

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)

Escuela de Post-Grado

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO



EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS *ANNONA MURICATA* L. (“GUANÁBANA”) SOBRE LA HIPERGLICEMIA INDUCIDA CON ALOXANO EN RATAS

Tesis

Para optar al Grado Académico de Magíster en
Farmacología con Mención en Farmacología Experimental

Christian Manuel Palomino Flores

Lima Perú
2007

A mis padres y en especial a mi madre

AGRADECIMIENTOS

Mi más amplio agradecimiento para mi asesor de Tesis el Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo quien con sus conocimientos, tiempo, paciencia e interés hizo posible la realización de la Tesis y me brindo todas las facilidades del laboratorio para ejecutar el trabajo de investigación.

A mi querida madre que me demuestra que con voluntad y determinación los sueños se pueden convertir en realidad.

A Sonia quien siempre esta presente en los momentos difíciles para alentarme y ayudarme alcanzar mis objetivos.

Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento a quienes estuvieron vinculados de alguna manera a este trabajo de investigación: asistentes del laboratorio y amigos.

A todos mi mayor reconocimiento y gratitud

Índice

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Abreviatura	iv
Summary	v
Resumen	vi
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	2
2.1 Descripción	3
2.2 Antecedentes y Usos	3
III. MATERIALES Y METODOS	6
3.1 Material biológico	6
3.2 Equipos y Reactivos	6
3.3 Metodología	7
3.3.1 Estudio fitoquímico preliminar	7
3.3.2 Preparación del extracto etanólico	9
3.3.3 Inducción de la diabetes	9
3.3.4 Dosaje de Insulina	10
3.3.5 Estudio histopatológico	10
3.3.6 Análisis estadístico	11
IV RESULTADOS	12
4.1 Estudio Taxonómico y Fitoquímico	12
4.2 Efecto de la actividad hipoglicemiante en ratas diabéticas	12
4.3 Efecto sobre el nivel de insulina	12

4.4 Efecto sobre el páncreas, hígado y riñón	13
V Discusión	32
VI Conclusión	36
VII Referencia Bibliograficas	37

ABREVIATURAS

AH ₂	ácido dialúrico
ATP	adenosina trifosfato
DPP-IV	dipeptidil peptidasa IV
GLP-1	péptido similar a glucagon
GLUT-2	transportador de glucosa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
OH	radical hidroxilo
O ₂	radical superóxido
PPARs	receptor proliferador de peroxisomas
PPAR- γ	receptor proliferador de peroxisomas gama
ROS	especie reactiva de oxígeno

RESUMEN

El propósito de la presente investigación fue determinar el efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas al administrar el extracto etanólico de *Annona muricata* L. (Guanábana) en ratas diabéticas inducidas con aloxano. Materiales: hojas de *Annona muricata* L. (Guanábana), y 36 ratas machos de 3 meses de edad, cepa Holtzmann con un peso promedio (210±10g) recibieron agua y alimento a libertad, con un periodo de aclimatación de siete días y fueron randomizados y divididos en seis grupos (normal, control aloxano, tres dosis del extracto (200, 400 y 600mg/kg) y glibenclamida 5 mg/kg, diariamente durante 5 días; Método: la diabetes fue inducida en ratas por inyección intraperitoneal de aloxano monohidratado a dosis de 130mg/kg a todos los animales excepto al grupo normal. Después de 24 horas los animales que presentaron un nivel de glucosa sanguínea > 250mg/dL fueron usadas para el estudio, los niveles de glucosa en sangre fueron determinados usando un glucómetro electrónico (Optium) y se midió los niveles de insulina mediante el método de Sándwich según Gonzáles y col. También se realizó el estudio histopatológico de páncreas, hígado y riñón. Resultados: al administrar 200mg/kg del extracto etanólico se observó mayor efecto hipoglicemiante ($p < 0.05$) y mejor protección del páncreas, hígado y riñón del daño causado por aloxano según el estudio histopatológico. Los hallazgos posiblemente justifican porque los alcaloides podrían inducir secreción de insulina (García López et al., 2004); los flavonoides libres actuarían como barredores de especies reactivas de oxígeno (Vinson et al., 1985), y los compuestos fenólicos que estarían ligados a receptores proliferadores de peroxisomas (Sesika et al., 2005). Conclusión: Se mostró mayor eficacia hipoglicemiante al utilizar el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. (Guanábana) administrado por vía oral durante 5 días en ratas diabéticas, siendo la dosis de 200mg/kg la más eficaz como hipoglicemiante.

Palabras clave: Guanábana, hojas de *Annona muricata* L, diabetes, aloxano.

SUMMARY

The purpose of the present investigation has been to determine the hypoglycemic effect when administering the ethanolic extract of *Annona muricata* L. (Guanábana) in diabetic rats. Materials: leaves of *Annona muricata* L. (Guanábana), were used 36 male young Holtzman rats with a weight average (210±10g) received water and food to freedom, with a period of acclimatization of seven days, randomly and divided into six groups (normal, alloxan, control, three doses of the extracts (200, 400 and 600mg/kg) and glibenclamide 5 mg/kg, daily during 5 days; Method: Diabetes was induced in rats by intraperitoneal injection of alloxan monohydrated at dose of 130mg/kg to all the animals except the normal group. After 24 hours the animals that presented blood glucose levels > 250mg/dL were used for the study, the blood glucose levels were determined by using electronic glucometer (Optium) and insulin levels were measured by the method of Sandwich according to Gonzales and et al. Also it was made the histopathologic study of páncreas, liver and kidney. Results: with 200mg/kg of ethanolic extract greater hypoglycemic effect was observed (p<0.05) and better protection of the páncreas, liver and kidney of the damage caused by alloxan according histological studies. The findings possibly justify because the alkaloids could induce insulin secretion (Garcia Lopez et al., 2004); the free flavonoids would act as scavenging of reactive oxygen spieces (Vinson et al.,1985), and the phenolic compounds that would be bound to peroxisomes proliferator receptor (Sesika et al., 2005). Conclusion: The ethanolic extract of leaves of *Annona muricata* L. (Guanábana) administered by oral route was to greater hypoglycemic effectiveness when using during 5 days in diabetic rats, being the most effective dose of 200mg/kg like hypoglycemic.

