes de cada ensayo se prepararon las soluciones de trabajo de fluoresceína y 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH). Se disolvieron 13.29 mg de fluoresceína en 100mL de *buffer* de fosfatos 75mM, pH 7.4, obteniendo una solución *stock* de concentración 0.4mM, que se almacenó a -80°C en ausencia de luz hasta su uso. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 en PBS (*Stock* 2, 4µM) que pudo almacenarse a 4°C. Finalmente, la solución de trabajo se preparó haciendo una dilución 1:40 del *Stock* 2 (0.1µM) en PBS, para un volumen final de 25mL, la cual se usó al momento. La solución de AAPH se preparó disolviendo 207 mg de

AAPH en 5mL de PBS (153mM). Para el ensayo se utilizaron microplacas negras de 96 pozos para medir fluorescencia a 37°C. Se colocan 25µL de muestra, blanco o estándar de Trolox (25-100µM) en cada pozo. La placa se colocó en el lector de microplatos (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, V.M.), así como las soluciones en los inyectores del mismo. Se agregaron 150µL de fluoresceína 0.1µM en cada pozo y se incubó la placa a 37°C durante 30min. A continuación se inyectaron 25µL de la solución de AAPH en cada pozo y se midió la fluorescencia cada 2min durante 1h. Los resultados se reportaron como µmoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca (µmol ET/g).

3.4.3. Hidrólisis de los extractos

Para la identificación de los flavonoides contenidos en los extractos metanólicos de cada una de las variedades de nopal, se realizó una hidrólisis previa a su análisis. Se decidió trabajar en condiciones ácidas y con calor, ya que se ha reportado como un método eficiente para la hidrólisis de flavonoides en matrices vegetales (Nuutila *et al.*, 2002). Se extrajeron los metabolitos con metanol al 80% a las mismas condiciones que las descritas en la sección 2.3. Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis agregando 600µL de ácido clorhídrico 3.2M, para tener una solución de metanol al 50% y HCl 1.2M, a 85°C (Nuutila *et al.*, 2002). Con el propósito de analizar la cinética del proceso, se tomó muestra a los 0, 20, 40, 60, 120 y 240 minutos. Como modelos para la cinética de hidrólisis se utilizaron las variedades *O. ficus-indica* var. *Jalpa* y *O. robusta* var. *Gavia*.

Una vez atemperadas las muestras, se hicieron pasar por una columna de extracción en fase sólida C₁₈-Aq (Grace, Deerfield, I.L.). La Figura 3.2 muestra la metodología utilizada, indicando cada uno de los solventes utilizados para la elución de las fracciones. La fracción de interés que se analizó es aquella obtenida con metanol al 100%. Esta se lavó con hexano para eliminar impurezas poco solubles en metanol, para posteriormente concentrarla a sequedad y resuspender en 250µL de metanol grado HPLC.

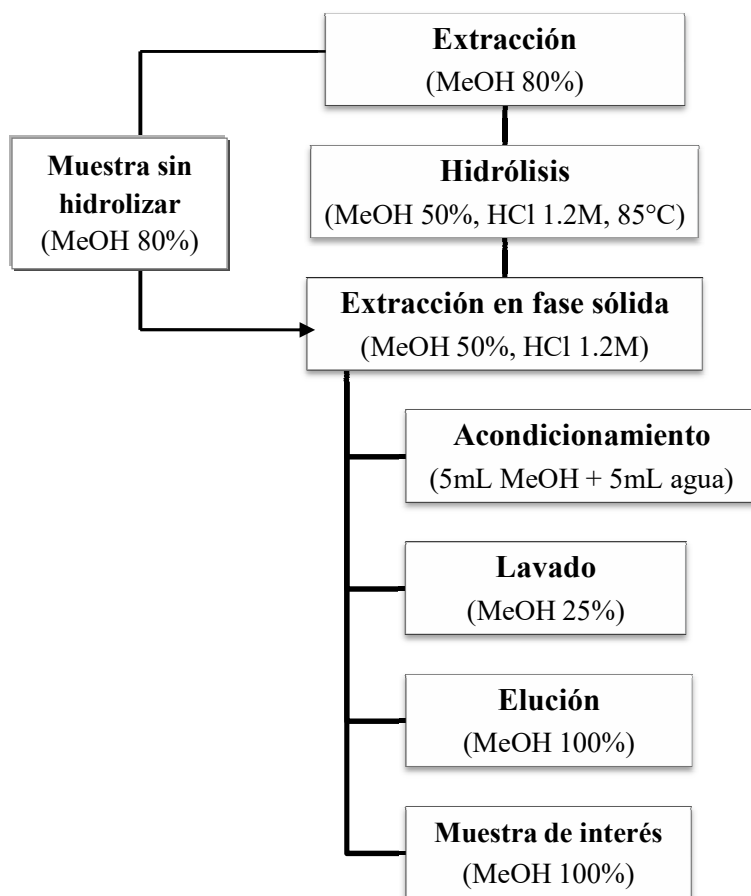


Figura 3.2: Hidrólisis y obtención de la fracción de interés

3.4.4. Detección de compuestos por HPLC-PDA

Los extractos crudos e hidrolizados se analizaron por cromatografía líquida de alta presión con un detector de arreglo de fotodiodos a 365nm (HPLC-PDA), ya que se ha determinado que los flavonoles reportados previamente en nopal absorben en una región cercana a esta longitud de onda, como se muestra en la Tabla 3.2. El equipo utilizado fue un cromatógrafo modular (1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, C.A.) con degasificador (G1379A), bomba binaria (G1312A), automuestreador (G1329A), termostato (G1330B) y módulo de columna (G1316A), y el módulo detector de arreglo de diodos (1200 Series G1315D, Agilent, Technologies, Santa Clara, C.A.).

Tabla 3.2: Espectros de absorción reportados^a

Flavonol	λ_{max} de absorción
Quercetina	258, 375 (EtOH)
Kaempferol	265, 365 (MeOH)

^aChapman and Hall, (2010)

De los extractos crudo e hidrolizado se inyectaron 2 μ L, a un flujo de 0.4mL/min con el gradiente presentado en la Tabla 3.3. La columna utilizada fue Nova-Pak C18, 3.9x150mm, 35 μ m (Waters Corporation, Milford, M.A.). Los solventes utilizados como fase móvil fueron agua con 0.1% ácido fórmico (A) y metanol (B), ambos grado HPLC. Para la identificación de los compuestos se contó con estándares de quercetina y kaempferol.

Tabla 3.3: Gradiente utilizando para la separación

Tiempo (min)	% B (Metanol)
0	40
15	60
20	60
25	90

3.5. Bioensayo de síntesis de insulina

Para establecer la efectividad de los extractos como estimulantes de las células secretoras de insulina *in vitro* se utilizó la línea celular RIN-5F (ATCC, Manassas, V.A.). Esta es una línea de células adherentes de nivel de bioseguridad 1, caracterizada por secretar insulina y producir L-dopa-carboxilasa, mientras que no produce somatostatina (ATCC, 2010).

3.5.1. Mantenimiento de las células

Las células se cultivaron en medio D-MEM de alta glucosa (25mM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) en botellas para cultivo de 25cm² y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El medio se renovó cada tercer día, y al llegar a confluencia se

desprendieron las células con una solución de tripsina al 0.05% y 0.004% EDTA y se realizaron los pases a botellas de cultivo de 75cm².

3.5.2. Bioensayo de estimulación de insulina

El bioensayo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Koeck *et al.*, (2009) con algunas modificaciones. En placas de 24 pozos se colocaron 160,000 células en cada pozo, suspendidas en 1.25mL de medio D-MEM 5mM de glucosa, sin SBF y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante al menos 12h para propiciar que las células se adhieran al fondo de la placa. En seis de los pozos de la placa se colocó únicamente medio como blanco, el cual se cambió de acuerdo al procedimiento realizado en los pozos con células.

Una vez adheridas las células, se cambió el medio por D-MEM 11mM de glucosa, sin SBF y se incubaron a las mismas condiciones durante 24h. Al cabo de este tiempo, se lavaron las células con D-MEM libre de glucosa, y se incubaron en este durante 30 min. Posteriormente se cambió el medio libre de glucosa por D-MEM 11mM de glucosa con los extractos a probar o los controles. En la Tabla 3.4 se presentan los controles utilizados en el ensayo, y se seleccionó la variedad *O. robusta* var. *Gavia* hidrolizada 20 minutos para probar en el bioensayo basada en su contenido del flavonoide predominante. La concentración del extracto en la placa fue de 10µg equivalentes de kaempferol/mL. Se incubaron las placas nuevamente durante 90 min, al cabo de los cuales se tomaron 500µL de muestra del sobrenadante. El resto del medio se removió, se lavaron las células con PBS y se añadieron 200µL del buffer de lisis M-PER, agitando a 150 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez lisadas las células, se determinó el contenido de proteína por medio del kit comercial para el ensayo BCA (Thermo Scientific, Waltham, M.A.) en placas de 96 pozos, leyendo absorbancia a 550nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, V.M.).

Tabla 3.4: Controles utilizados en el bioensayo

Tipo de control	Sustancia
Normoglicémico	D-MEM con glucosa 5mM
Positivo	D-MEM con glucosa 11mM + glibenclamida 200 μ M
Positivo	D-MEM con glucosa 11mM + l-leucina 50mM
Negativo	D-MEM con glucosa 11mM

3.5.3. Cuantificación de insulina

La cuantificación de insulina se realizó por medio del kit comercial para ELISA (ALPCO, Salem, N.H.). Se colocaron 25 μ L de muestra o estándar de insulina (0-1ng/mL) en las placas para ELISA de 96 pozos y 75 μ L del conjugado. Las placas se incubaron durante 2h en agitación a 800 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó seis veces cada pozo con 300 μ L de buffer de lavado, antes de añadir 100 μ L de sustrato TMB. Se incubaron las placas nuevamente durante 30 min a las mismas condiciones, y al finalizar, se agregaron 100 μ L de solución *Stop*. Se leyó la absorbancia a 450nm en un lector de microplatos (ELx800, Biotek, Winooski, V.M.). Los resultados se reportaron como porcentaje de inducción de insulina con respecto al nivel basal (5mM), calculados de acuerdo a la ecuación 3.3:

$$\%Inducción = \frac{\frac{ng \text{ de insulina}}{\mu g \text{ de proteína}}_{Inducido}}{\frac{ng \text{ de insulina}}{\mu g \text{ de proteína}}_{Basal}} * 100 \quad \text{Ec. (3.3)}$$

3.6. Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado en cada ensayo, y los resultados se expresaron como la media de las mediciones \pm desviación estándar. Se analizaron los datos por la metodología de ANOVA, y se realizó la comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia $p < 0.05$. Se utilizó el software Minitab® 14.1 para todos los análisis estadísticos.

Capítulo IV: Resultados y discusión

4.1. Caracterización de la materia prima

4.1.1. Estimación del índice de madurez

Debido a que el contenido de los diversos componentes de las plantas se ven afectados por el grado de maduración, se consideró necesario determinar el índice de madurez especialmente debido a que las muestras se proporcionaron molidas. El método oficial para determinar el índice de madurez del nopal según la norma mexicana es mediante la estimación del tamaño del cladodio. Dada esta limitante, el estado de madurez de las nopales estudiados se estimó relacionando concentración de azúcares reductores y acidez titulable.

Los resultados obtenidos para estos parámetros, así como para el pH se resumen en la Tabla 4.1. La cantidad de azúcares reductores fue variable en un rango de 27.63 ± 4.00 mgEG/g (*O. robusta* var. *Tapón*: OR-T) hasta 76.09 ± 1.33 mgEG/g. Las muestras pertenecientes al mismo genotipo presentaron concentración de azúcares similares (*O. ficus-indica* var. *Jalpa* (OFI-J) con 45.405 ± 0.396 mgEG/g y *Villanueva* (OFI-V) con 50.92 ± 1.66 mgEG/g). Un efecto similar se observó para las variedades de *O. robusta* (OR-G) variedad *Gavia* (28.27 ± 3.76 mgEG/g) y *Tapón* (OR-T) (27.64 ± 4.00 mgEG/g).

La acidez titulable varió desde 41.40 ± 3.42 gEAM/100g para *O. rastera* (OR-R) hasta 186.87 ± 0.13 gEAM/100g para *O. ficus-indica* var. *Jalpa*. Entre el mismo genotipo se encontraron diferencias significativas, presentando *Jalpa* (186.87 ± 0.13 gEAM/100g) mayor acidez que *Villanueva* (122.98 gEAM/100g ± 11.12) y *Gavia* (49.17 ± 0.04 gEAM/100g) menor que *Tapón*. Estas diferencias están relacionadas al estado de madurez de las muestras, ya que entre menor sea el grado de madurez, mayor es el contenido de acidez. Se expresaron los valores de acidez basado en ácido málico ya que es el predominante en el nopal (Stintzing y Carle, 2005).

Por su parte, el pH varió en un rango de 4.32 ± 0.01 a 4.94 ± 0.03 en función de la acidez titulable que presentaron las muestras. El pH se encontró un poco más elevado que lo

reportado por Rodríguez-García *et al.*, (2007), quienes documentaron un rango que va de 4.07 ± 0.30 a 4.35 ± 0.20 , sin estar en función de la madurez.

Como se puede observar en la Tabla 4.1, existieron diferencias significativas entre las variedades, ya que los índices variaron de 21.96 ± 2.30 a 67.71 ± 9.54 mgEG/gEAM. Las muestras con mayor grado de madurez fueron *O. undulata* (OU) y *O. rastrera* (OR-R), mientras que aquellas que mostraron menor madurez fueron *O. lindheimeri* (OL) y *O. ficus-indica* var. *Jalpa* (OFI-J). Cabe mencionar que las variedades del mismo genotipo se encontraban en estado de madurez diferente, siendo *O. ficus-indica* var. *Jalpa* (24.30 ± 0.19) y *O. robusta* var. *Tapón* (OR-T) (41.65 ± 0.52) menos maduras que sus contrapartes, *Villanueva* (OFI-V) (41.65 ± 5.11) y *Gavia* (OR-G) (57.49 ± 7.60), respectivamente.

Tabla 4.1: Estimación del índice de madurez[Ⓜ]

Variedad	Azúcares reductores mg EG/g [Ⓟ]	Acidez titulable g EAM/100g [Ⓠ]	pH	Índice de madurez mg EG/g EAM [Ⓡ]
OFI-J	$45.40 \pm 0.40^{b,c}$	186.87 ± 0.13^a	$4.51 \pm 0.04^{c,d}$	24.30 ± 0.19^d
OL	32.68 ± 5.81^c	142.85 ± 10.16^c	4.40 ± 0.01^d	21.96 ± 3.40^d
OR-G	28.27 ± 3.76^c	49.17 ± 0.04^f	4.83 ± 0.04^b	$57.49 \pm 7.60^{a,b}$
OS	35.90 ± 2.54^c	67.88 ± 4.86^e	4.83 ± 0.01^b	$53.20 \pm 6.86^{b,c}$
OU	76.58 ± 6.31^a	122.83 ± 5.66^d	4.46 ± 0.02^d	$62.27 \pm 9.54^{a,b}$
OR-R	27.87 ± 1.67^c	41.40 ± 3.42^f	4.91 ± 0.05^a	67.71 ± 9.54^a
OR-T	27.64 ± 4.00^c	66.42 ± 10.44^c	4.94 ± 0.03^a	41.65 ± 0.52^c
OL-D	30.10 ± 2.15^c	$56.58 \pm 2.87^{c,f}$	$4.88 \pm 0.05^{a,b}$	$52.66 \pm 6.99^{b,c}$
OFI-V	50.92 ± 1.66^b	122.98 ± 11.12^d	4.59 ± 0.00^c	41.65 ± 5.11^c
NC	76.09 ± 1.33^a	158.20 ± 7.46^b	4.32 ± 0.01^c	$48.17 \pm 3.11^{b,c}$

[Ⓜ] Letras iguales en la misma columna indican valores estadísticamente similares

[Ⓟ] Valores reportados como mg equivalentes de glucosa (EG) por gramo de muestra seca

[Ⓠ] Valores reportados como gramos equivalentes de ácido málico (EAM) por 100 gramos de muestra seca

[Ⓡ] Valores reportados como mg equivalentes de glucosa por gramo de ácido málico

4.1.2. Análisis bromatológico

Las composiciones proximales en base seca de las diez variedades de harina de nopal mexicano se presentan en la Tabla 4.2. Se encontraron diferencias en el contenido de

grasa cruda. *O. rastrera* (OR-R) contuvo más del doble que cualquiera de las otras variedades estudiadas ($6.05 \pm 0.14\%$). Este valor se encuentra un poco por encima de los valores reportados en la literatura (Tabla 1.2). Las variedades del mismo genotipo exhibieron un porcentaje de grasas estadísticamente similar.

En el caso de proteína cruda, la variedad *Villanueva* (OFI-V) mostró la mayor cantidad ($14.70 \pm 1.04\%$) comparada con el resto de las variedades, que tuvieron menos de 6.0% de proteína. Las variedades del mismo genotipo exhibieron niveles estadísticamente diferentes de proteína cruda, siendo mayor para *Villanueva* ($14.70 \pm 1.04\%$) y *Gavia* (OR-G) (4.35 ± 0.24) que para sus contrapartes, *Jalpa* (OFI-J) ($3.25 \pm 0.35\%$) y *Tapón* (OR-T) ($4.35 \pm 0.24\%$). Cabe mencionar que las variedades de *O. robusta* fueron además cultivadas en distintas regiones. No se encontró correlación con respecto al índice de madurez.

Tabla 4.2: Análisis bromatológico de 10 variedades de nopal mexicano^{*}

Variedad	Grasa cruda (%)	Cenizas (%)	Proteína cruda (%)	Fibra cruda (%)	ELN (%)
OFI-J	2.53 ± 0.32^b	21.08 ± 0.62^d	3.25 ± 0.35^d	16.93 ± 0.07^a	56.46 ± 0.21^c
OL	1.76 ± 0.40^b	$22.79 \pm 0.14^{a,b}$	$5.80 \pm 0.11^{b,c}$	10.51 ± 0.76^c	59.05 ± 1.40^b
OR-G	1.28 ± 0.22^c	19.81 ± 0.61^c	2.48 ± 0.11^d	$11.20 \pm 1.33^{b,c}$	65.82 ± 1.18^a
OS	1.81 ± 0.01^b	23.08 ± 0.28^a	4.16 ± 0.30^c	12.55 ± 1.55^b	58.01 ± 1.69^b
OU	1.52 ± 0.20^c	$21.22 \pm 0.56^{c,d}$	6.00 ± 0.33^b	$11.50 \pm 0.54^{b,c}$	59.89 ± 0.79^b
OR-R	6.05 ± 0.14^a	22.75 ± 0.19^b	2.74 ± 0.18^d	8.07 ± 0.34^d	60.53 ± 0.47^b
OR-T	1.24 ± 0.16^c	19.81 ± 0.01^c	4.35 ± 0.24^c	10.75 ± 0.39^c	63.53 ± 0.53^a
OL-D	1.87 ± 0.02^b	17.61 ± 0.21^f	$3.78 \pm 0.16^{c,d}$	$12.01 \pm 0.84^{b,c}$	64.85 ± 0.83^a
OFI-V	2.29 ± 0.05^b	21.86 ± 0.07^c	14.70 ± 1.04^a	5.78 ± 0.22^e	55.36 ± 0.15^c
NC	1.50 ± 0.50^c	23.86 ± 0.07^a	3.34 ± 0.27^d	5.43 ± 0.03^e	65.55 ± 0.27^a

^{*} Letras iguales en la misma columna indican valores estadísticamente similares

^{*} Porcentajes reportados en base seca

Por otro lado, los valores de fibra cruda para *O. ficus-indica* var. *Villanueva* (OFI-V) ($5.78 \pm 0.22\%$) y *N. cochenillifera* var. *Santa Emilia* (NC) ($5.43 \pm 0.03\%$) se encuentran por debajo de lo reportado. En este punto se observaron también diferencias intervarietales para aquellas muestras del mismo genotipo, siendo el contenido mayor para *Jalpa* (OFI-J) ($16.93 \pm 0.07\%$) que para *Villanueva*. En el caso de las variedades de *O. robusta* el valor fue estadísticamente similar.