Key words: Guanábana, leaf of *Annona muricata* L, diabetes, alloxan.

I. INTRODUCCION

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), afecta a más del 90% de la población con diabetes, y es una compleja enfermedad metabólica, caracterizada por los elevados niveles de glucosa plasmática. La hiperglicemia es causada por un incremento de la producción de glucosa hepática, como consecuencia de la resistencia a la insulina. Por otra parte, la hiperglicemia post-prandial resulta de la secreción anormal de insulina por las células β en respuesta a la comida, producción hepática excesiva de glucosa y el déficit de captación de glucosa por los tejidos sensibles a insulina particularmente del músculo esquelético. La hiperglicemia crónica deteriora la secreción de las células β y la sensibilidad de los tejidos a insulina, un fenómeno conocido como glucotoxicidad. Por lo tanto, la *resistencia a la insulina* y la *deficiencia de secreción insulina* representan elementos claves en la patogénesis de la diabetes tipo 2; la caracterización del fenotipo puede ayudar a identificar a los pacientes: a) pacientes con predominio de la resistencia a la insulina y con poca secreción de insulina, y b) pacientes con predominio de los defectos de la secreción de insulina con diferentes grados de resistencia a la insulina, según la Asociación Americana de Diabetes (ADA).⁽¹⁾

En el Perú la prevalencia de diabetes es de 1-8% de la población general, siendo Piura y Lima como los departamentos más afectados. Se menciona que en la actualidad la diabetes mellitus afecta a más de un millón de peruanos y menos de la mitad han sido diagnosticados⁽²⁾.

La guanábana (*Annona muricata* L.) es una planta cuyo centro de origen es la parte tropical de Sudamérica pero ha sido introducida en muchos países. Crece óptimamente hasta los 1,000 m.s.n.m., y es considerada la planta más tropical, pues no resiste el frío. Sus usos medicinales son variados, las hojas y brotes tiernos son usados

como anticancerígenos, la corteza como antibacteriano y antiulceroso, las hojas como antiespasmódico, sedativo, antimalárico, antidiabético y vasodilatador^(3,4,5).

Existiendo plantas antidiabéticas como la *Gentianella thyrsoidea* “Tucuma”, *Solanum sessiliflorum* Duna “Cocona”^(6,7)

La acción hipoglicemiante no ha sido estudiada hasta el momento de allí el interés de desarrollar la presente investigación usando criterios científicos, con la finalidad de obtener un tratamiento alternativo eficiente y de bajo costo para esta enfermedad, por ello se plantearon los siguientes objetivos: 1) Determinar preliminarmente, los compuestos fitoquímicos del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* L. 2) Evaluar la eficacia reductora en el nivel de glicemia al administrar el extracto etanólico de *Annona muricata* L. (Guanábana) por 5 días vía oral, en ratas tratadas con aloxano. 3) Determinar los niveles de insulina bajo las condiciones del ensayo antes mencionado al administrar el extracto etanólico de *Annona muricata* L. (Guanábana). 4) Realizar el estudio histopatológico del páncreas, hígado y riñón después de administrar extracto etanólico de *Annona muricata* L. (Guanábana) por vía oral, en una dosis diaria durante 5 días, en ratas machos aloxanizadas.

II. GENERALIDADES

2.1 Descripción

La Guanábana se cultiva en la mayor parte de América tropical, pero generalmente como plantas dispersas en los huertos. Es un árbol que alcanza hasta 10 metros de altura, de follaje compacto, hojas simples, coriáceas verde oscuro, grandes y brillantes; flores bisexuales solitarias o en pares, en tallos cortos que brotan de las ramas viejas; cáliz con 3 sépalos diminutos e inconspicuos de color verde; corola con 6 pétalos de color amarillo. El fruto es una baya colectiva o sincarpo, de forma acorazonada u ovoide, con pericarpio (cáscara) verdoso con tubérculos espiniformes carnosos, la pulpa es blanca y jugosa de sabor agridulce; las semillas de color negro lustroso o castaño. Por su aspecto, el fruto es semejante a la chirimoya, especie del mismo género (*A. cherimolia*).^(8,9)

2.2 Antecedentes y Usos

En los Andes peruanos, las hojas de guanábana se usan para el catarro y la semilla machacada es usada para eliminar los parásitos. En la selva peruana las raíces, corteza y hojas se usan para la diabetes y como un sedante y antiespasmódico. Las tribus de Guyana utilizan las hojas y/o corteza de Guanábana como sedante y tónico del corazón. En el Amazonas brasileño, una infusión de hojas se usa para problemas de hígado y el aceite de fruta es mezclado con aceite de aceituna y usado externamente para la neuralgia, dolor reumático y artritis. En Jamaica, Haití y la India Occidental, el jugo de fruta y/o fruta se usa para la fiebre, los parásitos, diarrea; y la corteza o las hojas se usan como antiespasmódico, sedante, y para condiciones nerviosas, también para la gripe, asma, astenia, hipertensión y parásitos.^(10,11,12)

Los componentes químicos del fruto son: agua, fibra, cenizas, grasas, proteínas, almidón, vitamina C, azúcares, potasio, sodio, magnesio, fósforo, hierro, citrulina, arginina, ácido caproico, isoquinolonas (anonaina, anoniina, asimilobina).⁽¹³⁾

Las hojas contienen *lactonas* como: Annohexocina, Annomuricina A, B, C y E, Annomutacina, Annopentocinas A, B y C, Muricoreacina, Gigantetronemina, Murihexocina A y C, Javoricina e *Isoquinolonas* como: Anonaina, Anoniina, Atherospermine, Coreximina. También contienen *lipidos* como: ácido gentísico, ácido lignocérico, ácido linoleico y ácido esteárico.⁽¹⁴⁾