Un punto importante a considerar es que la cuantificación de fibra cruda no es el indicador más apropiado para el nopal, debido a su alto contenido de fibra soluble que no es cuantificado con el protocolo de fibra cruda. El tratamiento ácido utilizado para la determinación de fibra cruda hidroliza a los componentes de la fibra soluble, como mucílagos y pectinas, mientras que el alcalino ataca parte de la celulosa y lignina, sin embargo, esta prueba no da una idea sobre el tipo de carbohidratos estructurales de la matriz (Norman, 1935). No hay reportes previos en la literatura correlacionando la fibra cruda con los componentes tanto de fibra soluble e insoluble, ni qué porcentaje de los mismos se pierden.

La materia hidrolizada se cuantifica dentro del extracto libre de nitrógeno, el cual contiene los carbohidratos fibrosos que no determina la prueba de fibra cruda así como los no fibrosos. Para diferenciar entre ambos tipos de carbohidratos, se requiere de la cuantificación de fibra dietética, ya que permite cuantificar tanto la insoluble como la soluble.

4.1.3. Caracterización de fibra dietética

Los porcentajes de fibra dietética insoluble (FDI), soluble (FDS) y total (FDT) obtenidos para cada variedad se muestran en la Tabla 3.2. Se puede observar que en los tres casos existen diferencias significativas entre las distintas muestras manejadas, sin embargo, son menos marcadas en el caso de FDI, donde el rango fluctuó de 37.17 a 47.61%, mientras que en FDS los valores fluctuaron entre 8.63 y 31.45%.

Se puede observar que la fibra insoluble es mayor que la fibra cruda reportada en la Tabla 3.2, y esto se debe a que parte de la celulosa y lignina se pierden por los tratamientos utilizados en la determinación, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, la fibra dietética total es mayor que el extracto libre de nitrógeno, ya que FDT incluye además a la fibra cruda. Al realizar la suma de FDT más los porcentajes de proteína, cenizas y grasas no se obtiene el 100%, lo que indica que hay otros componentes que forman parte del extracto libre de nitrógeno, y que no son identificables por los métodos del análisis bromatológicos, por ejemplo los azúcares.

Tabla 4.3: Contenido de fibra dietética total en 10 variedades de nopal mexicano^{*,*}

Variedad	FDI (%)	FDS (%)	FDT (%)
OFI-J	37.17±1.88 ^e	24.65±0.33 ^b	61.36±0.01 ^b
OL	39.43±0.74 ^d	31.45±1.46 ^a	70.04±0.59 ^a
OR-G	47.61±0.70 ^a	11.36±0.13 ^d	58.98±0.83 ^c
OS	42.04±0.92 ^c	26.27±0.95 ^b	69.10±0.63 ^a
OU	44.61±0.11 ^{a,b}	11.82±0.18 ^d	56.43±0.06 ^d
OR-R	44.76±2.49 ^b	11.05±1.07 ^d	53.74±0.49 ^e
OR-T	40.35±1.16 ^{c,d}	31.16±1.67 ^a	70.30±1.83 ^a
OL-D	46.05±0.70 ^{a,b}	8.63±0.16 ^e	54.92±0.71 ^d
OFI-V	40.46±0.27 ^{c,d}	13.73±0.68 ^c	53.61±0.41 ^e
NC	39.97±0.76 ^{c,d}	15.56±0.26 ^c	55.53±0.50 ^d

* Letras iguales en la misma columna indican valores estadísticamente similares

* Porcentajes expresados en base seca

Los resultados obtenidos se correlacionaron con el estado de madurez de las muestras, y se encontró dependencia tanto para la fibra soluble como para la insoluble. Esta relación es positiva para el caso de la fibra insoluble (Pearson correlation=0.818) y negativa para la soluble (Pearson correlation=-0.723), y para ambos tipos de fibra es significativa (p-value<0.05). Estos resultados concuerdan con las tendencias reportadas por Rodríguez-García *et al.*, (2007), ya que los autores determinaron que el contenido de fibra insoluble de harinas de *O. ficus-indica* era proporcional a la madurez de los cladodios de los cuales procedían, mientras que el de fibra soluble disminuía con la edad de las mismas.

Las diferencias observadas entre diferentes variedades del mismo genotipo pueden relacionarse con la madurez de las muestras, ya que para *O. ficus-indica Villanueva* (OFI-V) tiene un mayor nivel de FDI que *Jalpa* (OFI-J), lo cual está de acuerdo con lo mencionado anteriormente. En el caso de *O. robusta*, se observa la diferencia entre la cantidad de FDS, siendo mayor para *Tapón* (OR-T), que reporta un menor grado de madurez que para *Gavia* (OR-G). Por lo tanto, se puede concluir que las diferencias observadas en el contenido de fibra no sólo están relacionadas a la variedad analizada, sino que también hay un efecto de madurez de las muestras.

Los rangos de FDI y FDS para algunas de las variedades se encuentran dentro de lo reportado en la literatura. Rodríguez-García *et al.*, (2007) analizaron el contenido de fibra en diferentes estadios de madurez para *O. ficus-indica* var. *Redonda*: de 29.87 ± 1.35 a $41.65 \pm 1.32\%$ para FDI y 14.91 ± 1.09 a $25.22 \pm 1.26\%$. En este estudio *O. robusta* var. *Gavia* ($47.61 \pm 0.70\%$), *O. undulata* (OU) ($44.61 \pm 0.11\%$), *O. rastrera* (OR-R) ($44.76 \pm 2.49\%$) y *O. leucotricha* (OL-D) ($46.05 \pm 0.70\%$) presentaron valores superiores de FDI, lo cual podría deberse a que estas muestras tuvieran un mayor grado de madurez que las reportadas por este autor. En FDS sobresalen *Gavia* ($11.36 \pm 0.13\%$), *O. undulata* ($11.82 \pm 0.18\%$), *O. rastrera* ($11.05 \pm 1.07\%$) y *O. leucotricha* ($8.63 \pm 0.16\%$) que tienen un menor nivel de fibra soluble que lo reportado, mientras que *O. lindheimeri* (OL) (31.45 ± 1.46) y *O. robusta* var. *Tapón* ($31.16 \pm 1.67\%$) presentan un mayor contenido de FDS.

Sáenz *et al.*, (2002) documentaron 28.45 de FDI y 14.54% de FDS para una especie no identificada de nopal comercial. Este valor de FDI es inferior a lo encontrado en esta investigación, mientras que FDS se encuentra dentro del rango. Cárdenas-Medellín *et al.* (1996) determinó el contenido de fibra dietética total en muestras de nopal crudo y cocido, encontrando 42.80% y 41.26% respectivamente, es decir que el cocimiento propició la lixiviación de fibra en el agua de cocimiento y/o destruyó una porción de la fibra. Estos valores son inferiores a los reportados en este estudio. Ayadi *et al.* (2009) cuantificaron FDI y FDS para dos variedades de *O. ficus-indica*, y los valores para FDI fueron de 30.36 y 34.58%, mientras que para FDS de 12.98% y 8.78%. Ambas variedades de *O. ficus-indica* analizadas en este trabajo presentaron mayor contenido de ambos tipos de fibra.

4.2. Comparación del perfil fitoquímico de las diez variedades de nopal

4.2.1. Cuantificación de fenólicos libres

En la Tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de fenólicos libres para las diez variedades de nopal. Se puede observar que *O. undulata* var. *Oreja de elefante* (OU), reportó el mayor contenido de fenólicos ($905.08 \pm 64.51 \mu\text{gEAG/g}$), mientras que el valor más bajo se obtuvo para *Nopalea cochenillifera* var. *Santa Emilia*

(NC) (296.44 ± 23.72 $\mu\text{gEAG/g}$), además que existió una gran variabilidad entre cada una de las variedades utilizadas.

Tabla 4.4: Contenido de fenólicos libres y actividad antioxidante por variedad de nopal¹

Variedad	Fenólicos ($\mu\text{g EAG/g}$) ²	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$) ³
OFI-J	318.11 ± 34.18^e	382.52 ± 47.94^d
OL	754.26 ± 115.11^b	$466.04 \pm 50.57^{c,d}$
OR-G	561.89 ± 37.79^d	738.83 ± 89.82^a
OS	663.56 ± 57.52^c	471.69 ± 60.53^c
OU	905.08 ± 64.51^a	585.20 ± 67.18^b
OR-R	689.46 ± 46.71^c	396.22 ± 58.77^d
OR-T	643.53 ± 59.69^c	496.83 ± 54.70^c
OL-D	802.01 ± 57.87^d	$431.57 \pm 50.80^{c,d}$
OFI-V	593.1 ± 36.4^d	264.56 ± 32.20^e
NC	296.44 ± 23.72^e	265.37 ± 23.27^e

¹ Letras iguales en la columna denotan que los valores son estadísticamente similares

² Valores reportados como μg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de muestra seca

³ Valores reportados como μmoles equivalentes de Trolox (ET) por gramo de muestra seca

Entre los datos reportados de fenólicos totales en la literatura se han reportado valores para la especie *O. ficus-indica*. Lee *et al.*, (2002) de $180.3 \pm 18.6\text{mg EAG/g}_{\text{extracto}}$ en base seca para un extracto etanólico liofilizado de la variedad *Saboten*. Tomando en cuenta que el rendimiento del extracto fue del 2.3%, el contenido de fenólicos en base al peso de nopal seco sería de $4140\mu\text{g EAG/g}$. Este valor es de 5 a 14 veces mayor que resultados obtenidos en la presente investigación. Las diferencias pueden deberse al proceso de desinfección, el cual se realiza por remojo en agua con cloro, o al secado, el cual involucra una temperatura de 60°C durante 8-9h. En el remojo podrían perderse compuestos por lixiviado, mientras que en el secado por degradación.

En otro reporte se obtuvieron $200\text{mg EAG}/100\text{g}$ de peso fresco para otra variedad (Milpa Alta) de *O. ficus-indica*, lo que equivale a 30.81mg EAG/g en base seca (Corral-Aguayo *et al.*, 2008). De nuevo, el valor obtenido está dos órdenes de magnitud por encima de los resultados obtenidos para este trabajo. En este caso, el solvente utilizado para la extracción fue acetona al 80% en relación 1:20 m/v con sonicación durante 5

minutos, y el proceso se llevo a cabo dos veces, juntando ambos extractos para su análisis.

Sergeira (2009) en su tesis de maestría realizó la evaluación fitoquímica de cuatro preparados comerciales de nopal, utilizados como suplemento alimenticio. Se encontró que la cantidad de fenólicos libres fue variable entre cada uno de los preparados, reportando valores desde 600±g EAG/g hasta 3600±g EAG/g. Los valores más altos obtenidos en esta investigación se encuentran dentro del rango bajo reportado por esta autora, similares al producto comercial Diapal (Biocéutica, Newbury, MA.). Todas las muestras se extrajeron a temperatura ambiente con etanol absoluto en relación 1:20 m/v durante 2h con sonicación y reposo durante 23h.

Es importante mencionar que, como se observa en la Tabla 4.4, existió una gran variabilidad intervarietal en el contenido de fenólicos libres. Se plantea la hipótesis que pueda deberse al grado de madurez de las muestras, sin embargo, no se encontró correlación con este parámetro ($p=0.910$), ni con el contenido de fibra soluble ($p=0.677$). Cabe notar que las variedades fueron cultivadas en dos regiones diferentes, por lo que están sometidas a un grado de estrés ambiental distinto. Esto es de particular importancia en el caso de *O. robusta* vars. *Gavia* y *Tapón*, ya que se observa que *Gavia* (561.89 ± 37.79 ±g EAG/g) tiene un valor menor de fenólicos libres que *Tapón* (643.53 ± 59.69 ±g EAG/g), lo que podría indicar que existe un mayor estrés en este último cultivo. En el caso de *O. ficus-indica*, ambas variedades se cultivaron en la misma región, por lo que las diferencias observadas entre ellas no se deben a este factor.

Sin embargo, cabe mencionar que con el método de extracción utilizado no se haya logrado obtener el total de los compuestos fenólicos. Ginestra *et al.* (2009) reportaron que del 2-28% de los fenólicos simples y del 72-85% de los flavonoides permanecieron en el residuo después de dos extracciones consecutivas con etanol absoluto. Una explicación que dan los autores es que hay algún componente en la pared celular de los cladodios de *Opuntia* que afecta la solubilidad de compuestos de bajo peso molecular. Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen indicar que este o estos componentes podrían ser diferentes para cada variedad analizada.

Los resultados se compararon con diversas frutas (Vinson *et al.*, 2001) y se encontró que las muestras analizadas tienen contenidos de fenólicos similares al melón (259.237 $\mu\text{gEAG/g}$), naranja (358.943 $\mu\text{gEAG/g}$), toronja (418.767 $\mu\text{gEAG/g}$), nectarina (498.533 $\mu\text{gEAG/g}$), piña (697.946 $\mu\text{gEAG/g}$) y uva blanca (797.652 $\mu\text{gEAG/g}$), siendo estos valores expresados en base seca. Esto indica que el nopal es una buena fuente de compuestos fenólicos, aunque no llega a niveles comparables con los arándanos (14,048.649 $\mu\text{gEAG/g}$) y uva roja (3340.168 $\mu\text{gEAG/g}$).

4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)

La Tabla 4.4 también presenta los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de cada una de las variedades estudiadas. Al igual que los fenólicos libres, se encontraron diferencias entre variedades, siendo *O. robusta* var. *Gavia* (OR-G) la que reportó la mayor actividad (738.83 \pm 89.82 $\mu\text{molET/g}$), mientras que las menos antioxidantes, de acuerdo a este ensayo, fueron *O. ficus-indica* var. *Villanueva* (OFI-V) (264.56 \pm 32.20 $\mu\text{molET/g}$) y *N. cochenillifera* var. *Santa Emilia* (NC) (265.37 \pm 23.27 $\mu\text{molET/g}$).

El resultado obtenido para la variedad *Gavia* es comparable con lo reportado por Corral-Aguayo *et al.* (2009) para *O. ficus-indica*, quienes determinaron que esta especie tiene una actividad de 770.42 $\mu\text{mol ET/g}$ en base seca. Un punto de interés es el método de extracción utilizado por los autores, realizando dos extracciones con acetona al 80% (1:20 m/v). Estos autores realizaron el ensayo además con diferentes frutas, y se encontró que el nopal presentó mayor actividad que la papaya (50.2 $\mu\text{molET/g}$), guayaba (188.35 $\mu\text{molET/g}$), aguacate (21.82 $\mu\text{molET/g}$), fresa (268.82 $\mu\text{molET/g}$), mango (28.72 $\mu\text{molET/g}$) y tuna (38.52 $\mu\text{molET/g}$).

Los valores de ORAC obtenidos para las diez variedades de nopal son comparables con los que han sido reportados en base seca para frutas como frambuesa (335.563 $\mu\text{mol ET/g}$), fresa (397.865 $\mu\text{mol ET/g}$), zarzamora (400.382 $\mu\text{mol ET/g}$), mora azul (412.267 $\mu\text{mol ET/g}$) y la variedad *Gavia* incluso es comparable con los arándanos (717.519 $\mu\text{mol ET/g}$). Observando estos resultados se puede decir que el nopal es un excelente alimento funcional, debido a su alto poder antioxidante, y a pesar que el proceso de producción

podiera disminuir el contenido de fenólicos totales, la actividad antioxidante de los compuestos se mantiene alta.

Por otro lado, se encontró una correlación positiva ($p=0.416$) entre el contenido de fenólicos libres y la actividad antioxidante. En general, a mayor cantidad de fenólicos libres, mayor valor de ORAC, con algunas notables excepciones: *O. robusta* var *Gavia* y *O. ficus-indica* var. *Villanueva*. Y al igual que se sucede con los fenólicos libres, no se correlaciona con el estado de madurez de las muestras ($p=0.402$).

4.2.3. Hidrólisis de los extractos

Con el propósito de definir el tiempo óptimo de hidrólisis de los flavonoides se utilizaron las variedades *Gavia* y *Jalpa* como modelos para seguir la cinética liberación y degradación de los flavonoles de interés: kaempferol, quercetina y un tercer flavonoide, al ser sometidos a un tratamiento ácido a $85.0 \pm 5.0^\circ\text{C}$. Las cinéticas para cada compuesto se presentan en las Figuras 4.1 a 4.3.

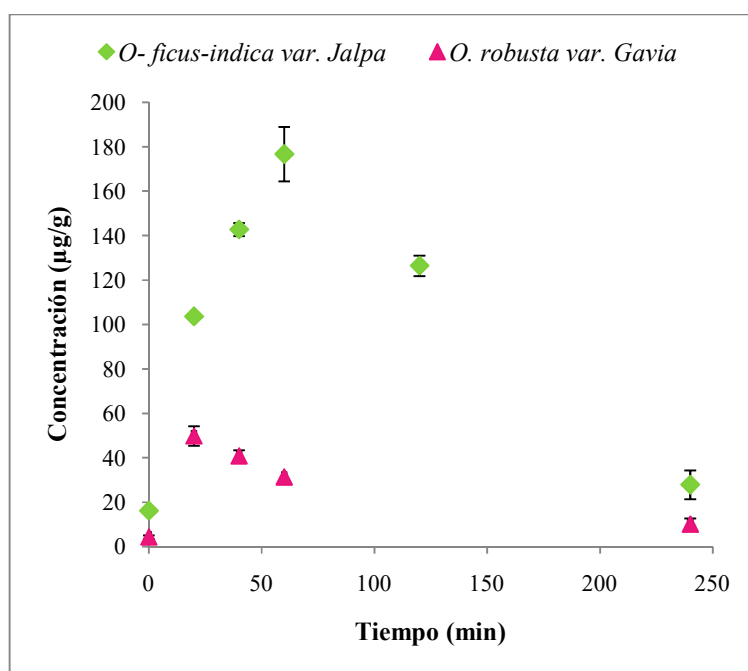


Figura 4.1: Concentración de kaempferol en función del tiempo de hidrólisis para las variedades *O. ficus-indica* var. *Jalpa* y *O. robusta* var. *Gavia*.

En la Figura 4.1 se observa como el kaempferol contenido en la variedad *Gavia* se hidroliza más rápidamente que el asociado a *Jalpa*, debido a que presenta una concentración más baja de este compuesto. Mientras que *Gavia* requiere de 20 minutos para alcanzar la máxima concentración de kaempferol ($49.902 \pm 4.359 \mu\text{g/g}$), *Jalpa* necesitó 60 minutos para alcanzar el pico ($176.678 \mu\text{g/g}$) antes de que comenzara a degradarse. Se aprecia además que *Jalpa* tiene 3.5 veces la cantidad del flavonoide en comparación con *Gavia*, y a los 20 minutos de hidrólisis la concentración fue el doble. Estos resultados indican que el tiempo de hidrólisis permite determinar las diferencias entre las variedades.

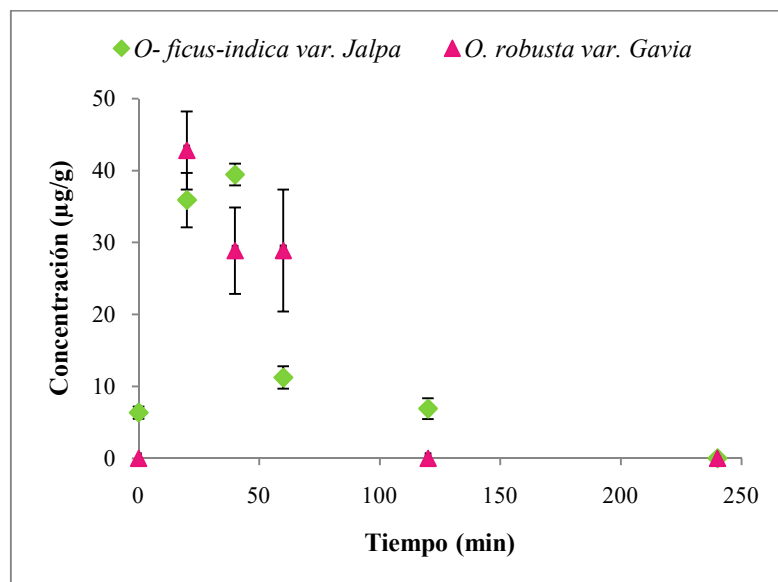


Figura 4.2: Concentración de quercetina en función del tiempo de hidrólisis para las variedades *O. ficus-indica* var. *Jalpa* y *O. robusta* var. *Gavia*.

En la Figura 4.2 se presenta la cinética de liberación de la quercetina. De acuerdo a estos resultados, la cantidad de quercetina libre en el extracto crudo es muy baja $6.365 \pm 0.839 \mu\text{g/g}$ para *Jalpa* y no detectable para *Gavia*. Ésta alcanzó su concentración máxima a los 20 minutos en el caso de *Gavia* ($42.808 \pm 5.429 \mu\text{g/g}$) y a los 40 minutos para *Jalpa* ($39.476 \pm 1.515 \mu\text{g/g}$), sin embargo, este compuesto se degradó rápidamente, ya que a las 2h en *Gavia* y a las 4h en *Jalpa* no fue posible detectarlo. No se observaron

diferencias significativas en el tiempo de hidrólisis ni en la concentración de este flavonol.

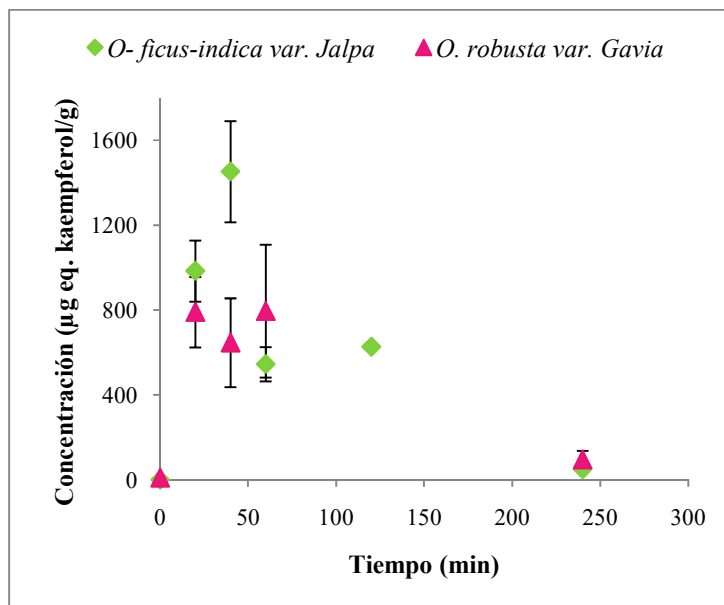


Figura 4.3: Concentración de flavonoide-3 en función del tiempo de hidrólisis para las variedades *O. ficus-indica* var. *Jalpa* y *O. robusta* var. *Gavia*.

La cinética de hidrólisis del flavonoide-3, el cual fue el flavonol predominante, como se demuestra más adelante, se presenta en la Figura 4.3. En esta se pueden observar concentraciones que son al menos diez veces mayores que para los otros dos flavonoides, y ya que no se contaba con un estándar, se cuantificó como equivalentes de kaempferol.

Se determinó que *Jalpa*, al igual que para los compuestos anteriores, necesitó de un mayor tiempo de hidrólisis para liberar su máxima concentración del flavonol, y que alcanzó una mayor concentración que la lograda por *Gavia*. Además de notar que la concentración llega a niveles bajos a las 4h de hidrólisis, en relación con el máximo obtenido. Un fenómeno interesante que se observa en *Gavia* es que hay dos máximos, ya que se reportaron cuatro glicósidos diferentes en este trabajo, como se demuestra más adelante, los cuales tienen diferente tiempo de hidrólisis.

En base a estos resultados, se decidió utilizar 20 minutos como el tiempo estándar de hidrólisis, tomando en cuenta que algunas muestras podrían no llegar a liberar los

compuestos por completo. Se debe tomar en cuenta que un mayor tiempo podría propiciar que los flavonoides que se encuentran en concentraciones bajas comiencen a degradarse, y que por esta razón no puedan detectarse ni cuantificarse.

4.2.4. Análisis de flavonoides por HPLC-PDA

Los extractos crudos e hidrolizados durante 20 minutos de las diez variedades de nopal fueron analizados por cromatografía líquida con detector de arreglo de fotodiodos. Esta metodología permitió, no sólo separar los compuestos de las muestras, sino también obtener su espectro de absorción UV-visible.

La Figura 4.4 presenta los cromatogramas obtenidos para la variedad *Jalpa*, tanto para el extracto crudo, como para el hidrolizado durante 20 minutos, señalando los tres flavonoides de interés: (Q), (K) y (F3). Los cromatogramas de los extractos crudos e hidrolizados del resto de las variedades se pueden encontrar en los anexos A y B, respectivamente. En las Figura 3.5 y 3.6 se presentan los espectros de absorción de las agliconas de los flavonoides detectados en el extracto, comparados con los espectros de los estándares puros.

Después de hidrolizar con ácido durante 20 minutos a 85°C desaparecieron los picos (I1), (I2) (I3) y (K1), correspondientes a los glucósidos de los flavonoides isorhamnetina y kaempferol, identificados por el orden de elución y la comparación con los espectros de absorción obtenidos con los reportados por Ginestra *et al.* (2009). Las longitudes de onda de máxima absorción se presentan en la Tabla 4.5. Además se observa el aumento en tamaño de los picos (Q) y (K), así como la aparición de F3, indicando la liberación de las agliconas quercetina, kaempferol y e isorhamnetina.

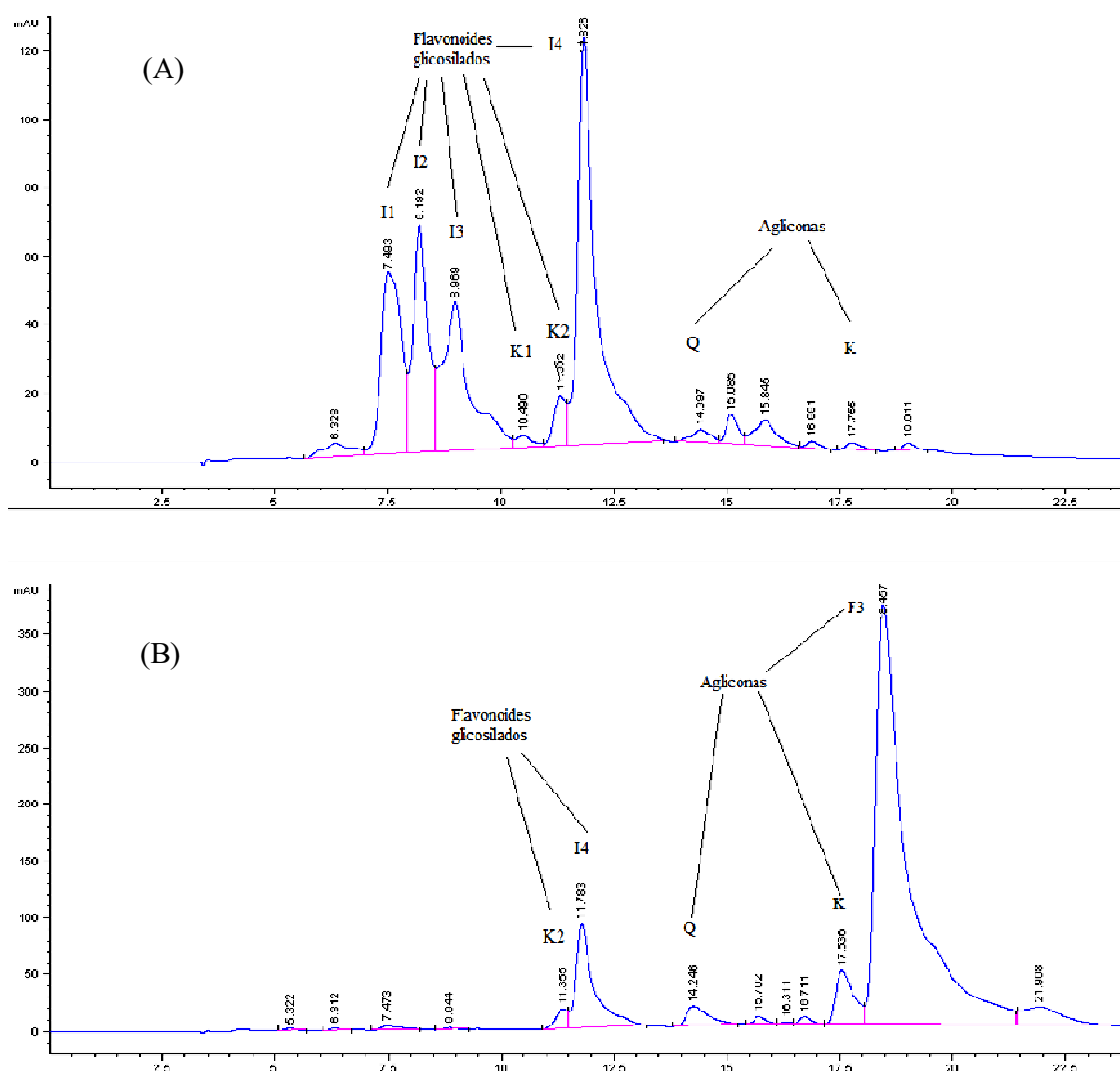


Figura 4.4: (A) Cromatograma del extracto crudo de *O. ficus-indica* var. *Jalpa*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I2) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido, (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (K1) Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol. (B) Cromatograma del extracto hidrolizado durante 20 min de *O. ficus-indica* var. *Jalpa*. (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

Tabla 4.5: Características de los flavonoides identificados

Pico	Compuesto	Tiempo de elución (min)	λ_{\max} UV-vis
I1	isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnosil-rhamnósido	7.5	254, 354
I2	isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido	8.2	253, 354
I3	isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnosido	8.9	254, 354
K1	kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido	10.5	264, 350
K2	kaempferol-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnósido	11.3	262, 351
I4	isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosil-rhamnósido	11.8	253, 354
Q	quercetina	14.3	254, 371
K	kaempferol	17.5	266, 363
F3	flavonoide 3	18.5	253, 370

En la tabla anterior se puede apreciar que los glucósidos presentan longitudes de onda de máxima absorción similares a las de su respectiva aglicona. La banda más conservada es la banda II (210-290 nm), mientras que la banda I presenta cambios debido a los azúcares presentes (Bloor, 2001). Ginestra *et al.*, (2009) documentaron los espectros de absorción de diversos glucósidos de isorhamnetina, kaempferol y quercetina, contra los cuales se compararon los espectros obtenidos en esta investigación.

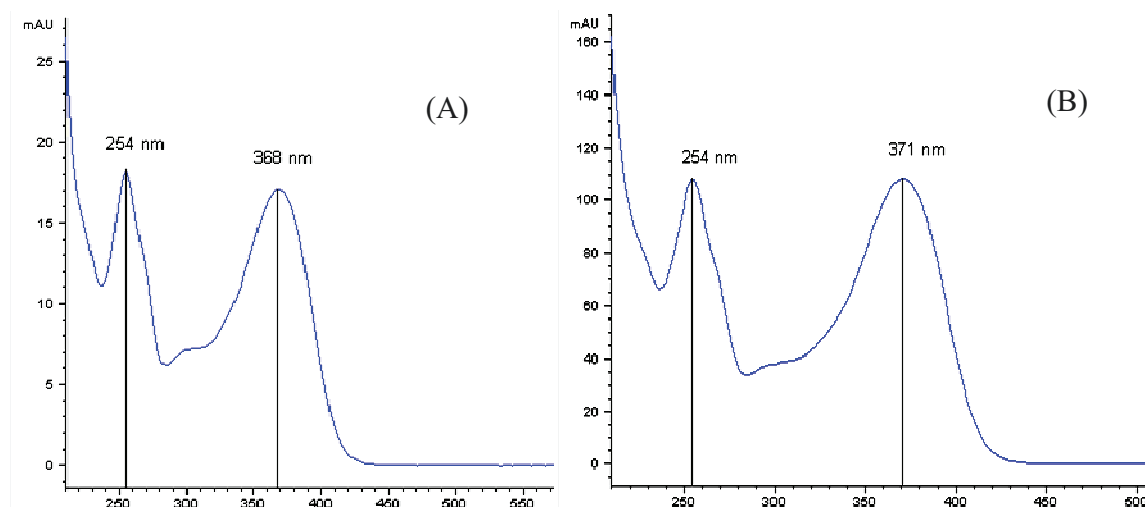


Figura 4.5: Espectros de absorción en el rango UV-visible de (A) Quercetina en el extracto hidrolizado de la variedad *Jalpa*. (B) Estándar de quercetina.

En la Figura 4.5 (A) se presenta el espectro de absorción UV-visible que se obtuvo para el pico (Q) en el extracto hidrolizado de la variedad *Jalpa*. Este pico eluyó alrededor de los 14 minutos (58.7% de metanol en la fase móvil), el cual corresponde al tiempo de

elución para el estándar. El espectro mostró las dos bandas características de los flavonoides, a 254 y 368 nm, mientras que el compuesto puro (B) exhibió un espectro similar, con máximos en 254 y 371 nm.

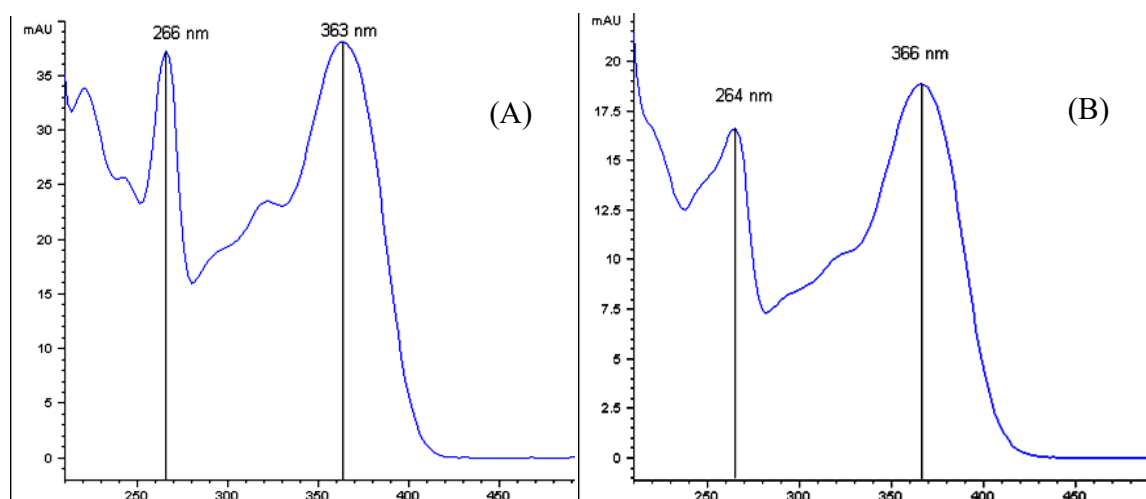


Figura 4.6: Espectros de absorción en el rango UV-visible de (A) Kaempferol en el extracto hidrolizado de la variedad *Jalpa*. (B) Estándar de kaempferol.

El espectro de absorción UV-visible del pico (K) en el extracto hidrolizado de la variedad *Jalpa* se muestra en la Figura 4.6 (A). Este pico eluyó a los 17 minutos (60% de metanol en la fase móvil, al igual que el estándar. Este espectro también presentó las dos bandas características de los flavonoides, a 266 y 363 nm, mientras que el kaempferol puro (B) exhibió un espectro similar, con máximos en 264 y 366 nm.

Adicionalmente, aparece el pico (F3), el cual resulta ser el compuesto predominante, y cuyo espectro UV-visible (Figura 4.7) corresponde a un flavonol, que no pudo ser identificado propiamente debido a que no se contaba con el estándar. El espectro muestra máximos similares al de la quercetina (253 y 370 nm), por lo que la estructura de este podría ser similar al de este compuesto. Se ha deducido que el flavonoide-3 pueda tratarse de isorhamnetina, ya que este ha sido reportado como el flavonol más abundante en *O. ficus-indica* (Ginestra *et al.*, 2009; Saleem *et al.*, 2006), y sus glucósidos fueron

identificados en el extracto crudo (Figura 4.4). Además el orden en que eluyó con respecto a la quercetina y el kaempferol coincide con lo reportado.

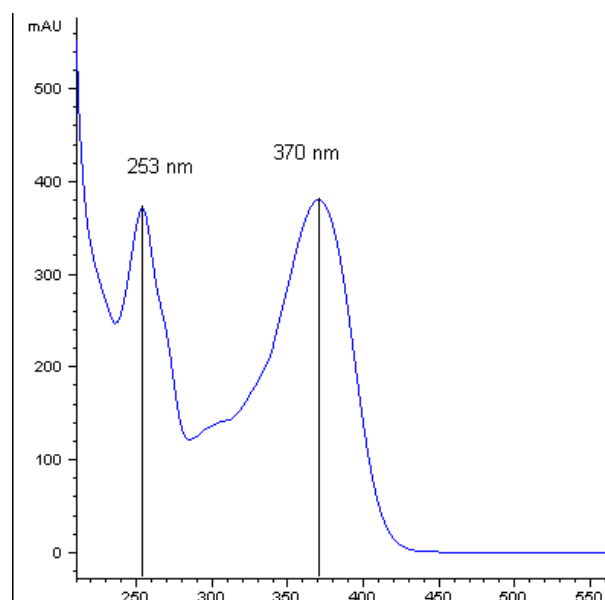


Figura 4.7: Espectro de absorción en el rango UV-visible del flavonoide 3.

Una vez identificado el tiempo de retención de cada uno de los flavonoides de interés con ayuda de los estándares y el orden de elución reportado por Sergeira (2009), se procedió a realizar la cuantificación de los compuestos, tanto los que se encuentran de manera libre, como los glucósidos y aquellos que se hidrolizaron después del tratamiento. Estos resultados y el porcentaje de hidrólisis logrado de cada compuesto se reportan en la Tabla 4.6. Los glucósidos se cuantificaron como μg equivalentes de su aglicona y compuestos para los que no se contaba con estándar como μg equivalentes kaempferol.

En la Tabla 4.6 se puede observar que no todas las variedades presentaron los tres compuestos. El flavonol menos abundante fue la quercetina, y cabe mencionar que sólo en dos variedades *Jalpa* (OFI-J) ($6.37 \pm 0.95 \mu\text{g/g}$) y *Villanueva* (OFI-V) ($4.89 \pm 0.69 \mu\text{g/g}$) se detectó en forma libre, y que ambas variedades pertenecen a la especie *O. ficus-indica*. Después de la hidrólisis tampoco estuvo presente en todas las variedades. El compuesto no fue detectable en *silvestre Santa Emilia* (OL), *Cardón* (OS), *Tapón* (OR-T) y *Santa*

Emilia (NC), mientras que el nivel más alto se encontró en *O. leucotricha* (OL) ($97.80 \pm 0.83 \mu\text{g/g}$).