Los componentes químicos de la semilla: lactonas, annomontacina, annonacina, annomuricatina, annonacinona, javoricina.⁽¹⁵⁾ Las acetogeninas de la hoja con actividad anticancerígena son: bullatacin, bullatacinone, muricoreacin, murihexocin C, annomuricin A, annomuricin B, muricatocin A, muricatocin C y muricapentocin.⁽¹⁶⁾

Numerosos principios bioactivos y fitoquímicos encontrados en la guanábana confirman muchos de sus usos en la medicina natural y han sido validados por estudios científicos. Los estudios más tempranos datan entre 1941 y 1962. Varios estudios realizados por diferentes investigadores demostraron que la corteza así como también las hojas tenían actividad hipotensora, antiespasmódica, vasodilatadora, relajante muscular y actividades cardiodepresoras en animales. Se ha verificado sus propiedades hipotensoras en ratas con las hojas de guanábana; asimismo las hojas, la corteza, la raíz, y los extractos de guanábana poseen actividad antibacterial *in vitro* contra numerosos patógenos y la corteza tiene propiedades de antifúngicas. Por otro lado, las semillas de guanábana demostraron una fuerte actividad insecticida según un estudio realizado en 1940; y otro en 1997 reportó la presencia de un alcaloide novedoso en la fruta de guanábana con efectos depresores en animales.^(17,18,19,20,21,22,23)

Estudios realizados en los años 1998 al 2000 por McLaughlin y por Choi DW, Chui HF han revelado que las acetogeninas son inhibidores del complejo I mitocondrial y bloquean la formación de ATP por fosforilación oxidativa; energía que necesita la célula cancerosa para poner en funcionamiento su bomba mediada por una P-glicoproteína, y que le permite mantenerse activa.^(24,25,26)

En general, varias acetogeninas de Annonaceous se han documentado que tienen efecto antitumoral, antiparasitaria, pesticida, antiprotozoaria, antihelmíntica, y con las actividades antimicrobiales. Hay mucho interés en las sustancias químicas que han demostrado tener propiedades poderosas de antitumor y varios grupos de investigación tratan de sintetizar estas sustancias químicas para nuevas drogas en la quimioterapia.^(27,28,29)

Entre las diferentes plantas que se les atribuye propiedades hipoglicemiantes se refiere: *Smallanthus sonchifolius*, *Eucalyptus globulus labili*, *Geranium dielsianum*, *Gentianella alborosea*, *Allium sativum L.*⁽³⁰⁾

III. MATERIALES Y METODOS

MATERIAL

3.1 Material Biológico

- ◆ Hojas de *Annona muricata* L (Guanábana) fueron obtenidas del caserío San José Bajo del Distrito Santiago de Cao, provincia de Ascope, Departamento de la Libertad.
- ◆ Se emplearon 36 ratas machos de 3 meses de edad de la cepa Holtzmann con un peso promedio (210 ± 10 g), obtenidos del Instituto Nacional de Salud (INS), Lima, Perú, que recibieron a libertad agua y una dieta balanceada especialmente para roedores procedente del mismo Instituto constituida por una mezcla de torta de soya, harina de trigo, aminoácidos sintéticos y antifúngicos. Se les dio un periodo de aclimatación de siete días, antes del inicio de la experimentación. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las normas éticas en concordancia con la Guía en el uso y cuidado de animales para propósitos científicos por la National Advisory Committee for Laboratory Animal Research.⁽³¹⁾

3.2 Equipos y Reactivos

- ◆ Balanza analítica digital marca Belnet
- ◆ Molino de cuchilla Willey
- ◆ Microscopio Nikon Mod Eclipse – 200
- ◆ Pipetas de 10 y 5ml
- ◆ Probeta graduada de 10x100ml
- ◆ Aloxano monohidratado (Sigma)
- ◆ Etanol 96°

- ◆ Tiras reactivas Medisense®
- ◆ Reactivos Elecsys 1010/2010® para el dosaje de la insulina
- ◆ Glucómetro Optium®
- ◆ Equipo de disección
- ◆ Jeringas hipodérmicas de 1ml
- ◆ Jaulas metálicas
- ◆ Tubos de ensayo
- ◆ Eosina y hematoxilina
- ◆ Laminas y laminillas

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR

La detección de los metabolitos secundarios, se realizo mediante pruebas fitoquímicas de caracterización. ⁽³²⁾ según los siguientes métodos y procedimientos para observar presencia de saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides y glicósidos, los que serán expresados: Poca cantidad (+); Regular cantidad (++); Abundante cantidad (+++).

a) Determinación de saponinas

Prueba de la espuma A una solución metanólica-acuosa de la muestra, se somete a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de la saponina es indicada por la formación de una espuma persistente durante 3 minutos.

b) Determinación de flavonoides

Reactivo de Shinoda

En un tubo de ensayo se coloca 0,5 mL de muestra con 1 limadura de magnesio pequeña, con un gotero se añaden 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado.

Se observa intenso burbujeo y coloración naranja, de color intenso luego de 10 minutos.

Reactivo de Cloruro férrico

A 0,5 mL de la muestra se agregan 3 gotas del reactivo, instantáneamente la solución toma un color verde oscuro casi negro, lo que indicaría la presencia de compuestos fenólicos y taninos.

c) Determinación de taninos

Con gelatina

A 0,5 mL de muestra se agregan 3 gotas de reactivo, en un principio se forma una sustancia en forma de nube en la solución, luego de centrifugar queda en el fondo un precipitado de color blanco. Este confirma la presencia de taninos.

d) Determinación de Alcaloides

Reactivo de Dragendorff

A 0,5 mL de muestra agregar unas cuantas gotas de este reactivo a una solución ácida del alcaloide se observa la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo.

Reactivo de Mayer.

A 0,5 mL de muestra agregar un exceso de reactivo a una solución acidulada del alcaloide se observa la aparición de un precipitado de blanco a crema.

e) Determinación de glicósidos

A 0,5 mL de muestra someter a la reacción de Molish (alfa-naftol + ácido sulfúrico), formación de un anillo violáceo al centro

3.3.2. PREPARACION DEL EXTRACTO ETANOLICO

Las hojas de *Annona muricata* L. una vez secas fueron sometidas a molienda en un molino eléctrico se pesaron 600g y se llevó a maceración alcohólica al 95%, siete días de maceración, posteriormente se filtró y se concentró a 30°C, hasta obtener un residuo seco a peso constante (extracto etanólico).⁽³³⁾

3.3.3. INDUCCIÓN DE LA DIABETES

La inducción de la diabetes se realizó según Kameswara Rao et al 1999, con modificación en la dosis; a las ratas se les administró aloxano monohidratado a una dosis de 130mg/kg disuelto en agua destilada por vía intraperitoneal (i.p.). Después de 24 horas las ratas mostraron una marcada hiperglicemia y los animales que presentaron un nivel de glucosa sanguínea ≥ 250 mg/dL fueron usadas para este estudio.⁽³⁴⁾ El extracto etanólico fue resuspendido utilizando polisorbato 80 (Tween 80) al 5% en agua destilada; y, esta solución que resuspendió al extracto también fue administrada a las ratas que sólo recibieron aloxano y normales en dosis de 5 mL/kg; la administración fue por vía peroral; luego, estas ratas fueron pesadas y se randomizaron en grupos de 5 animales cada uno de 6 ratas teniendo en cuenta el siguiente diseño:

Grupos	Tratamientos
Grupo 1	ratas diabéticas
Grupo 2	ratas diabéticas tratadas con 200mg/kg del extracto etanólico
Grupo 3	ratas diabéticas tratadas con 400mg/kg del extracto etanólico
Grupo 4	ratas diabéticas tratadas con 600mg/kg del extracto etanólico
Grupo 5	ratas diabéticas tratadas con glibenclamida 5mg/kg/peso.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Los niveles de glucosa fueron determinados usando un glucómetro digital Optium®, se utilizó tiras reactivas Medisense® del Laboratorio Abbott, siguiendo las instrucciones respectivas. Las muestras de sangre fueron colectadas del ápice de la cola del animal, desechando la primera gota y recibiendo la siguiente sobre la tira reactiva, los valores obtenidos fueron expresados en mg/dL. Se obtuvo el porcentaje de efecto hipoglicemiante a través de la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de efecto hipoglicémico} = (\text{Diabéticas-Tratamiento}/\text{Diabéticas}) * 100$$

El efecto se califico mayor cuando el valor porcentual obtenido es en cifra positiva alta

3.3.4. DOSAJE DE INSULINA

El dosaje de insulina se realizo por el método de Sándwich según Gonzáles y col. tomando muestras de sangre por punción cardiaca de las ratas diabéticas, usándose el equipo Systemes Elecsys 1010/2010. El test de insulina Elecsys utiliza anticuerpos monoclonales con interacción específica a la insulina humana expresándose los resultados en UI/dL. ⁽³⁵⁾

3.3.5. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, retirándoseles el páncreas, hígado, riñón los que fueron conservados en solución formol al 10% para su posterior estudio histopatológico; seguidamente fueron laminadas y procesadas a fin de ser deshidratadas e impregnadas en parafina; una vez incluidas en parafina sólida fueron cortadas con micrótopo a un grosor de 5 a 6 μ para ser

teñidas con hematoxilina-eosina a fin de caracterizar las alteraciones microscópicas. ⁽³⁶⁾ las observaciones histopatológicas fueron expresadas: normal (0); Leve congestión (+); Moderada congestión y turbidez (++); Necrosis (+++).

3.3.6. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 13.0) para PC. Estos se presentaron como valores medios (\bar{X}) \pm error estándar (EE). Las diferencias significativas de los grupos que recibieron tratamiento se determinó con el análisis de varianza (ANOVA) y por el test de comparaciones múltiples: LSD de Fisher de la diferencia mínima significativa. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado para establecer la significancia estadística.

IV. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO TAXONOMICO Y FITOQUIMICO

El estudio taxonómico ha indicado que la planta evaluada corresponde a la *Annona muricata* L; según la determinación sistemática del sistema de clasificación de Cronquist 1988 (Anexo 1).

El extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L. tiene mayor presencia de alcaloides y menor cantidad de taninos, glicósidos y flavonoides, lo que se presenta en la tabla 1

4.2 EFECTO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *ANNONA MURICATA* L.

ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE EN RATAS DIABETICAS

En la figura 1 se muestra el efecto hipoglicémico, después de administrar el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. a dosis de 200, 400 y 600mg/kg/día durante 120 horas a ratas diabéticas; obteniéndose mejores resultados con 200mg/kg/día.

4.3 EFECTO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *ANNONA MURICATA* L. SOBRE EL NIVEL DE INSULINA

Se observó un aumento de la concentración sérica de insulina en los animales que recibieron el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. a la dosis de 200mg/kg comparativamente con los controles y los que recibieron glibenclamida (tabla 6, figura 13).

4.4 EFECTO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *ANNONA MURICATA* L. SOBRE EL PANCREAS, HIGADO Y RIÑON

A nivel de páncreas: en las ratas diabéticas por aloxano se observo necrosis (figuras 8, 9); en ratas diabéticas más el extracto etanólico *Annona muricata* L. se evidencio islotes pancreáticos normales y en uno con una moderada congestión y turbidez (figuras 10, 11, 12, 14); las que recibieron insulina y glibenclamida mostraron islotes pancreáticos con moderada congestión y turbidez.

A nivel de hígado: de rata diabética se observo congestión venosa (figura 16); y en las ratas que recibieron el extracto etanólico de la *Annona muricata* L. se le observo un estado normal (figura 17).

A nivel del riñón: la rata diabética mostró una copa cortical con glomérulos alterados (figura 18, 19); las que recibieron glibenclamida evidenciaron glomerulitis y nefritis (figura 20); y en las diabéticas más la *Annona muricata* L. se presencio inflamación aguda (figura 21).