Tabla 4.6: Flavonoides identificados en diez variedades de nopal* **

Variedad	Quercetina*			Kaempferol*			Flavonoide-3*		
	Libre	Glicosilada	Hidrolizada	Libre	Glicosilado	Hidrolizado	Libre	Glicosilado	Hidrolizado
OFI-J	6.3±1.0 ^a	ND	35.9±4.3 ^{c,d}	16.2±1.2 ^a	15.5±2.3	119.8±1.7 ^b	ND	537.75±53.1 ^a	1118.0±163.5 ^a
OL	ND	ND	ND	ND	ND	1.8±0.3 ^c	ND	ND	ND
OR-G	ND	ND	42.8±6.7 ^c	4.4±0.9 ^c	ND	54.3±5.8 ^c	10.7±0.2 ^{a,b}	163.5±10.1 ^c	897.8±188.5 ^{a,b}
OS	ND	ND	ND	ND	ND	42.2±4.2 ^c	17.3±0.6 ^a	ND	90.6±22.8 ^c
OU	ND	ND	33.1±1.9 ^d	ND	ND	12.9±2.2 ^{d,c}	ND	23.4±9.7 ^d	503.3±114.6 ^{b,c}
OR-R	ND	ND	8.00±1.5 ^c	ND	ND	28.9±4.7 ^d	5.4±0.3 ^b	93.9±21.6 ^{c,d}	305.1±40.9 ^c
OR-T	ND	ND	ND	ND	ND	45.6±1.2 ^{c,d}	ND	43.0±26.0 ^d	153.2±73.4 ^c
OL-D	ND	ND	97.8±0.8 ^a	ND	ND	39.6±4.3 ^{c,d}	20.7±3.6 ^a	121.2±22.3 ^{c,d}	644.8±14.4 ^b
OFI-V	4.9±0.7 ^a	ND	63.9±1.6 ^b	8.4±0.9 ^b	63.6±11.0	474.6±23.1 ^a	12.0±6.0 ^{a,b}	256.5±81.2 ^d	1007.3±1.4 ^a
NC	ND	ND	14.0±1.1 ^c	ND	ND	43.2±14.3 ^c	ND	ND	465.8±70.7 ^{b,c}

* Letras iguales en la columna denotan que los valores son estadísticamente similares

** ND - El compuesto no fue detectable en la muestra bajo los parámetros de análisis utilizados

^yValores reportados como μg de quercetina/g muestra

^zValores reportados como μg de kaempferol/g muestra

En este trabajo se encontraron niveles de quercetina similares a los reportados por Sergeira, (2009) para extractos etanólicos de diversos suplementos alimenticios a base de nopal. El rango reportado por este autor fluctúa de 3.00 a 62.00 $\mu\text{g/g}$, expresando los resultados por gramo de nopal seco. Ginestra *et al.*, (2009) encontraron niveles más altos de quercetina en *O. ficus-indica* (L.) Mill. estimando un nivel de 243.0 $\mu\text{g/g}$ si se hidrolizan todos los glucósidos identificados en el extracto etanólico, sin embargo, sólo lograron liberar el 21.4% (50.0 $\mu\text{g/g}$) de este máximo posterior a un tratamiento con 10 unidades pectinasa en el extracto etanólico. Por su parte, Lee *et al.*, (2003) purificaron quercetina a partir de un extracto metanólico de *O. ficus-indica* var. *Saboten*, obteniendo 80.00 μg de la aglicona por gramo de muestra seca, nivel comparable a los resultados obtenidos para *O. leucotricha*.

Kaempferol fue el segundo compuesto más abundante, y fue detectable de manera libre en *Jalpa* (OFI-J) ($16.22 \pm 1.24 \mu\text{g/g}$), *Villanueva* (OFI-V) ($8.38 \pm 0.87 \mu\text{g/g}$) y *Gavia* (OR-G) ($4.39 \pm 0.88 \mu\text{g/g}$). Después de la hidrólisis se encontró en las diez variedades, siendo *Villanueva* y *silvestre Santa Emilia* (OL) las variedades en la que se cuantificó la mayor ($474.57 \pm 23.06 \mu\text{g/g}$) y menor ($1.75 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$) abundancia, respectivamente.

Sergeira, (2009) encontró niveles menores de kaempferol que de quercetina, en un rango de 2.00 a 35.00 $\mu\text{g/g}$ en los extractos etanólicos de los comprimidos. Estos niveles son similares a los obtenidos en esta investigación para los extractos crudos de las variedades que presentaron kaempferol libre. Ginestra *et al.*, (2007) estiman un máximo de 195.0 $\mu\text{g/g}$ de kaempferol a partir de los glucósidos detectados, logrando hidrolizar el 30.8% (60.0 $\mu\text{g/g}$) con pectinasa. El máximo es comparable a ambas variedades de *O. ficus-indica* estudiadas en este trabajo, e incluso menor que lo detectado para *Villanueva*. Además, como se observó en la cinética, el máximo de kaempferol no se alcanzó a los 20 minutos, por lo que el valor total presente en el extracto debe ser mayor al que se reporta en este trabajo. Qiu *et al.*, (2002) aislaron dos glucósidos de kaempferol a partir de *O. dillenii* y estimaron un máximo de 1.75 $\mu\text{g/g}$ de la aglicona después de una hidrólisis.

El flavonoide 3 fue el compuesto presente en mayor cantidad en todas las muestras, excepto la variedad *silvestre Santa Emilia* (OL). De manera libre se presentó en las variedades *Gavia* (OR-G) ($4.39 \pm 0.88 \mu\text{g/g}$), *Cardón* (OS) ($17.29 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$), *O. rastrera* (OR-R) ($5.44 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$), *O. leucotricha* (OL-D) ($20.27 \pm 3.63 \mu\text{g/g}$) y *Villanueva* (OFI-V) ($12.03 \pm 6.02 \mu\text{g/g}$). Después de la hidrólisis, los niveles llegaron hasta $1118.0 \pm 163.5 \mu\text{g/g}$ para *Jalpa* (OFI-J), y existieron diferencias significativas en las concentraciones con respecto a la variedad.

Además, como se observa en la Figura 4.4 (B), para el caso de *Jalpa* no se logró hidrolizar el glucósido I4 por completo, y en el resto de las variedades se observó al menos un glucósido de isorhamnetina no hidrolizado. A pesar que no se confirmó mediante un estándar la identidad del flavonoide 3, este pudiera tratarse de isorhamnetina por las razones discutidas anteriormente. Por lo tanto, se puede asumir que un mayor tiempo de hidrólisis llevaría a un aumento en la concentración de este flavonoide pero se podría iniciar la degradación de los otros compuestos. Para esto se determinó el porcentaje de hidrólisis en función del área bajo la curva de cada glicósido.

En la Tabla 4.7 se muestra el porcentaje de cada glicósido que se hidrolizó a los 20 minutos. El glicósido más común que se presentó en todas la variedades fue I1, el cual estuvo ausente únicamente en *O. lindheimeri* (OL) y *O. rastrera* (OR-R), y se hidrolizó al

100% bajo las condiciones del experimento. I2 e I3 se presentaron en las variedades de *O. ficus-indica* (OFI-J y OFI-V), *O. robusta* var. *Gavia* (OR-G) y *O. leucotricha* (OL), estando I3 que estuvo ausente en *O. leucotricha*. Estos tres compuestos tienen tres azúcares unidos a la aglicona de isorhamnetina, y al hidrolizarse parcialmente generan I4, el cual tiene dos azúcares. En las variedades en las que se encontró este último presente, no se hidrolizó al 100%, llegando a un valor máximo del 88.8% para *O. rastrera*. Como se observa, las variedades *O. ficus-indica* Villanueva y *N. cochenillifera* (NC) reportan valores negativos, lo cual indica que la cantidad de este compuesto aumentó a los 20 minutos de hidrólisis con respecto al extracto crudo. Esto quiere decir que los glicósidos con tres azúcares generaron I4. Incluso en las muestras que presentaron menor cantidad de este glicósido, este no se hidrolizó por completo.

Tabla 4.7: Eficiencia de la hidrólisis ácida de flavonoides a los 20min*

Variedad	I1(%)	I2(%)	I3(%)	K1(%)	K2(%)	I4(%)
OFI-J	100	100	100	-	71.5±10.6 ^a	65.3±0.9 ^a
OL	-	-	-	-	-	-
OR-G	100	100	100	-	-	87.8±17.3 ^a
OS	-	-	-	-	-	-
OU	100	-	-	-	-	-
OR-R	-	-	-	-	-	88.8±10.3 ^a
OR-T	100	-	-	-	-	-
OL-D	100	-	100	-	-	24.0±18.8 ^b
OFI-V	100	100	100	100	75.7±22.1 ^a	-29.7±18.3 ^c
NC	100	-	-	-	-	-34.5±24.1 ^c

* Letras iguales en la columna denotan que los valores son estadísticamente similares

- Indica que el glicósido no estaba presente en la muestra

Para determinar si alguno de los compuestos detectados es el que da la actividad antioxidante al extracto, se obtuvo la correlación entre cada uno de ellos y los resultados del ensayo ORAC, sin embargo, ninguna fue significativa ($p\text{-value} > 0.05$), lo mismo que sucedió con los fenólicos totales. Posteriormente se sumaron las cantidades de los tres compuestos como equivalentes de kaempferol, pero la actividad antioxidante tampoco fue dependiente de la concentración de los tres compuestos.

Debido a que el ensayo ORAC fue realizado con el extracto crudo, sin realizar ningún proceso de fraccionamiento o purificación, se puede asumir que la actividad antioxidante se debe a acciones sinérgicas entre compuestos, por ejemplo con el ácido ascórbico. Cabe mencionar que en el extracto crudo algunos de los flavonoles identificados se encuentran de forma glicosilada, y dado que la parte más activa de estos compuestos se encuentra en el hidroxilo localizado en el carbono 3 del anillo C, pero al localizarse el grupo azúcar en éste, el resultado es una pérdida total de la actividad antioxidante (Burda y Oleszek, 2001). En la Tabla 4.5 se observa que al menos tres de los glicósidos encontrados están sustituidos en este carbono, por lo que no tienen actividad.

3.3. Bioensayo de secreción de insulina

Debido a reportes previos de la actividad del nopal para disminuir la hiperglucemia, se decidió probar si el mecanismo de acción está relacionado con el contenido de flavonoides. Los resultados obtenidos se expresaron como un índice, relacionando la secreción de insulina de las células tratadas con el nivel secretado por células en medio normoglucémico (5mM glucosa). Las sustancias secretagogas probadas fueron L-leucina 50mM, glibenclamida 200µM y el extracto hidrolizado de la variedad *Gavia*, estandarizado a una concentración de 10µg equivalentes de kaempferol por mL de medio, basado en el compuesto predominante en el extracto (F3). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Índice de secreción de insulina*

Tratamiento	Índice
Normoglucémico (5mM)	1.000±0.000 ^b
Normoglucémico (5mM) + Glibenclamida (200µM)	0.764±0.002 ^c
Normoglucémico (5mM) + <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i> (10µM)	0.741±0.017 ^c
Diabético (11mM)	1.466±0.267 ^{a,b}
Diabético (11mM) + L-leucina (50mM)	1.731±1.166 ^a
Diabético (11mM) + Glibenclamida (200µM)	1.125±1.166 ^b
Diabético (11mM) + <i>O. robusta</i> var. <i>Gavia</i> (10µM)	0.506±0.040 ^c

* Letras iguales en la columna denotan que los valores son estadísticamente similares

Se observó un decremento significativo en la secreción de insulina al aplicar el extracto, tanto en células normoglucémicas (0.741 ± 0.017) como en aquellas expuestas a una alta concentración de glucosa (0.506 ± 0.040), siendo este último decremento más pronunciado. Se encontró que la exposición a alta glucosa indujo la secreción de esta hormona significativamente (1.466 ± 0.267), sin embargo, el uso del medicamento (1.125 ± 1.166) y L-leucina (1.731 ± 1.166) no produjeron cambios significativos. El uso de glibenclamida produjo un resultado que no es diferente al estado normoglucémico, mientras que la L-leucina reflejó un aumento en insulina similar al que se observa en las células expuestas únicamente a alta glucosa.

Cabe mencionar que solamente se probó una sola concentración del extracto, la cual no resultó efectiva pero tampoco citotóxica. Por consiguiente, los datos obtenidos son inconclusos hasta probar nuevas concentraciones y fracciones. Nomura *et al.*, (2003) realizaron un estudio similar con amidas sintéticas derivadas del ácido ferúlico, un fenólico simple, y encontraron que la concentración mínima a la cual los compuestos mostraban actividad fue de 10^{-6} M, razón por la cual se seleccionó esta misma para el presente estudio. El ácido ferúlico y un derivado de ácido ferúlico y mio-inositol tuvieron un índice de 2.667 y 3.000. Estos autores también determinaron que el efecto secretagogo fue dependiente a la concentración de los compuestos, así como de su naturaleza química, ya que los compuestos más activos mostraron de 2 a 3 veces más actividad que los menos activos.

Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones

La presente investigación permitió realizar un análisis del perfil fitoquímico de diez variedades de nopal mexicano, a través de la comparación de sus niveles de fibra dietética, contenido de fenólicos totales y cuantificación de los principales flavonoides presentes en las harinas deshidratadas obtenidas de los cladodios. Además permitió adquirir una idea del potencial para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas debido a su capacidad antioxidante. Se observaron diferencias significativas entre las diversas variedades, aunque estas se encuentran en diferente estado de madurez.

El nivel más alto obtenido para la fibra soluble fue para las especies *O. lindheimeri* y *O. robusta* var. *Tapón*, y de fibra dietaria total para *O. lindheimeri*, *O. streptacantha*, y *O. robusta* var. *Tapón*. Estos resultados indican que estas tres variedades son de potencial interés para el mercado de suplementos alimenticios fibrosos, que son utilizados para el mejoramiento de la capacidad gastrointestinal, así como para el tratamiento de hipercolesterolemia y diabetes. Se encontró que los porcentajes de fibra soluble e insoluble están correlacionados con la madurez de la planta, por lo que se recomienda realizar estudios de estas variedades a través de la maduración en campo.

En cuanto al contenido fitoquímico, los niveles de fenólicos libres se encontraron por debajo de lo reportado en la literatura para el nopal fresco, y se encontraron diferencias significativas entre las variedades estudiadas. Las más sobresalientes en cuanto a fenólicos libres fueron *O. undulata* y *O. leucotricha*, sin embargo, esta prueba indica poco sobre la naturaleza de estos compuestos, ya que cuantifica tanto fenólicos simples como polifenoles y otros compuestos reductores, los cuales difieren en actividad biológica.

Interesantemente, las muestras con mayor contenido de fenólicos no fueron las que tuvieron mayor concentración de flavonoides dado que estos tienen diferentes niveles de glicosilación entre las muestras. *O. ficus-indica* var. *Jalpa* y var. *Villanueva* fueron las que presentaron mayor concentración de los flavonoides, siendo quercetina el menos abundante y cuyos glicósidos no fueron detectables en el extracto crudo, debido a su menor coeficiente de extinción. El proceso de hidrólisis propuesto resultó efectivo para

liberar las agliconas de los flavonoides glicosilados asociados a la matriz del nopal, sin embargo, fue dependiente de la concentración de los compuestos y las características de la aglicona.

La identidad del flavonoide predominante no pudo ser confirmada, debido a que no se contó con un estándar, pero se infiere que se trata de isorhamnetina, debido a reportes previos y la presencia de cuatro glicósidos de este compuesto en el extracto no hidrolizado. Los otros dos flavonoides identificados y cuantificados fueron kaempferol y quercetina. Se recomienda proponer un método para la caracterización de los glicósidos de los flavonoides por medio HPLC-MS, así como determinar puntualmente la identidad de las agliconas por esta misma técnica. Es importante considerar la cantidad de glicósido remanente después de la hidrólisis para determinar la concentración real de la aglicona. Para la cuantificación de estos compuestos es aconsejable obtener su coeficiente de extinción, o bien, aislarlos para una mayor facilidad de cuantificación.

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos crudos, y se encontró que estuvo correlacionada con la cantidad de fenólicos libres, más no con los flavonoides identificados en el extracto, por lo tanto, el o los compuestos con mayor poder antioxidante pueden ser de otra naturaleza química, por ejemplo ácido ascórbico. Otro factor que pudiese afectar la capacidad antioxidante es la glicosilación de los compuestos. La actividad más alta se registró para la *O. robusta* var. *Gavia*, a un nivel equiparable con los arándanos, e incluso las variedades con menor actividad son comparables con otras bayas, como la frambuesa y la zarzamora. Esto indica que *O. robusta* var. *Gavia* tiene el potencial para ser utilizada como suplemento alimenticio dentro de la categoría de los antioxidantes naturales. Una recomendación sería analizar la actividad antioxidante de los extractos hidrolizados, para determinar si existe una correlación positiva con los compuestos identificados. Paralelamente, sería apropiado realizar un fraccionamiento del extracto crudo para la identificación de otros compuestos bioactivos, por ejemplo fitoesteroles o saponinas.

Finalmente, se seleccionó la fracción rica en flavonoides del extracto hidrolizado de *O. robusta* var. *Gavia* estandarizado a 10 μ M del flavonol predominante para determinar el efecto en secreción de insulina. Se encontró que a la concentración utilizada en el

ensayo disminuyó la producción de de esta hormona en células diabéticas de manera significativa. Se recomienda realizar el ensayo con diferentes concentraciones así como intentar disminuir la variabilidad obtenida para los controles. La decisión de trabajar con el extracto hidrolizado se debe a que los flavonoles disminuyen su actividad antioxidante al estar sustituidos, sin embargo se recomienda investigar con los compuestos glicosilados para analizar si esto los hace más activos. De esta manera, se podrán realizar conclusiones más concretas acerca de la actividad de estos compuestos.

Como dirección futura para ese proyecto se propone seleccionar algunas de las variedades analizadas para profundizar más en su análisis fitoquímico, así como en determinar sus efectos en salud humana. De potencial interés es el estudio de *O. robusta* var. *Gavia*, ya que esta exhibió la mayor actividad antioxidante, y aunque los tres flavonoles estuvieron presentes, no fue la variedad con el contenido más alto. Por otro lado, para el análisis del potencial en salud de los flavonoles del nopal se recomienda estudiar *O. ficus-indica* var. *Villanueva* por su alto contenido de los tres flavonoles. Finalmente, para el análisis de compuestos de naturaleza diferente a los flavonoles es de particular interés *O. lindheimeri*, ya que esta presentó el contenido más bajo de los tres compuestos identificados.

Referencias

- Abraján-Villaseñor, M.A. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis doctoral, **2008**, Universidad Politécnica de Valencia.
- Abu-Lebdeh, H.S. Diabetes.. En *Evidence-based Endocrinology*; P.M. Camacho; H. Gharib; G.W. Sizemore, Ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, **2003**; pp. 185-235.
- Alberti, K.G.M.M.; Zimmet, P.Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. *Diab. Med.* **1998**, *15*, 539-553.
- Anderson, L.; Dibble, M.V.; Turkki, P.R.; Mitchel, H.S.; Rynbergen, H.J. Nutrición y dieta. Ed.; Interamericana: México, **1985**; pp. 537-554.
- Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharm.* **2005**, *99*, 325-348.
- AOAC International. Official Methods Analysis, 16th Ed.. In Methods 920.39, 923.03, 925.09, 942.12, 962.09, 978.02 y 991.43. **1998**, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- ATCC. Página web <http://www.atcc.org/> (accesada Mayo 2010)
- Ayadi, M.A.; Abdelmaksoud, W.; Ennouri, M.; Attia, H. Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Ind. Crops and Prod.* **2009**, *30*, 40-47.
- Banner-Weir, S.; Smith, F.E. Islets of Langerhands: Morphology and its Implications.. En *Joslin's Diabetes Mellitus 13^a edición*; C.R. Kahn; G.C. Weir. Ed.; Lea y Febriger: Malvern, **1994**; pp. 15-28.

- Bloor, S.J. Overview of Methods for Analysis and Identification of Flavonoids.. En *Methods in Enzymology* 335; Packer, L: Academic Press, **2001**; pp. 2-14.
- Boeing, H.; Weisgerber, U.M.; Jeckel, A.; Rose, H-J.; Kroke, A. Association between glycated hemoglobin and diet and other lifestyle factors in a nondiabetic population: cross-sectional evaluation of data from the Potsdam cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1115-1122.
- Britton, N.L.; Rose, J.N. Cactaceae. Vol. 1., Ed.; Gibson Brothers Press: Washington, **1919**; pp. 236.
- Budinsky, A.; Wolfram, R.; Oguogho, A.; Efthimiou, Y.; Stamatopoulos, Y.; Sinzinger, H. Regular ingestion of opuntia robusta lowers oxidation injury. *Prostagland., Leukotr. and Essent. Fatty Acids.* **2001**, *65*, 45-50.
- Burda, S.; Oleszek, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2774-2779.
- Bwititi, P.; Musabayane, C.T.; Nhachi, C.F.B. Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharm.* **2000**, *69*, 247-252.
- Campillo-Álvarez, J.E. La secreción de insulina. En *La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica*; F.J. Tébar-Massó; F. Escobar-Jiménez; Ed. Médica Panamericana: Madrid, **2009**; pp. 19-24.
- Cárdenas-Medellín, M.L, Serna-Saldívar, S.O., Velazco-de la Garza, J. Efecto de la ingestión nopal crudo y cocido (*Opuntia ficus indica*) en el crecimiento y perfil de colesterol total, lipoproteína y glucosa en sangre de ratas. *Arch. Latinoam. Nutr.* **1998**, *48*, 316-323.
- Castañeda-Andrade, I.; Gonzalez-Sanchez, J.; Frati-Munari, A.C. Hypoglycemic Effect of an *Opuntia streptacantha* Lemaire Dialysate. *J. PACD.* **1997**, *2*, 73-75.

- Chandalia, M.; Garg, A.; Lutjohann, D.; von Bergmann, K.; Grundy, S.M.; Brinkley, L.J. Beneficial Effects of High Dietary Fiber Intake in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *New Eng. J. Med.* **2000**, *342*, 1392-1398.
- Chapman and Hall. Dictionary of natural products. Base de datos en línea <http://dnp.chemnetbase.com> (Consultado en enero 2010).
- Cho, J.Y.; Park, S.C.; Kim, T-W.; Kim, K-S.; Song, J-C.; Kim, S-K.; Lee, H-M.; Sung, H-J.; Park, H-J.; Song, Y-B.; Yoo, E-S.; Lee, C-H.; Rhee, M-H. Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. *J. Pharmacy and Pharmacology.* **2006**, *58*, 113-119.
- Corral-Aguayo, R.D.; Yahia, E.M.; Carrillo-Lopez, A.; Gonzalez-Aguilar, G. Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10498-10504.
- De la Rosa-Hernández, J.P.; Santana-Amaro, D. El nopal: usos, manejo agronómico y costos de producción en México. Ed.; CONAZA-UACH-CIESTAAM: México, **1998**; pp. 182.
- Diario Oficial de la Federación. Productos Alimenticios no Industrializados para Consumo Humano – Hortaliza Fresca – Nopal Verdura (*Opuntia* spp.) – Especificaciones. NMX-FF-068-SCFI-2006. **2007**.
- Díaz-Medina, S.; Burguera-González, B. Actitud ante el debut de una diabetes mellitus. Perspectiva general del tratamiento.. En *La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica*; F.J. Tébar-Massó; F. Escobar-Jiménez; Ed. Médica Panamericana: Madrid, **2009**; pp. 77-84.
- Dok-Go, H.; Lee, K.H.; Kim, H.J.; Lee, E.H.; Lee, J.; Song, Y.S.; Lee, Y-H.; Jin, C.; Lee, Y.S.; Cho, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Reas.* **2003**, *965*, 130-136.

- Escott-Stump, S. Nutrición, diagnóstico y tratamiento. Ed.; McGraw Hill: México, **2005**; pp. 373-430.
- Flores-Valdez, C.A.; de Luna-Esquivel, J.M.; Ramírez-Moreno, P.P. Mercado mundial de la tuna. Ed.; ASERCA-CIESTAAM, **1995**; pp. 119.
- Food and Drug Administration. Página web <http://www.fda.gov> (accesada Enero 2010).
- Frechtel, G.D.; Lucentini, M. Cambios metabólicos en el ayuno: mecanismo de acción de la fructosa 2-6 difosfato.. En *Diabetes Mellitus*; M. Ruiz, Ed. AKADIA: Buenos Aires, **2006**; pp. 123-127.
- Ganguly, A.K.; Govindacharai, T.R.; Mohamed, P.A. Structure of opuntiol, a constituent of *Opuntia eliator*. *Tetrahed.* **1965**, 21, 93-99.
- Gagliardino, J.J.; Barelli, M.I.; Del Zotto, H.; Flores, L.; Francini, F.; Massa, M.L. Páncreas endocrino.. En *Diabetes Mellitus*; M. Ruiz, Ed. AKADIA: Buenos Aires, **2006**; pp. 128-168.
- García-Verdi, G.; Olguín Rubio, A.; Ramos-Gómez, M.; Rodríguez-García, M.E.; Reynoso-Camacho, R. Efecto antidiabético del cladodio de nopal comercial en ratas sanas y diabéticas. *Rev. Salud Pub. Nutr.* **2006**, 7.
- Garibay-Bagnis, C.; San Martín-Martínez, E. Estudio del efecto hipoglucémico de algunas plantas utilizadas en México para el control de la diabetes. *Rev. Salud Pub. Nutr.* **2006**, 11, 1-6.
- Ginestra, G.; Parker, M.L.; Bennett, R.N.; Robertson, J.; Mandalari, G.; Narbad, A.; Lo-Curto, R.B.; Bisignano, G.; Faulds, C.B.; Waldron, K.W. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 10323-10330.
- Goycoolea, F.M. y Cárdenas, A. Pectins from *Opuntia spp.*: A Short Review. *J. PACD.* **2003**, 5, 17-29.

- Guerrero-Analco, J.; Medina-Campos, O.; Brindis, F.; Bye, R.; Pedraza-Chaverri, J.; Navarrete, A.; Mata, R. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochem.* **2007**, *68*, 2087-2095.
- Gutiérrez, M.A. Medicinal Use of the Latin Food Staple Nopales: The Prickly Pear Cactus. *Nut. Bytes.* **1998**, *4*, 1-3.
- Havaux, M.; Kloppstech, K. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta.* **2001**, *213*, 953-966.
- Hermansen, K.; Mortensen, L.S.; Hermansen, M-L. Combining insulin with oral antidiabetic agents: effect on hyperglycemic control, markers of cardiovascular risk and disease. *Vasc. Health Risk Manag.* **2008**, *4*, 561-574.
- Hossain, P.; Kavar, B.; El Nahas, M. Obesity and Diabetes in the Developing World – A Growing Challenge. *New Eng. J. Med.* **2007**, *356*, 213-215.
- Ibañez-Camacho, R.; Meckes-Lozoya, M.; Mellado-Campos, V. The hypoglucemic effect of *Opuntia streptacantha* studied in different animal experimental models. *J. Ethnopharm.* **1983**, *7*, 175-181.
- Inagaki, A.; Sakata, T. Dietary Fibre and Gastrointestinal Function. En *Advanced Dietary Fibre Technology*; B.V. McCleary y L. Prosky, Ed. Blackwell Sci.: London, **2001**, pp.
- Kim, H.; Park, S.H. Metabolic Profiling and Discrimination of Two Cacti Cultivated in Korea Using HPLC-ESI-MS and Multivariate Statistical Analysis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2009**, *52*, 346-352.
- Kim, K.; Park, M.; Kim, H.Y. Ginsenoside Rg3 Suppresses Palmitate-Induced Apoptosis in MIN6N8 Pancreatic β -Cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2010**, *46*, 30-35.
- Klöppel, G.; Clemens, A. Insulin dependent diabetes mellitus. Current aspects of morphology, etiology and pathogenesis. *Pathologie.* **1996**, *17*, 269-275.

- Koeck, T.; Corbett, J.A.; Crabb, J.W.; Stuehr, D.J.; Aulak, K.S. Glucose-modulated tyrosine nitration in beta cells: Targets and consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *424*, 221-231.
- Kushi, L.H.; Meyer, K.A.; Jacobs, D.R. Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 451S-458S.
- Lee, E-H.; Kim, H.J.; Song, Y.S.; Jin, C.; Lee, K-T.; Cho, J.; Lee, Y.S. Constituents of the Stems and Fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 1018-1023.
- Lee, J-C.; Kim, H-R.; Kim, J.; Jang, Y-S. Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6490-6496.
- Lernmark, Å. Type I Diabetes. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1331-1338.
- Li, C.; Allen, A.; Kwagh, J.; Doliba, N.M.; Qin, W.; Najafi, H.; Collins, H.W.; Matschinsky, F.M.; Stanley, C.A.; Smith, T.J. Green Tea Polyphenols Modulate Insulin Secretion by Inhibiting Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 10214-10221.
- Lie, B.A.; Todd, J.A.; Pociot, F.; Nerup, J.; Akselen, H.E.; Joner, G.; Dahl-Jrgensen, K.; Rónningen, K.S.; Thorsby, E.; Undlien, D.E. The Predisposition to Type 1 Diabetes Linked to the Human Leukocyte Antigen Complex Includes at Least One Non-Class II Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **1999**, *64*, 793-800.
- Liu, B.; Asare-Anane, H.; Al-Romaiyan, A.; Huang, G.; Amiel, S.A.; Jones, P.M.; Persaud, S.J. Characterization of the Insulinotropic Activity of an Aqueous Extract of *Gymnema sylvestre* in Mouse β -Cells and Human Islets of Langerhans. *Cell Physiol. Biochem.* **2009**, *23*, 125-132.

- Liu, D.; Zhen, W.; Yang, Z.; Carter, J.D.; Si, H.; Reynolds, K.A. Genistein Acutely Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells Through a cAMP-Dependent Protein Kinase Pathway. *Diabetes*. **2006**, *55*, 1043-1050.
- López-de la Torre, M. La insulina en el tratamiento de la diabetes mellitus. En *La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica*; F.J. Tébar-Massó; F. Escobar-Jiménez; Ed. Médica Panamericana: Madrid, **2009**; pp. 104-113.
- López-García, J.J.; Fuentes-Rodríguez, J.M.; Rodríguez-Gámez, A. Producción y uso de Opuntia como forraje en el centro-norte de México. En *El nopal (Opuntia spp.) Como Forraje*; C. Mondragón-Jacobo; S. Pérez-González. Página web <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s00.htm#Contents> (actualizada en 2003, accesada Enero 2010).
- Ma, W.W.; Jiang, X.Y.; Cooks, R.G.; McLaughlin, J.L. Cactuc alkaloids, LXI. Identification of mescaline and related compounds in eight additional species using TLC and MS/MS. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 735-737.
- McCarthy, M.I. Progress in defining the molecular basis of type 2 diabetes mellitus through susceptibility-gene identification. *Hum. Mol. Gen.* **2004**, *13*, R33-R41.
- Mahan, K.L.; Escott-Stump, S. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Ed.; McGraw Hill: México, **2001**; pp. 805-846.
- Matarese, L.E.; Gottschlich, M.M. *Nutrición Clínica Práctica*. Ed.; Elsevier: Madrid, **2004**; pp. 214-215.
- Merriman, T.R. Type 1 diabetes, the A1 milk hypothesis and vitamin D deficiency. *Diab. Reas. Clin. Prac.* **2009**, *83*, 149-156.
- Miller, G.L. use of dinitrosalicylic acid reagent for determining reducing sugars. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426-428.
- Molitch, M.E. Complications of Diabetes Mellitus and Implications for Nutrition Theraphy. En *Handbook of Diabetes Medical Nutrition Therapy*; M.A. Powers, Ed.; Aspen Publications Inc.: Maryland, **1996**; pp. 15-30.

- National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases. Página web <http://www.niddk.nih.gov/> (accesada Enero 2010)
- Nomura, E.; Kashiwada, A.; Hosoda, A.; Nakamura, K.; Morishita, H.; Tsuno, T.; Taniguchi, H. Synthesis of Amide Compounds of Ferulic Acid, and Their Stimulatory Effects on Insulin Secretion In Vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3807-3813.
- Norman, A.G. The Composition of Crude Fibre. *J. Agric. Sci.* **1935**, *25*, 529-540.
- Nuutila, A.M., Kammiovirta, K., Oksman-Caldentey, M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem.* **2002**, *76*, 519-525.
- Organización Mundial de la Salud. Página web <http://www.who.int> (accesada Enero 2010).
- Park, S.; Ahn, I.S.; Kwon, D.Y.; Ko, B.S.; Jun, W.S. Ginsenosides Rb1 and Rg1 Suppress Triglyceride Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes and Enhance β -Cell Insulin Secretion and Viability in Min6 Cells via PKA-Dependent Pathways. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 2815-2823.
- Pena-Valdivia, B.C.; Sanchez-Urdaneta, B.A. Nopalito and Cactus Pear (*Opuntia spp.*) Polysaccharides: Mucilage and Pectin. *Acta Hort.* **2006**,
- Powers, M.A. Medical Nutrition Therapy for Diabetes.. En *Handbook of Diabetes Medical Nutrition Therapy*; M.A. Powers, Ed.; Aspen Publications Inc.: Maryland, **1996**; pp. 33-48.
- Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodhill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273-3279.
- Proméxico. Investigación de Mercado del Nopal Comestible. Fresco, en Salmuera y Deshidratado. Página web

<http://www.sfa.gob.mx/Comercializacion/PerfilMercadoNOPALJapon.pdf>

(Actualizado en septiembre 2007).

Qiu, Y.; Chen, Y.; Pei, Y.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Constituents with Radical Scavenging Effect from *Opuntia dillenii*: Structures of New α -Pyrone and Flavonol Glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1507-1510.

Reynolds, S.G.; Ariás-Jiménez. Introducción.. En *El nopal (Opuntia spp.) Como Forraje*; C. Mondragón-Jacobo; S. Pérez-González. Página web <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s00.htm#Contents> (actualizada en 2003, accesada Enero 2010).

Rees, D.A.; Alcolado, J.C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **2005**, *22*, 359-370.

Richer, M.J.; Horwitz, M.S. Coxsackievirus infection as an environmental factor in the etiology of type 1 diabetes. *Autoimm. Rev.* **2009**, *8*, 611-615.

Rodríguez-Felix, A.; Cantwell, M. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum Nutr.* **1988**, *83*, 83-93.

Rodríguez-García, M.E.; de Lira, C.; Hernández-Becerra, E.; Cornejo-Villegas, M.A.; Palacios-Fonseca, A.J.; Rojas-Molina, I.; Reynoso, R.; Quintero, L.C.; Del-Real, A.; Zepeda, T.A.; Muñoz-Torres, C. Physicochemical Characterization of Nopal Pads (*Opuntia ficus indica*) and Dry Vacuum Nopal Powders as a Function of the Maturation. *Plant Foods Hum Nutr.* **2007**, *62*, 107-112.

Ross, I.A. Medicinal Plants of the World-Chemical Constituents, Traditional and Modern Uses. En *A novel Steroid from Elephantopus scaber L. an Ethnomedical plant with antidiabetic activity*; P. Daisy; R. Jasmine; S. Ignacimuthu; Murugan, E. *Phytomed.* **2009**, *16*, 252-257.

Ruiz, M.; Giannaula, C. Hipoglucemiantes orales. En *Diabetes Mellitus*; M. Ruiz, Ed. AKADIA: Buenos Aires, **2006**; pp. 218-231.

Sáenz, C. Cladodes: a Source of Dietary Fiber. *J.PACD.* **1997**, *2*, 117-123.

- Sáenz, C.; Sepúlveda, E.; Pak, N.; Vallejos, X. Uso de fibra dietética de nopal en la formulación de un polvo para flan. *Arch. Lat. Nutr.* **2002**, *54*, 387-392.
- Sáenz, C. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de servicios agrícolas del a FAO: Roma **2006**.
- Saleem, M.; Kim, H.J.; Han, C.K.; Jin, C.; Lee, Y.S. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Phytochem.* **2006**, *67*, 1390-1394.
- Saleem, R.; Ahmad, M.; Azmat, A.; Ahmad, S.I.; Faizi, Z.; Abidi, L.; Faizi, S. Hypotensive Activity, Toxicology and Histopathology of Opuntioside-I and Methanolic Extract of *Opuntia dillenii*. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1844-1851.
- Sánchez-Castillo, C.P.; Dewey, P.J.S.; Solano, M.L.; Finney, S.; James, W.P.T. The Dietary Fiber Content (Nonstarch Polysaccharides) of Mexican Fruits and Vegetables. *J. Food Comp. Analysis.* **1995**, *8*, 284-294.
- Saltiel, A.R.; Kahn, R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nat.* **2001**, *414*, 799-806.
- Santos, D.B.; Lorenzana-Jiménez, M.; Magos-Guerrero, G.A. Utilidad del nopal para el control de la glucosa en diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **2006**, *49*, 157-162.
- Secretaría de Fomento Agropecuario. Perfil de mercado producto-país para nopal elaborado a favor del gobierno de Baja California. Página web: <http://www.sfa.gob.mx/Comercializacion/EstudioMercadoNopalLA.pdf> (Consultada en Mayo 2010).
- Sereday, M.S.; Martí, M.L. Epidemiología de la diabetes en Latinoamérica. En *Diabetes Mellitus*; M. Ruiz, Ed.; AKADIA: Buenos Aires, **2006**; pp. 8-12.
- Sergeira, V.J. Controlo de Qualidade de Suplementos Alimentares Derivados de Plantas. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidade Nova de Lisboa, **2009**.

- Shane-McWhorter, L. Biological Complementaty Therapies. A Focus on Botanical Products in Diabetes. *Diabetes Spectrum*. **2001**, *14*, 199-208.
- Sharma, B.; Viswanath, G.; Salunke, R.; Roy, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chem*. **2008**, *110*, 697-705.
- Shoelson, S.E.; Halban, P.A. Insulin Biosynthesis and Chemistry. En *Joslin's Diabetes Mellitus 13^a edición*; C.R. Kahn; G.C. Weir. Ed.; Lea y Febriger: Malvern, **1994**; pp. 29-55.
- Sherwood, L. Human Physiology: From Cells to Systems. Ed.; Brooks/Cole: Belmont, **2004**; pp. 700-747.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de siembras y cosechas. Página web <http://www.siap.gob.mx/> (accesada Enero 2010).
- Sistema Nacional de Información en Salud. Defunciones y tasa de mortalidad general por año de registro. Página web <http://www.sinais.salud.gob.mx/> (accesada Enero 2010).
- Soriano-Perera, P.; de Pablos-Velasco, P.L. Fármacos insulino-sensibilizadores. En *La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica*; F.J. Tébar-Massó; F. Escobar-Jiménez; Ed. Médica Panamericana: Madrid, **2009**; pp. 149-155.
- Stachura, M.E. Pathophysiology.. En *Handbook of Diabetes Medical Nutrition Therapy*; M.A. Powers, Ed.; Aspen Publications Inc.: Maryland, **1996**; pp. 3-14.
- Stintzing, F.; Carle, R. Review. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res*. **2005**, *49*, 175-194.
- Telang, S.A. 2-hydroxymethyl-4-methoxy- α -pyrone from *Opuntia polycantha*. *Phytochem*. **1973**, *12*, 2059.
- Thom, S.L. Diabetes Medications and Delivery Methods. En *Handbook of Diabetes Medical Nutrition Therapy*; M.A. Powers, Ed.; Aspen Publications Inc.: Maryland, **1996**; pp. 77-100.