TABLA N° 1

Estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L.

Prueba de caracterización	Extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> L.(Guanábana)
Alcaloides	+++
Flavonoides	++
Saponinas	+
Otros Compuestos fenólicos	++
Taninos	++
Otros Glicósidos	++

(+++)= Abundante cantidad (++)= Regular cantidad (+)= Poca cantidad

Tabla 2
Efecto Hipoglicémico del Extracto etanólico de la *A.muricata* en ratas diabéticas inducidas con aloxano

Tratamiento	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) ± X		
	0h	24h	48h
Ratas diabéticas (RD)	73.8 ± 3.5	250.8 ± 6.3	370.2 ± 34.9
RD + Extracto 200mg/kg	91.8 ± 1.5	291.3 ± 8.0	235 ± 27.5
RD+ Extracto 400mg/kg	86.8± 2.4	237± 11.3	263.2±25.1
RD+ Extracto 600mg/kg	93.5 ± 1.1	257 ± 8.3	312.3 ± 33.2
RD+ Glibenclamida 5mg/kg	106.5 ± 0.6	243.6 ± 15.2	386.3 ± 19.2

n=6

p<0.05

Al inicio de la experimentación las ratas presentaron un nivel de glicemia basal de: 70 -104 mg/dL

Tabla 3
Porcentaje de disminución del nivel de glicemia al administrar el extracto etanólico de *A.muricata* en ratas diabéticas inducidas con aloxano

Tratamiento	0h	24h	48h
RD+Extracto 200mg/kg	-24.3%	-16.15%	36.52%
RD+Extracto 400mg/kg	-17.62%	5.50%	28.90%
RD+Extracto 600mg/kg	-26.69%	-24.72%	15.64%
RD+Glibenclamida 5mg/kg	-44.30%	2.87%	-4.35%

n=6

p<0.05

Valores porcentuales obtenidos a partir de la tabla 2. Los valores negativos indican que la glicemia ha superado las del grupo control que recibieron sólo aloxano, cifras que empiezan a tornarse positivas a las 48 horas, tiempo en que empieza el efecto de la planta.

Tabla 4
Efecto Hipoglicémico del Extracto etanólico de la *A.muricata* en ratas diabéticas inducidas con aloxano

Tratamiento	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) ± X		
	72h	96h	120h
Ratas diabéticas (RD)	364.2 ± 13.9	401 ± 10.3	427.5 ± 19.0
RD+Extracto 200mg/kg	266.5 ± 40.2	225.8 ± 55.4	169 ± 35.6
RD+Extracto 400mg/kg	319.7 ± 22.6	390.7 ± 15.5	466.7 ± 16.1
RD+Extracto 600mg/kg	284.2 ± 44.8	315.8 ± 57.9	405.5 ± 66.3
RD+Glibenclamida 5mg/kg	339.8 ± 32.2	347 ± 38.1	374 ± 51.9
n=6			p<0.05

Tabla 5
Porcentaje de disminución del nivel de glicemia al administrar el extracto etanólico de *A.muricata* en ratas diabéticas inducidas con aloxano

Tratamiento	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) ± X (inhibición%)		
	72h	96h	120h
RD+Extracto 200mg/kg	26.83%	43.69%	60.47%
RD+Extracto 400mg/kg	12.22%	2.57%	-9.17%
RD+Extracto 600mg/kg	21.96%	21.25%	5.15%
RD+Glibenclamida 5mg/kg	6.70%	13.47%	12.51%
n=6			p<0.05

Valores porcentuales obtenidos a partir de la tabla 4

Tabla 6
Nivel de Insulina en sangre en ratas con inducción de diabetes

	Nivel de Insulina UI/dL
Tratamiento	
Ratas diabéticas	20.6±3.7
RD+Extracto 200mg/kg	32.2±2.4
RD+Glibenclamida 5mg/kg	8.85±4.5

n=6 p<0.05

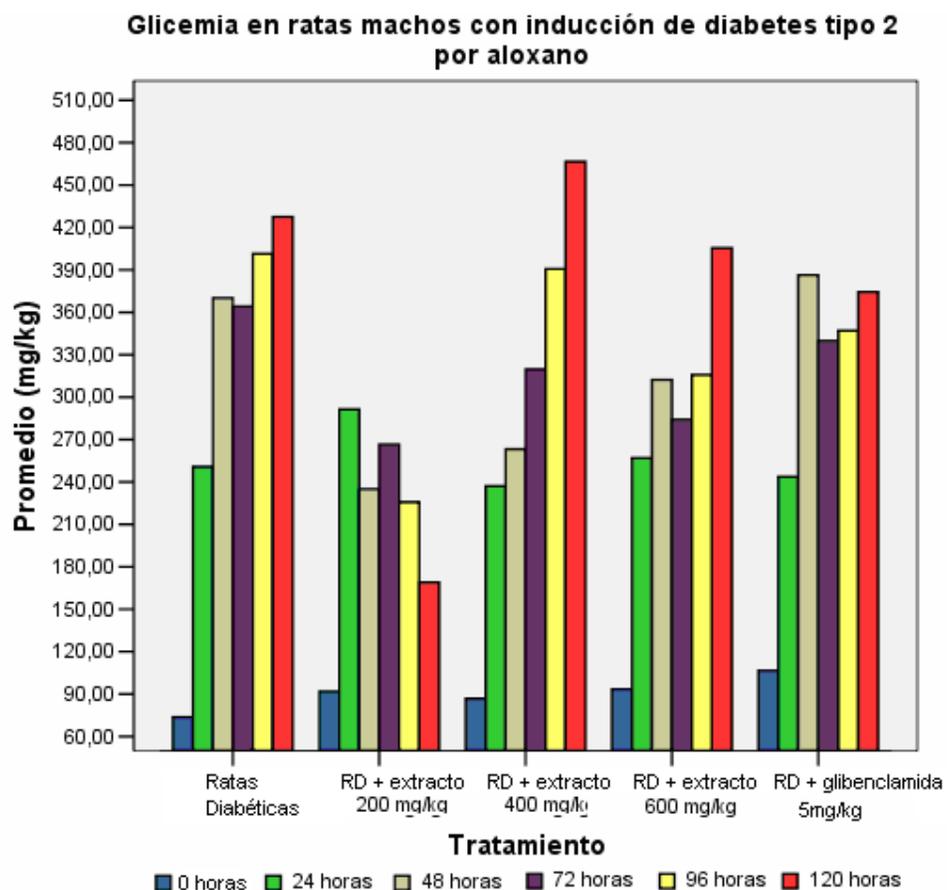


Fig.1 Se observa que hasta el quinto día de tratamiento con el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) existe disminución de la glicemia ($p < 0.05$)

Glicemia a las 24 horas en ratas machos con inducción de diabetes tipo 2 por aloxano

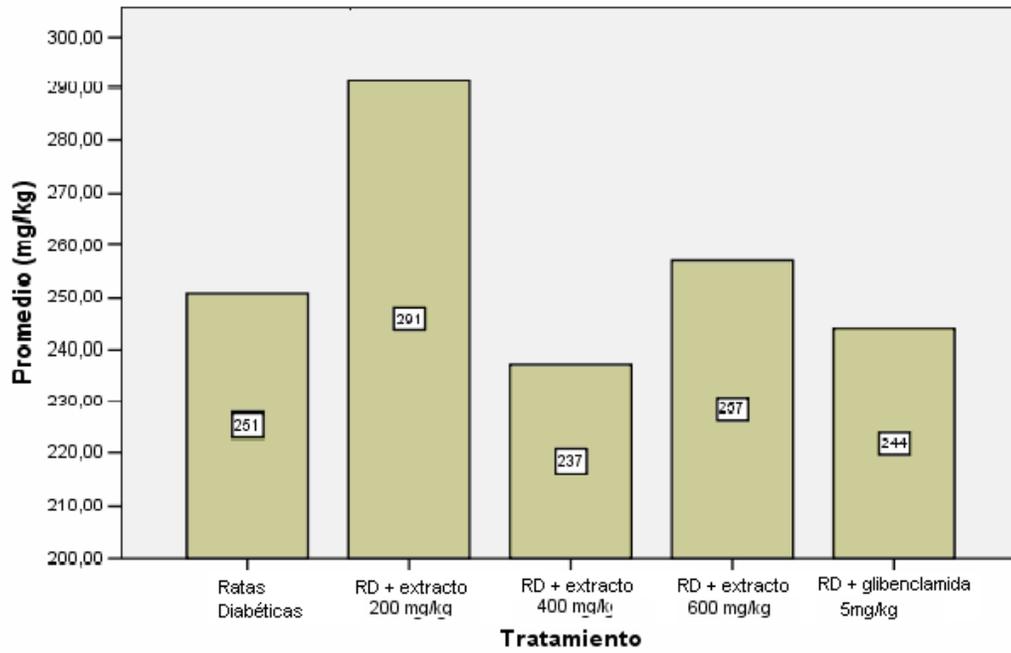


Fig.2. Se observa que a las 24h de tratamiento con el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) no existe una reducción significativa de la glicemia a excepción de las dosis de 400mg/kg.

Glicemia a las 48 horas en ratas machos con inducción de diabetes tipo 2 por aloxano

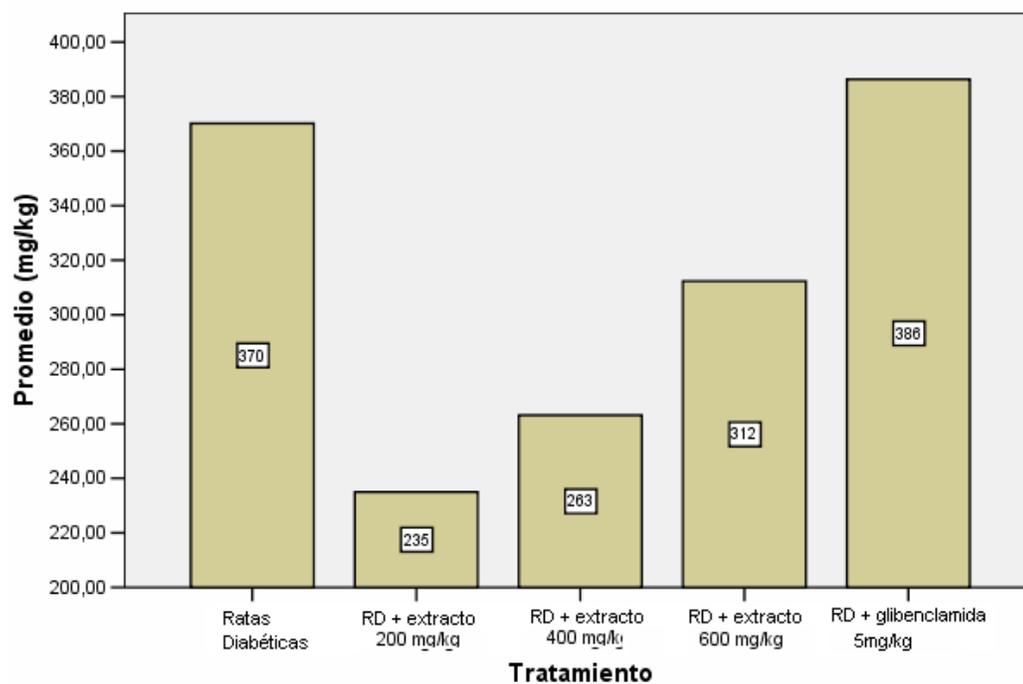


Fig.3. Se observa que a las 48h de tratamiento con el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) existe una reducción significativa del nivel de glicemia con la dosis de 200mg/kg.