- Trejo-González, A.; Gabriel-Ortiz, G.; Puebla-Pérez, A.M.; Huízar-Contreras, M.D.; Munguía-Mazariegos, M.R.; Mejía-Arreguín, S.; Calva, E. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *J. Ethnopharm.* **1996**, *55*, 27-33.
- Tuomi, T. Type 1 and Type 2 Diabetes: What Do They Have in Common? *Diab.* **2005**, *54*, S40-S45.
- Turner, W.; Heyman, J. Notes: The Presence of Mescaline in *Opuntia cylindrica*. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 2250-2251.
- Vigeras, A.L.; Portillo, L. Uses of *Opuntia* species and the potential impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in Mexico. *Flor. Entom.* **2001**, *84*, 493-498.
- Vinson, J.A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5315-5321.
- Virkamäki, A.; Ueki, K.; Kahn, C.R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance. *J. Clin. Inv.* **1999**, *103*, 931-943.
- Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4026-4037.
- Yang, N.; Zhao, M.; Zhu, B.; Yang, B.; Chen, C.; Cui, C.; Jiang, Y. Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Inn. Food Sci. and Emerg. Tech.* **2008**, *9*, 570-574.
- Zhao, M.; Yang, N.; Yang, B.; Jiang, Y.; Zhang, G. Structural characterization of water-soluble polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladodes in relation to their anti-glycated activities. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1480-1486.

Anexo A: Cromatogramas de los extractos crudos

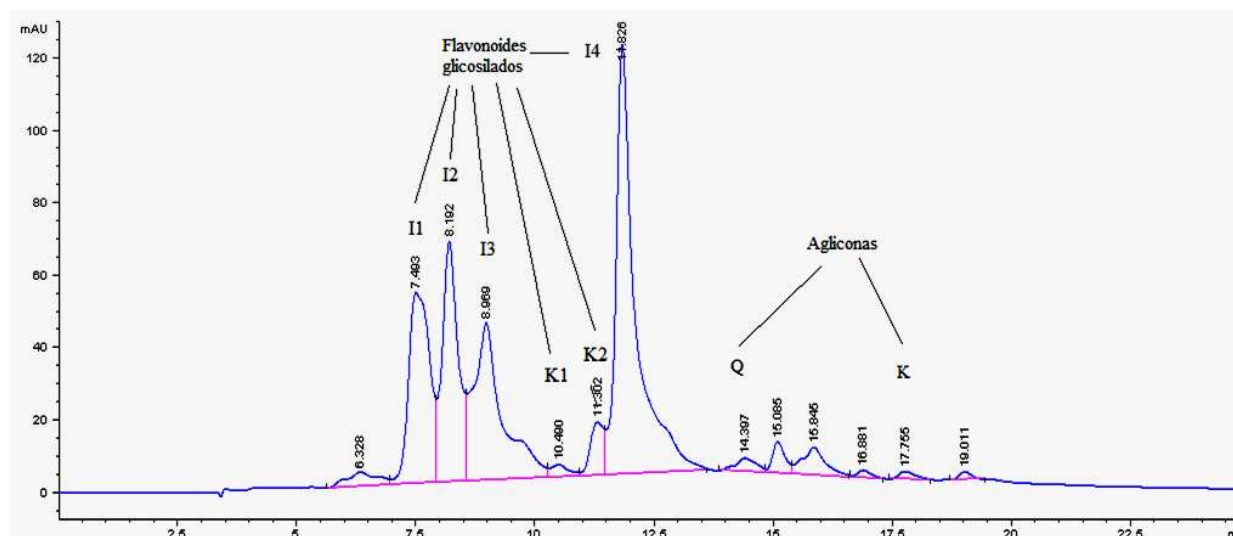


Figura A.1: Cromatograma del extracto crudo de *O. ficus-indica* var. *Jalpa*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósil-rhamnósido, (I2) Isorhamnetina-glucosil-rhamnósil-xilósido o arabinósido, (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnósil-rhamnósido, (K1) Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol

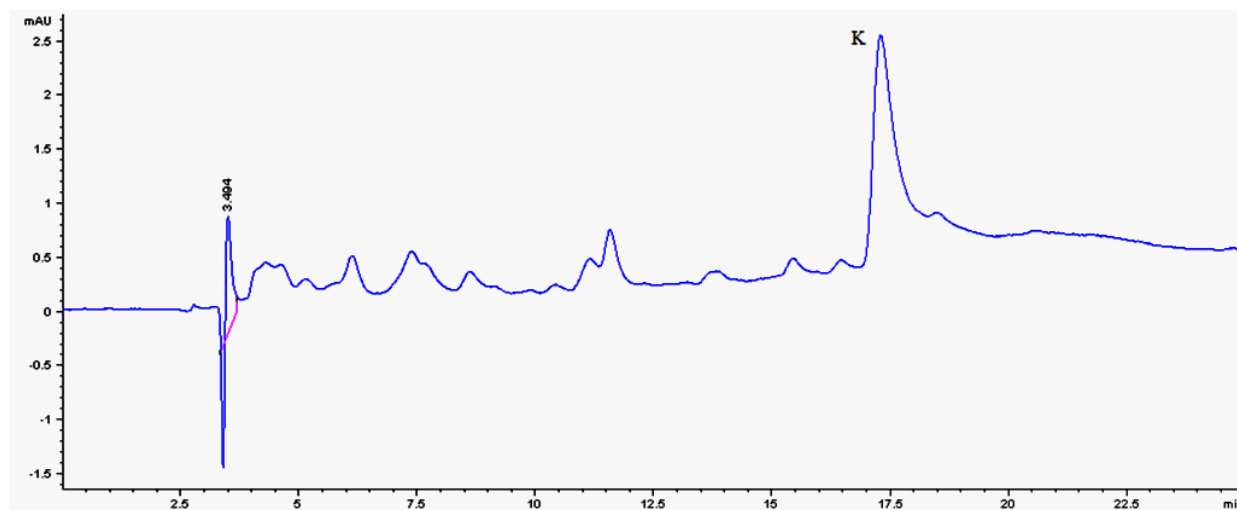


Figura A.2: Cromatograma del extracto crudo de *O. lindheimeri* var. *silvestre Santa Emilia*. (K) Kaempferol.

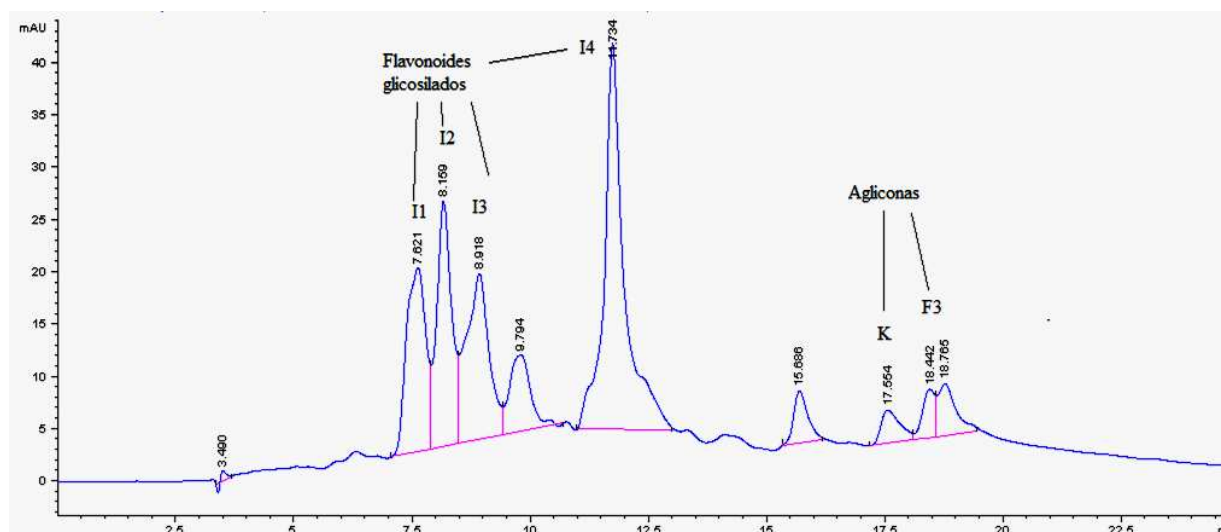


Figura A.3: Cromatograma del extracto crudo de *O. robusta* var. *Gavia*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I2) Isorhamnetina-glucosil-rhamnósido-xilósido o arabinósido, (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnósido-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol

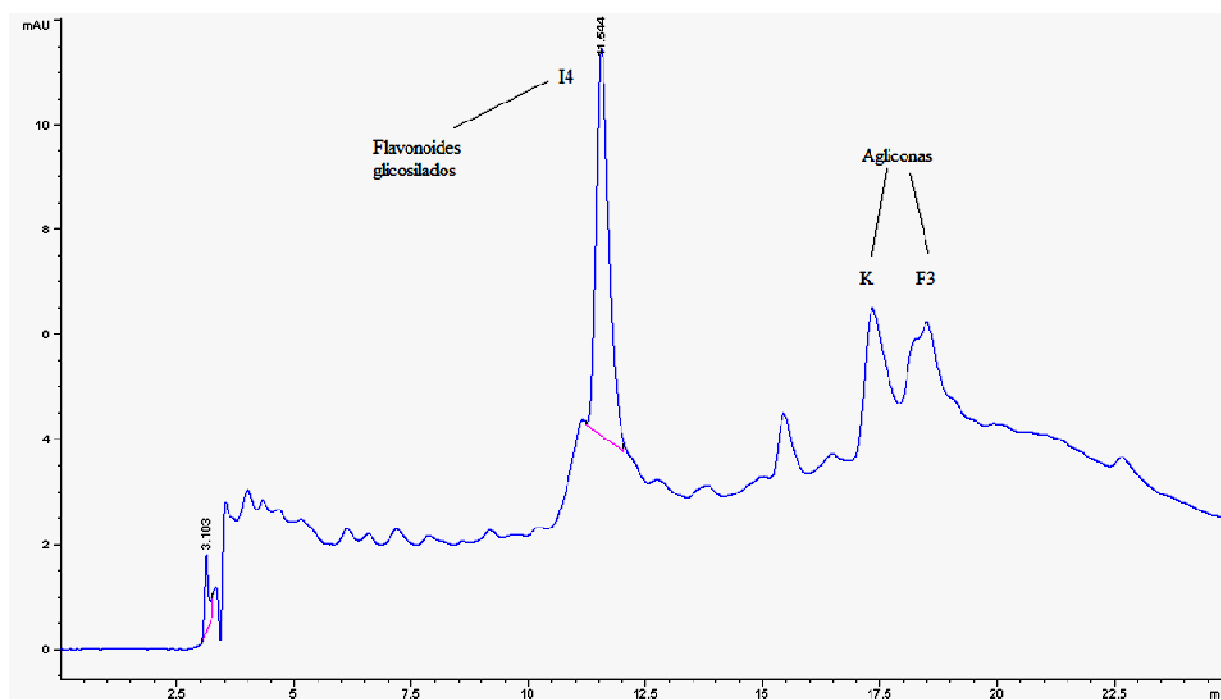


Figura A.4: Cromatograma del extracto crudo de *O. streptacantha* var. *Cardón*. (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnósido-rhamnósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamósido, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

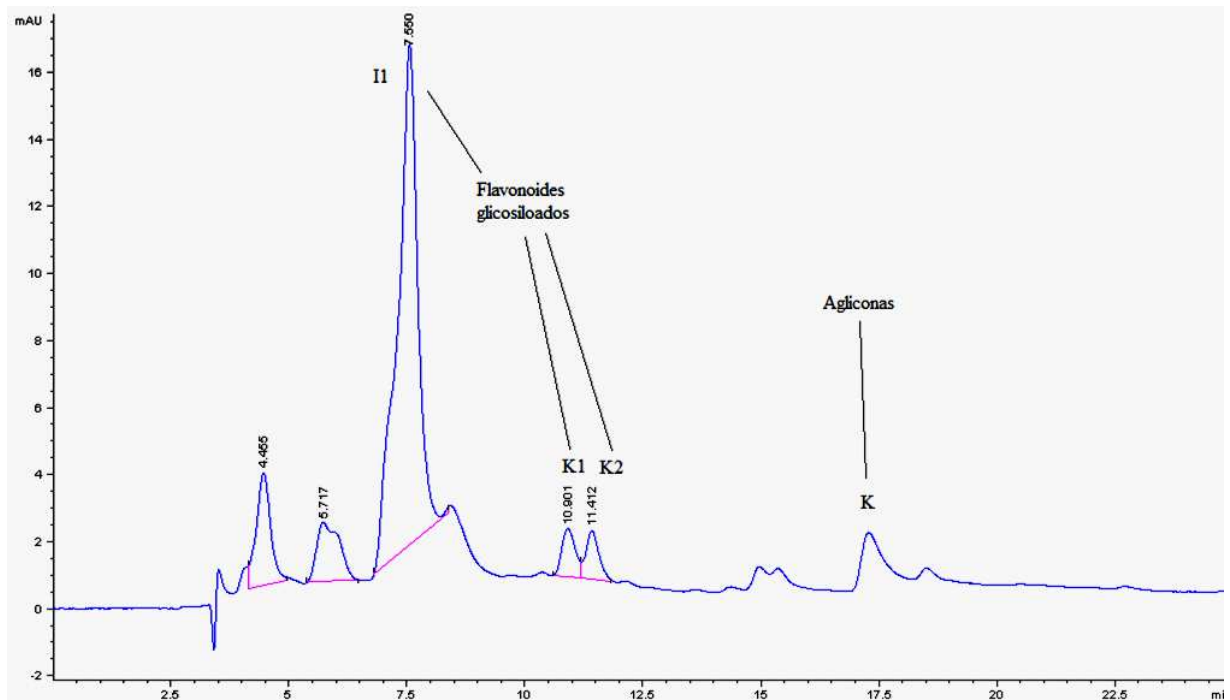


Figura A.5: Cromatograma del extracto crudo de *O. undulata* var. *Oreja de elefante*. (II) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (K1) Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (K) Kaempferol.

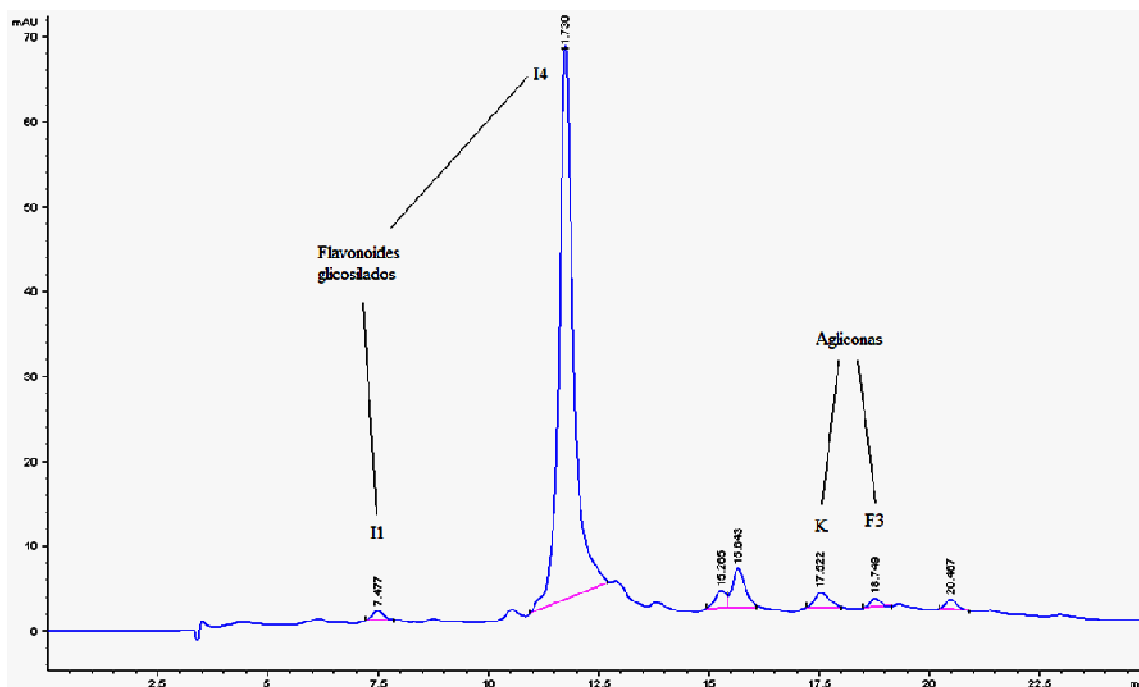


Figura A.6: Cromatograma del extracto crudo de *O. rastrea*. (II) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamósido, (K) Kaempferol, (E3) Flavonoide 3.

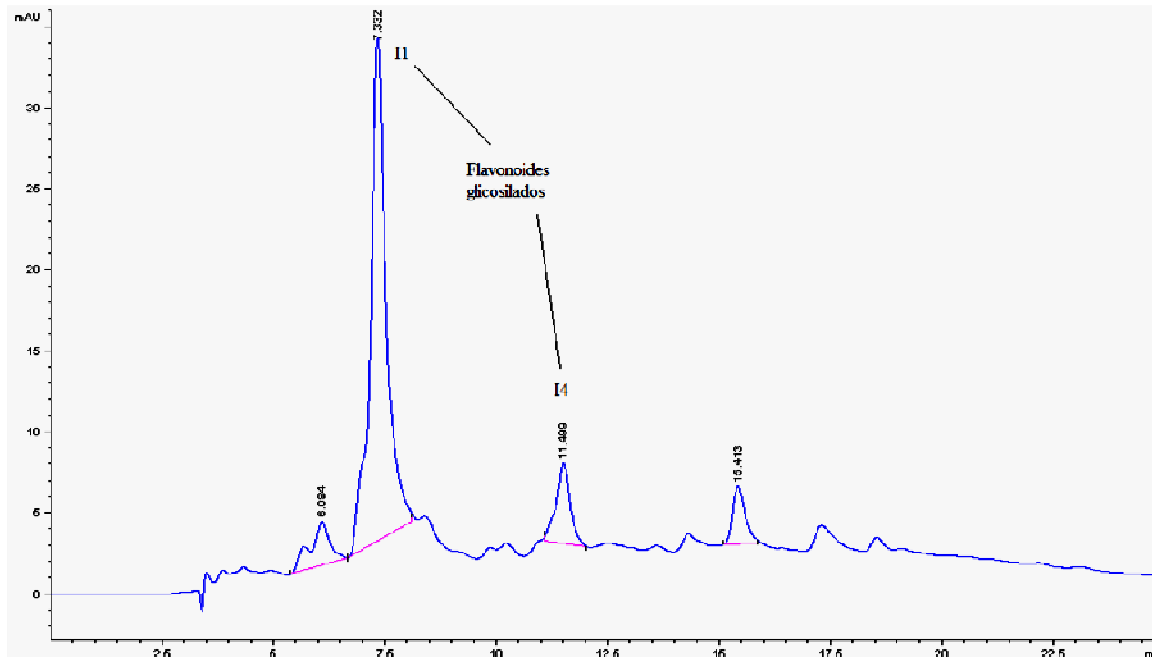


Figura A.7: Cromatograma del extracto crudo de *O. robusta* var. *Tapón*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamósido.

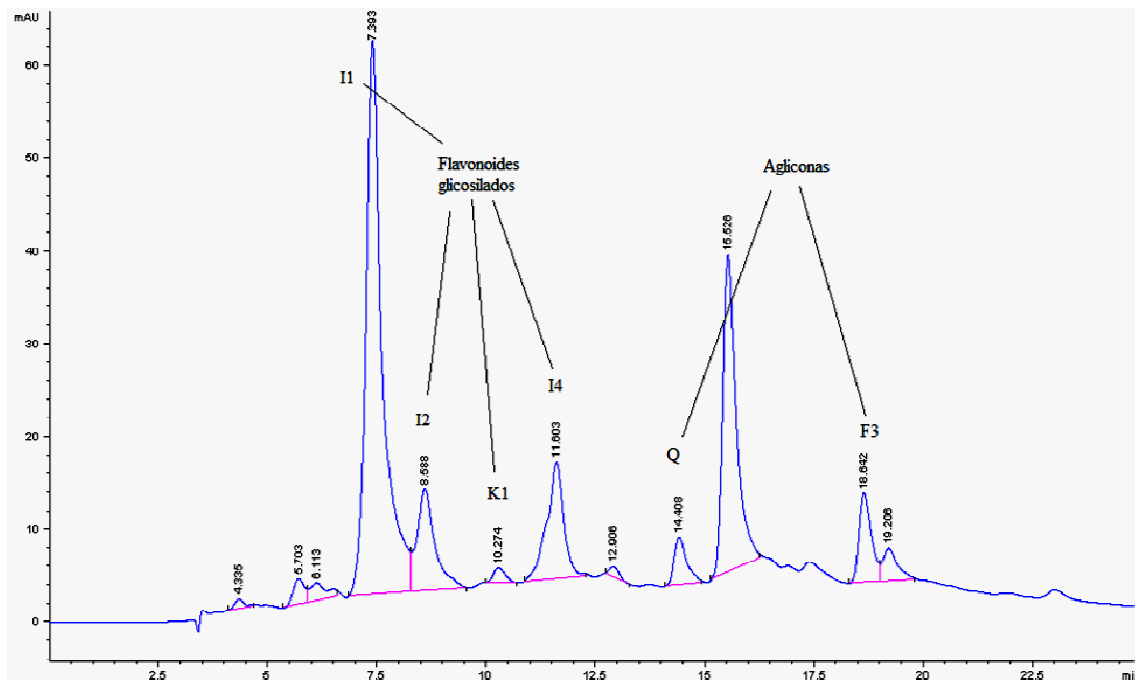


Figura A.8: Cromatograma del extracto crudo de *O. leucotricha* var. *Duraznillo*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I2) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido, (K1) Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol.

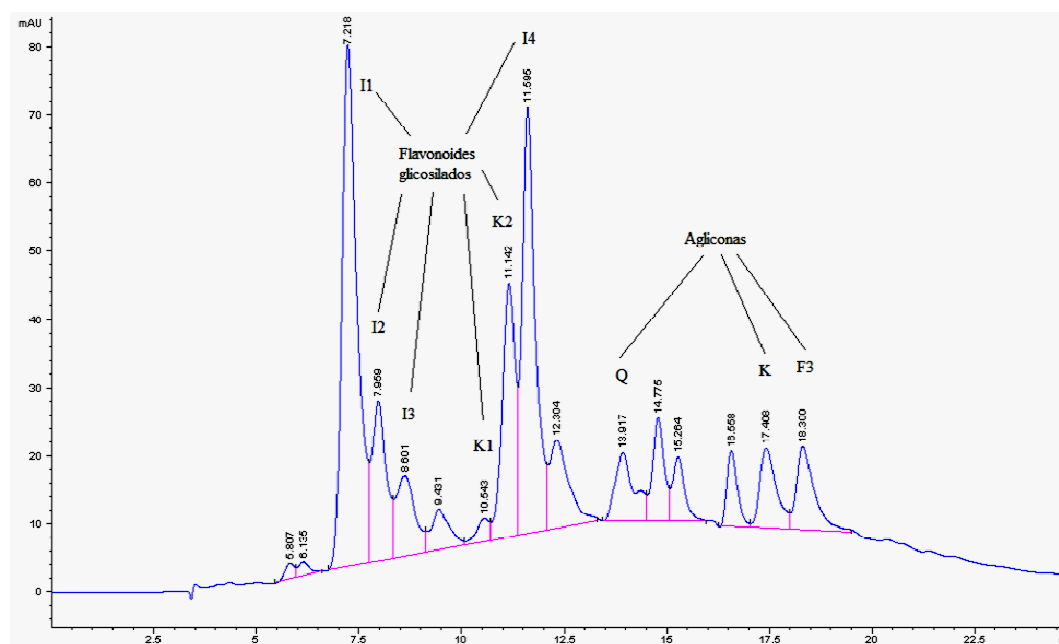


Figura A.9: Cromatograma del crudo hidrolizado de *O. ficus-indica* var. *Villanueva*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide 3

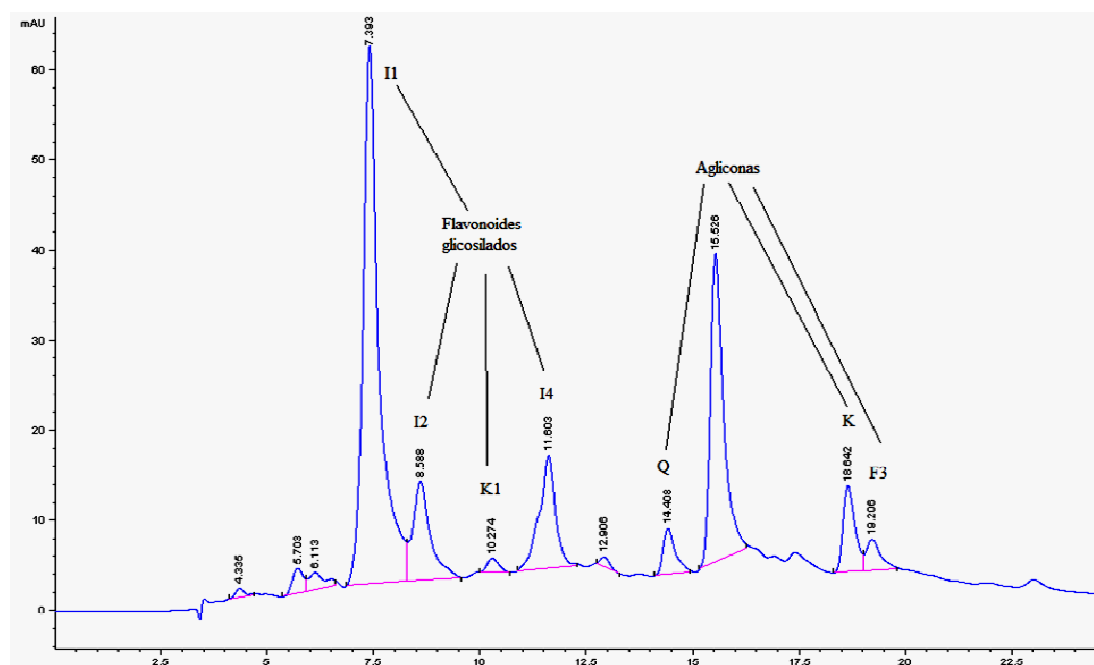


Figura A.10: Cromatograma del extracto hidrolizado de *N. cochenillifera* var. *Santa Emilia*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I2) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido, (K1) Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (K) Kaempferol, (Q) Quercetina, (F3) Flavonoide 3

Anexo B: Cromatogramas de los extractos hidrolizados

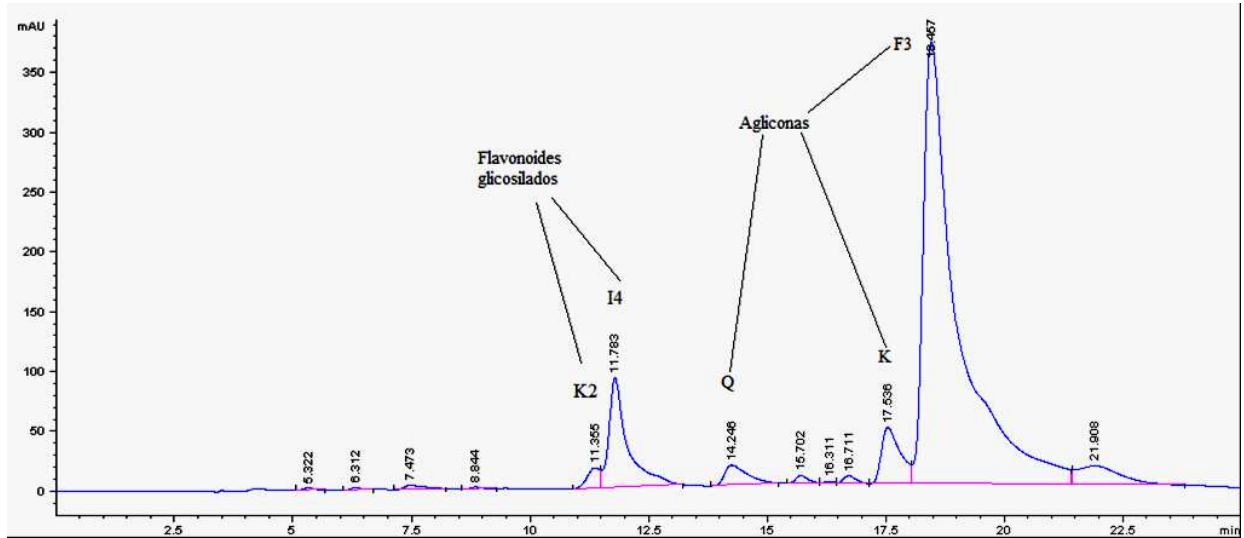


Figura B.1: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. ficus-indica* var. *Jalpa*. (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

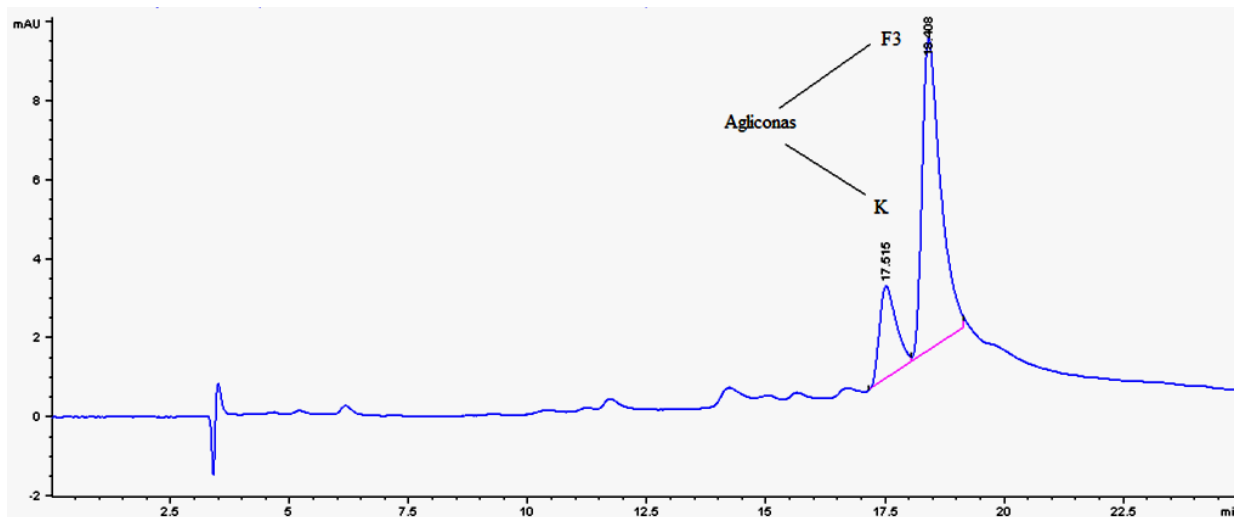


Figura B.2: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. lindheimeri* var. *silvestre Santa Emilia*. (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

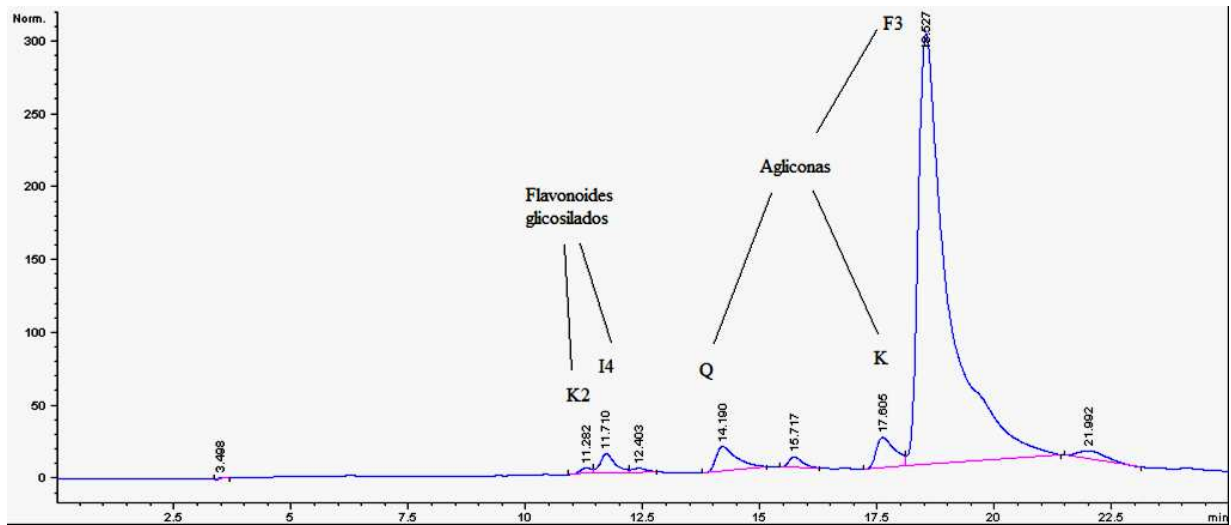


Figura B.3: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. robusta* var. *Gavia*. (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

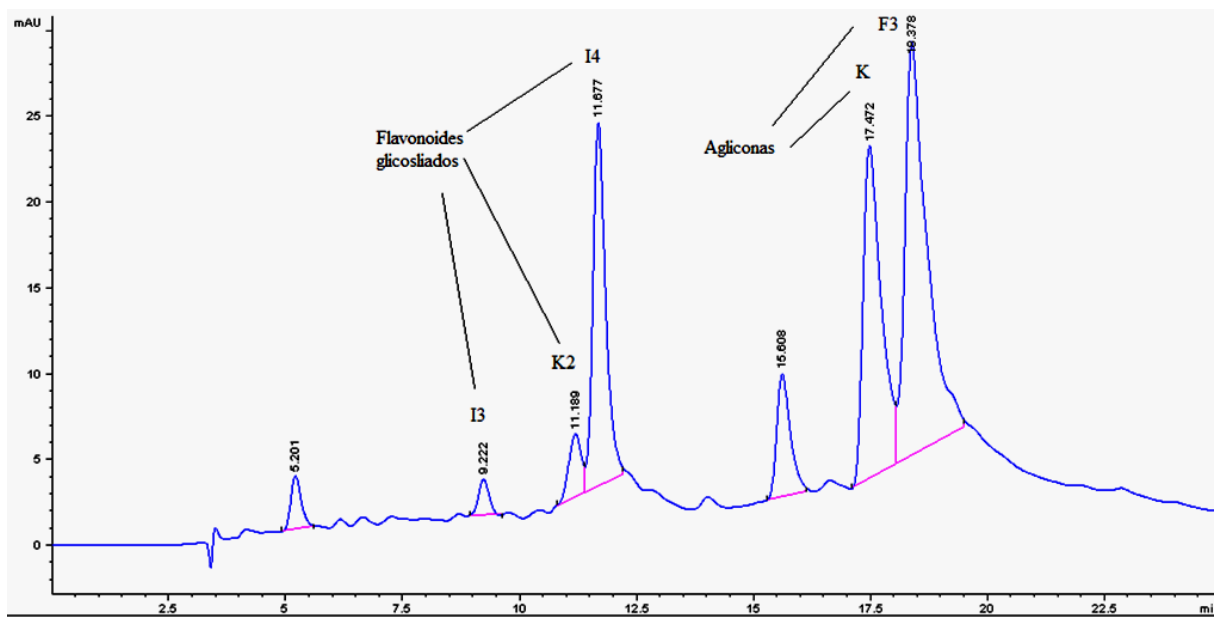


Figura B.4: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. streptacantha* var. *Cardón*. (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnosido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

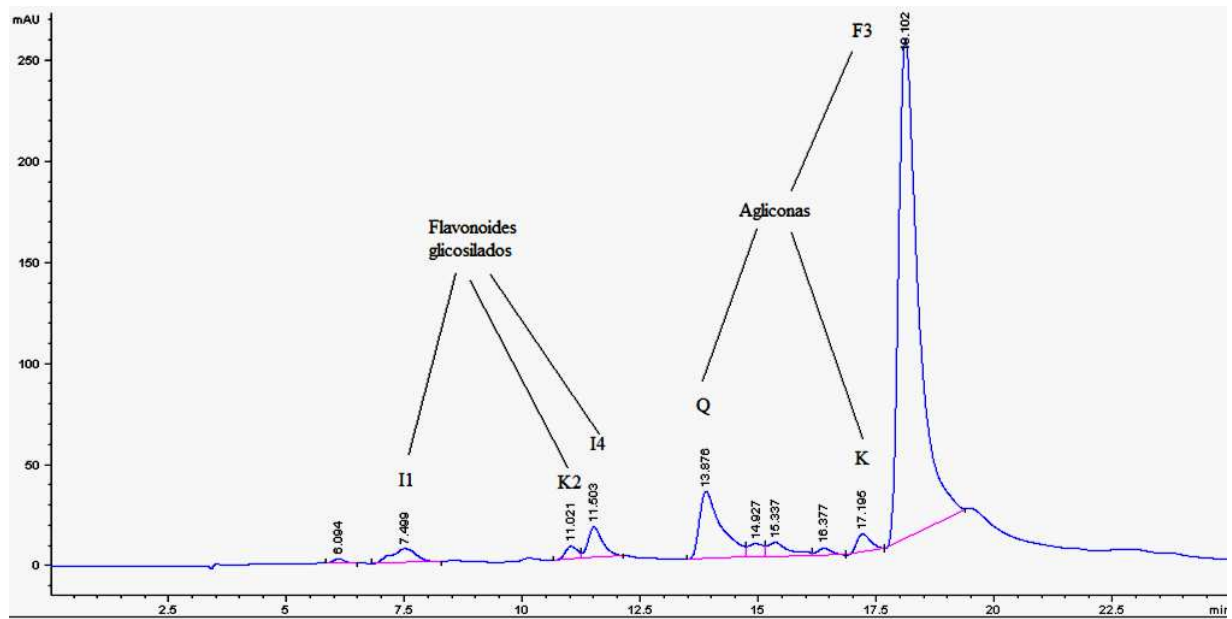


Figura B.5: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. undulata* var. *Oreja de elefante*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósil-rhamnósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