Glicemia a las 72 horas en ratas machos con inducción de diabetes tipo 2 por aloxano

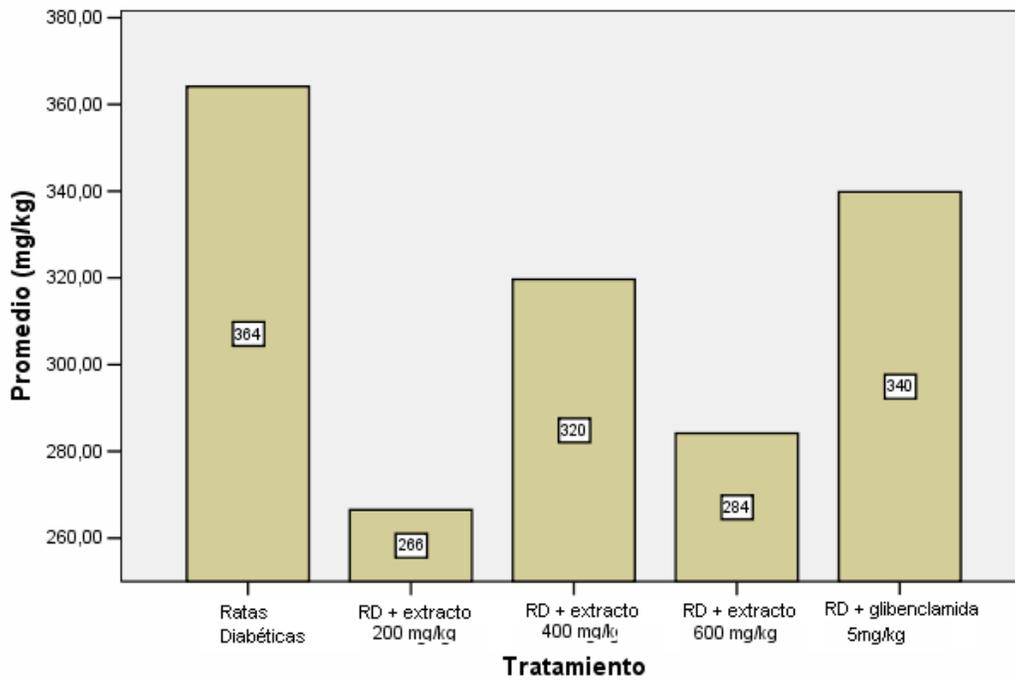


Fig.4. Se observa que a las 72h persiste la disminución de la glicemia con la dosis de 200mg/kg de tratamiento con el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) existe una reducción significativa del nivel de glicemia con la dosis de 200mg/kg

Glicemia a las 96 horas en ratas machos con inducción de diabetes tipo 2 por aioxano

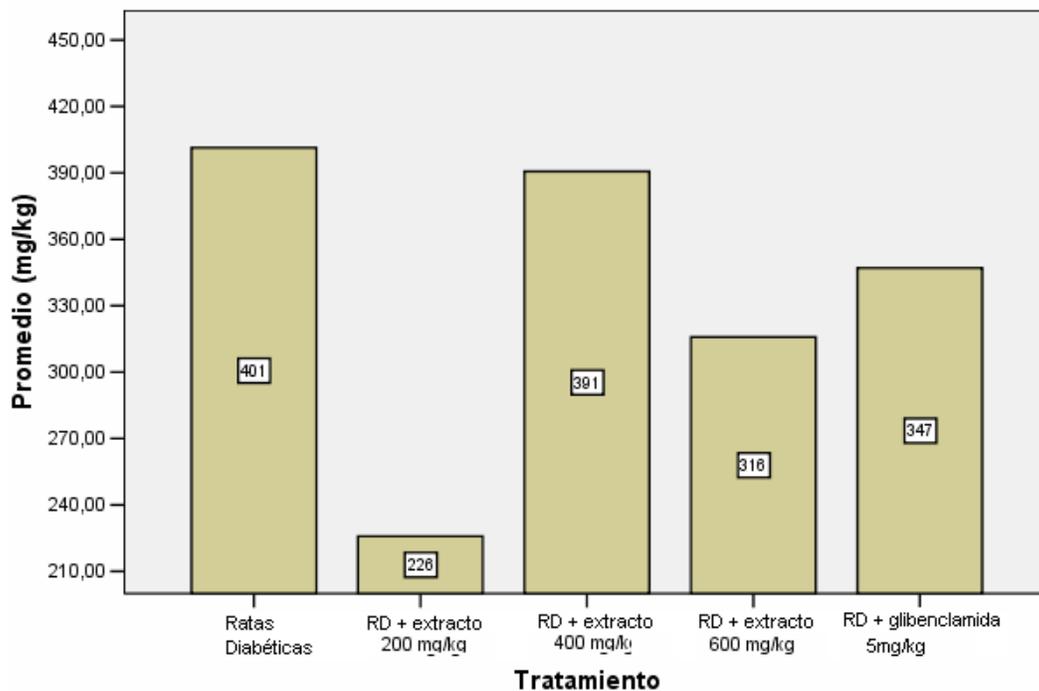


Fig.5. Se observa que a las 96h se mantiene la disminución de la glicemia con la dosis de 200mg/kg de tratamiento con el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana)

Glicemia a las 120 horas en ratas machos con inducción de diabetes tipo 2 por aloxano