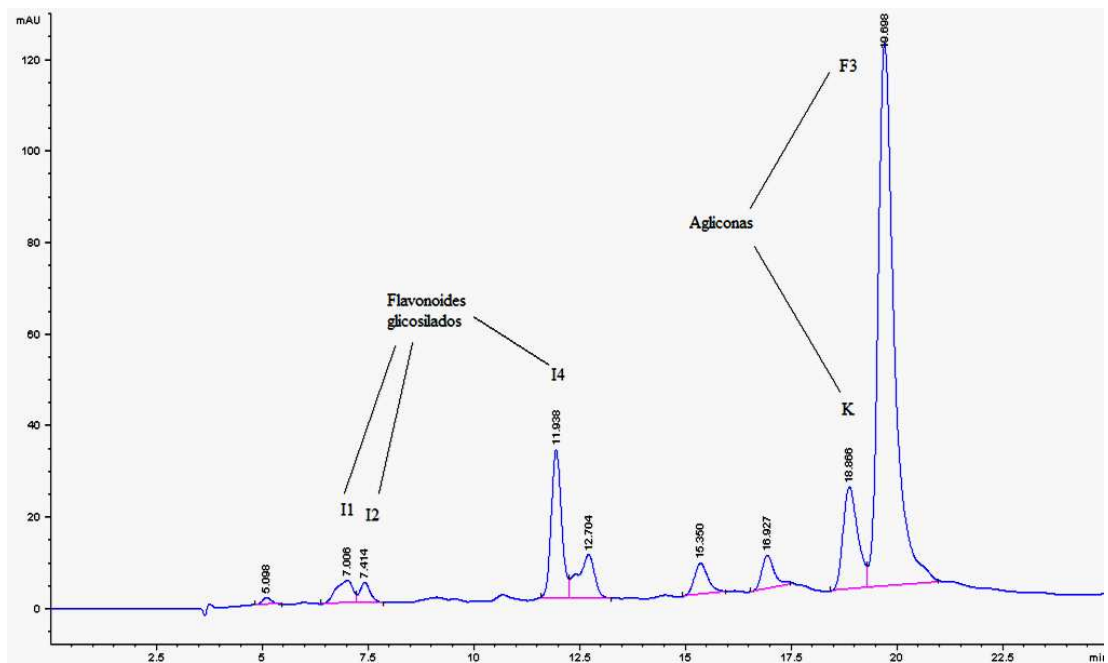


Figura B.6: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. rastrera* var. *rastrera*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósil-rhamnósido, (I2) Isorhamnetina-glucosil-rhamnósil-xilósido o arabinósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

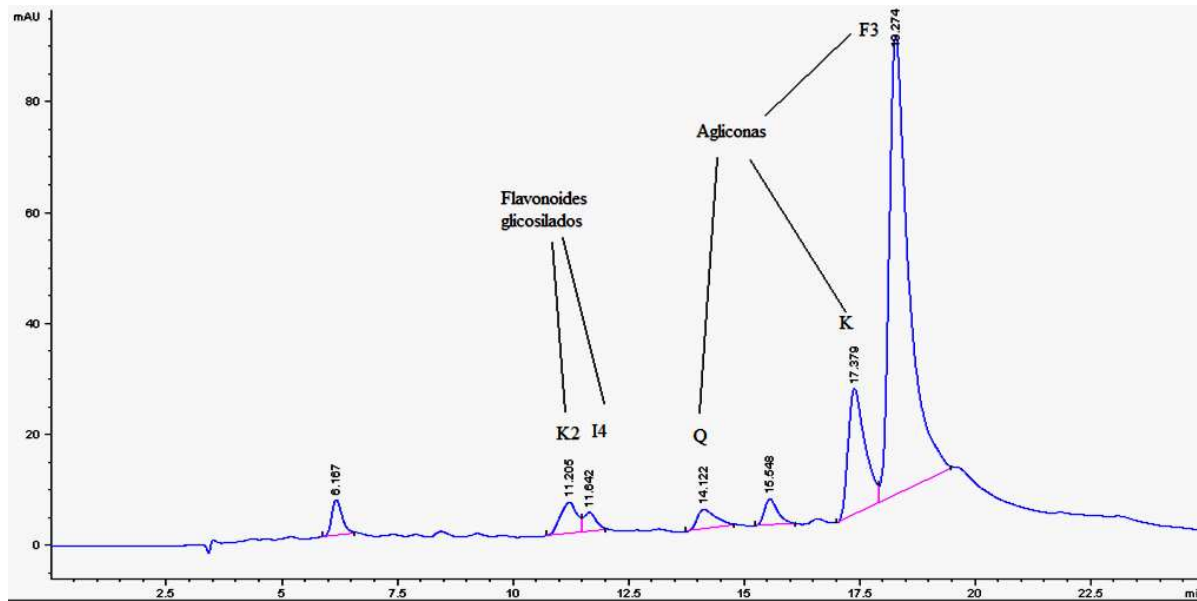


Figura B.7: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. robusta* var. *Tapón*. (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

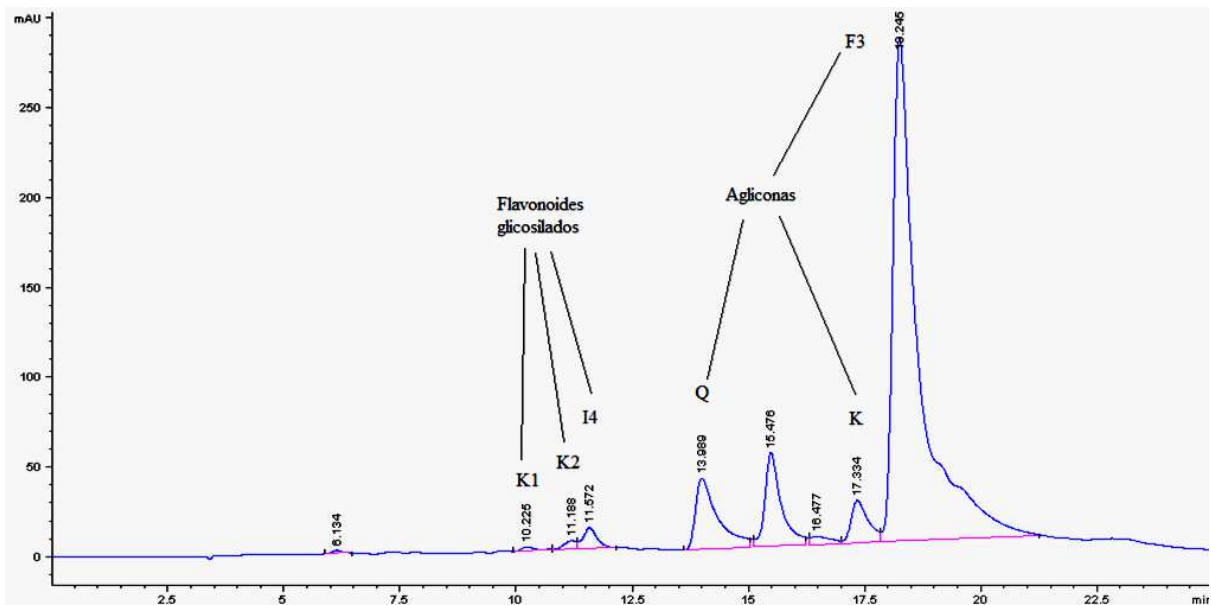


Figura B.8: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. leucotricha* var. *Duraznillo*. (K1) Kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide-3.

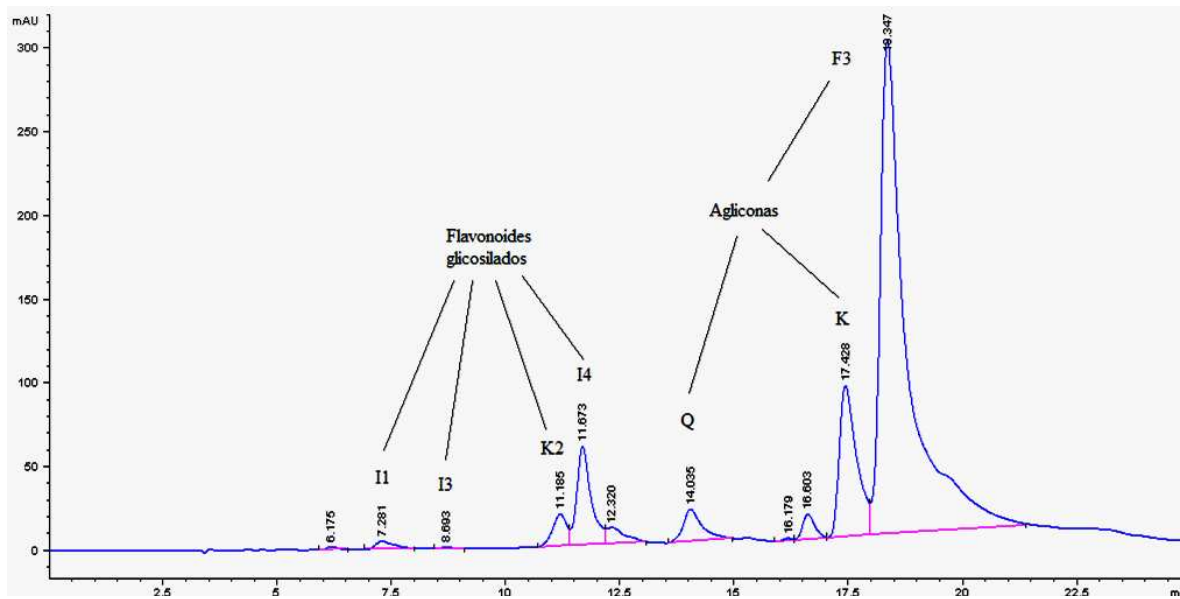


Figura B.9: Cromatograma del extracto hidrolizado de *O. ficus-indica* var. *Villanueva*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (I3) Isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide 3

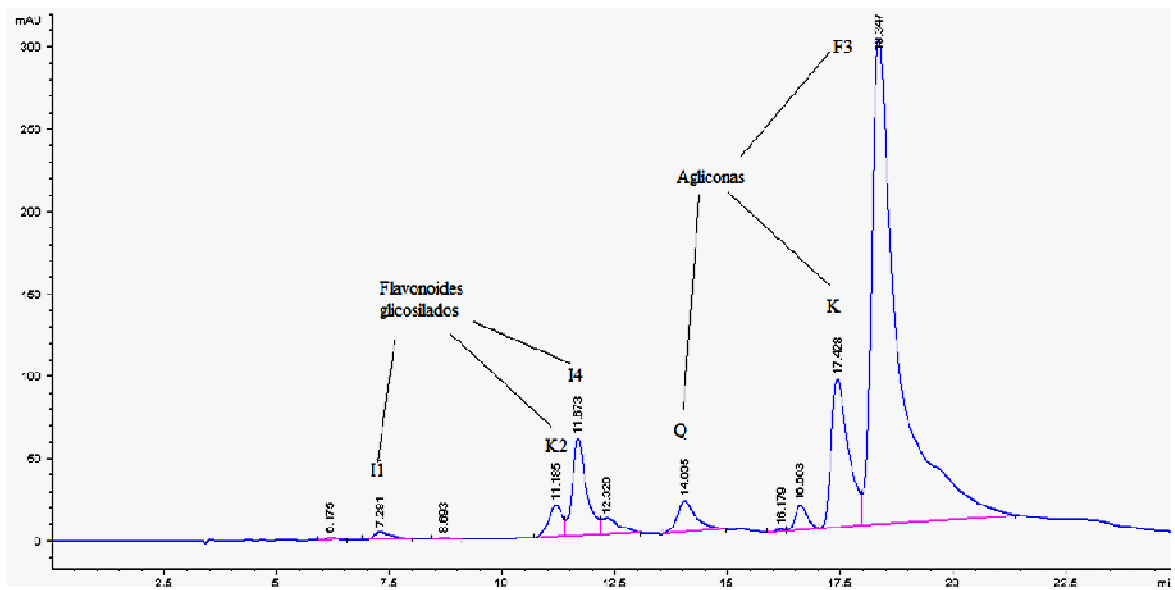


Figura B.10: Cromatograma del extracto hidrolizado de *N. cochenillifera* var. *Santa Emilia*. (I1) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido, (K2) Kaempferol-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (I4) Isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnósido, (Q) Quercetina, (K) Kaempferol, (F3) Flavonoide 3

Anexo C: Espectros de absorción UV-visible de los glicósidos

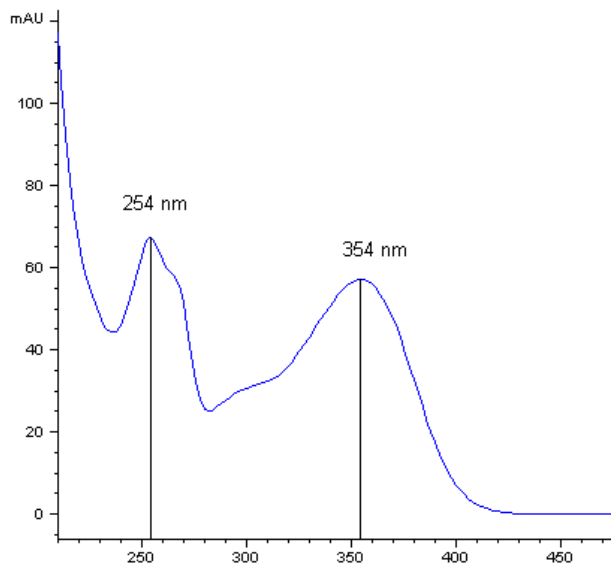


Figura C.1: Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-3-*O*-glucosil-rhamnosil-rhamnósido (tiempo de elución = 7.5 min)

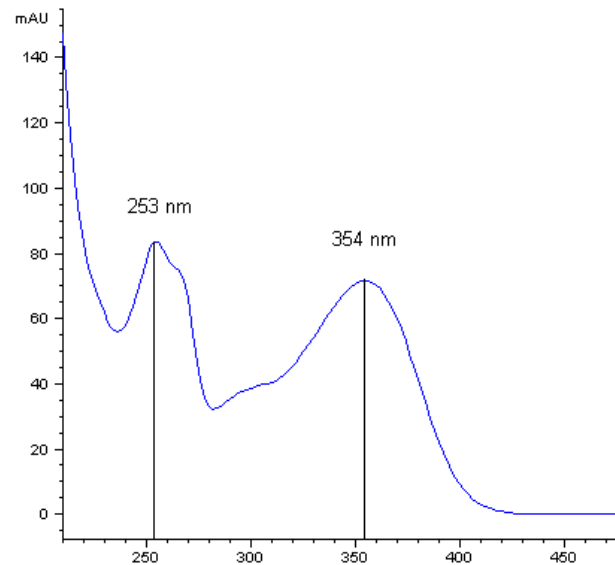


Figura C.2: Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-xilósido o arabinósido (tiempo de elución = 8.2 min)

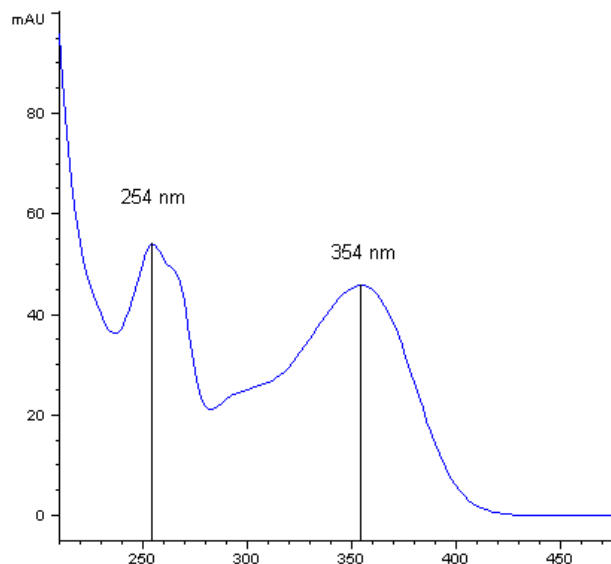


Figura C.3: Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-glucosil-rhamnosil-rhamnosido (tiempo de elución = 8.9 min)

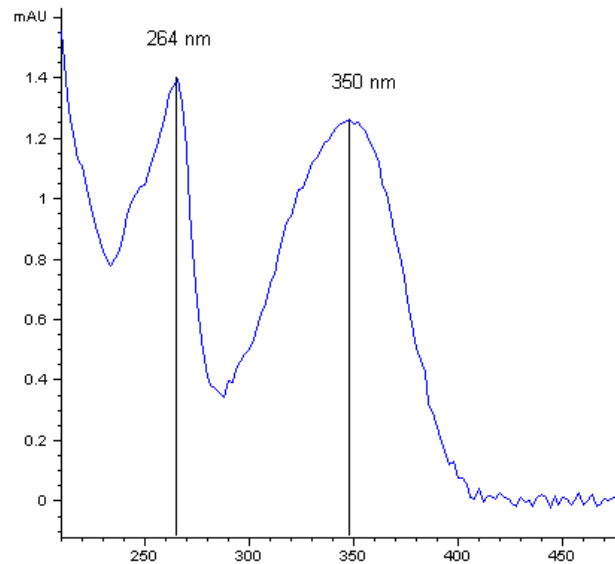


Figura C.4: Espectro de absorción UV-visible de kaempferol-glucosil-xilósido o arabinósido (tiempo de elución = 10.5 min)

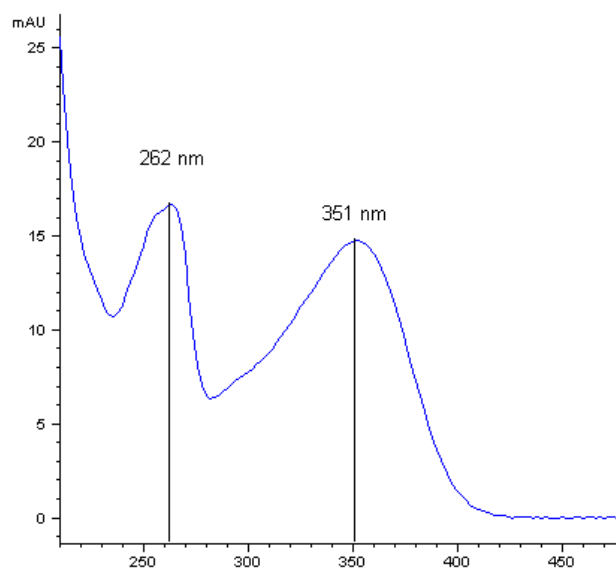


Figura C.5: Espectro de absorción UV-visible de kaempferol-3-O-glucosil-rhamnósido (tiempo de elución = 11.3 min)

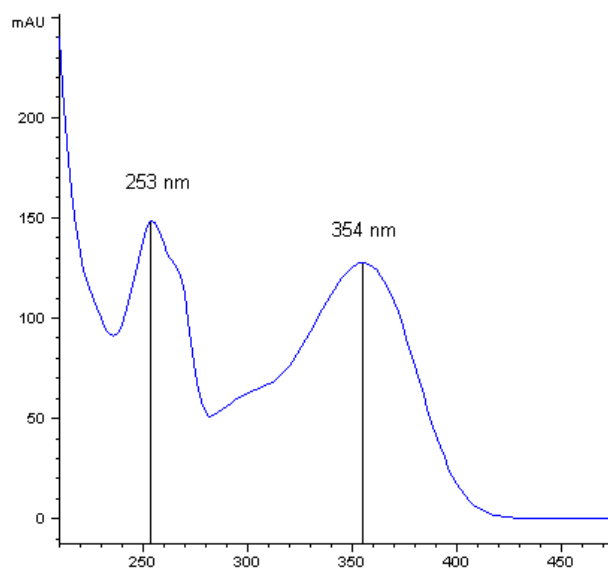


Figura C.6: Espectro de absorción UV-visible de isorhamnetina-3-O-glucosil-rhamnósido (tiempo de elución = 11.8 min)