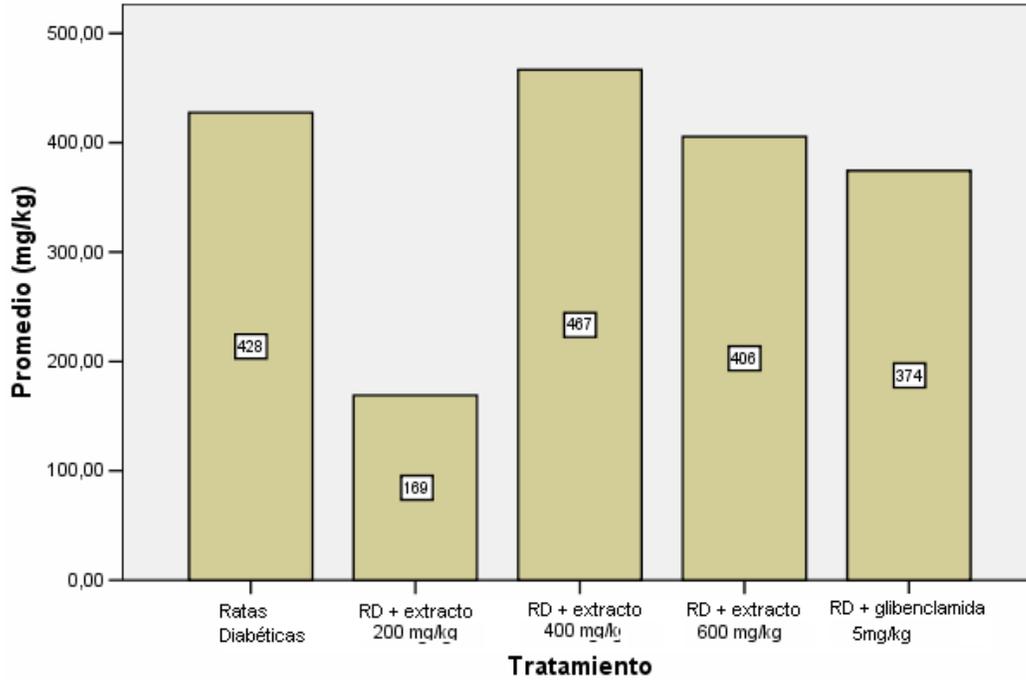


Fig.6. A las 120h post-tratamiento la dosis de 200mg/kg del extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L (guanábana) es eficaz como hipoglicemiante.

Nivel de Insulina en sangre de ratas con induccion de diabetes tipo 2

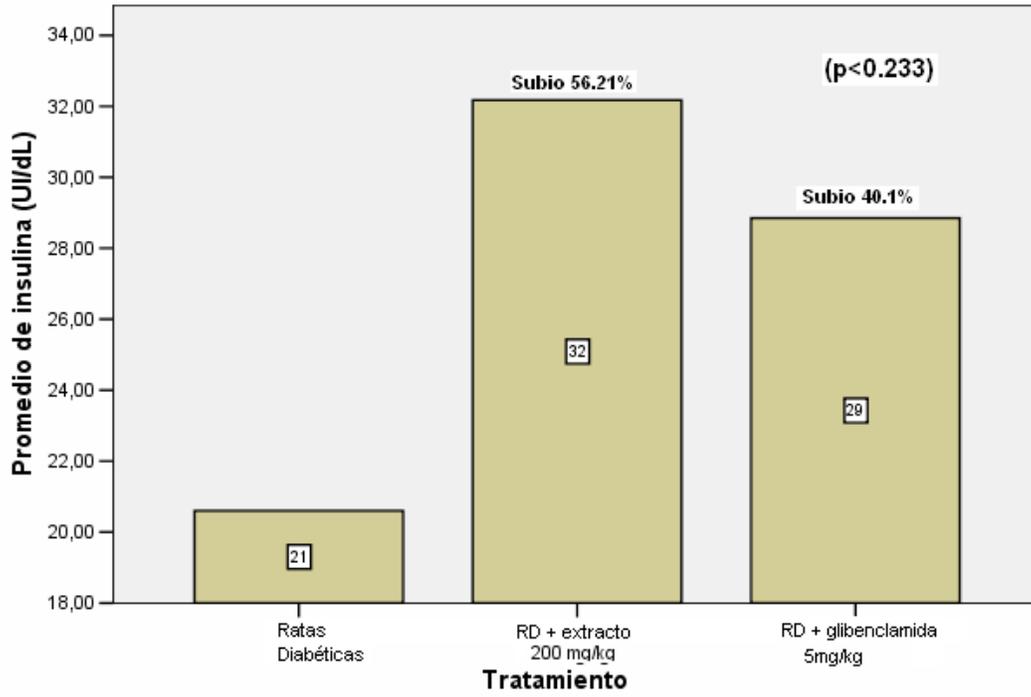


Fig.7. Se observo que al quinto día de tratamiento con la dosis de 200mg/kg los niveles de insulina se incrementaron.

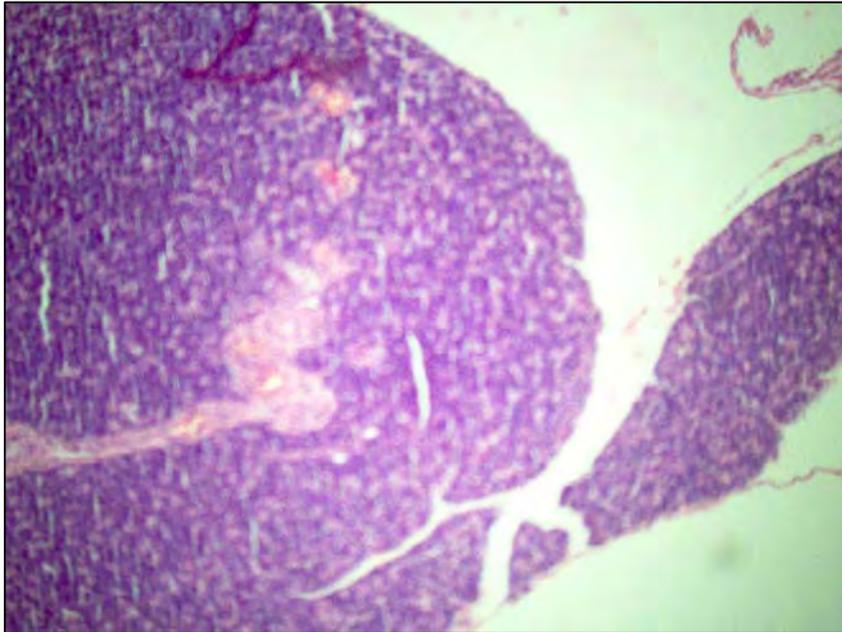


Fig.8. Páncreas de rata diabética: islote pancreático con área necrótica central. Magnificación 10X. Lesión +++

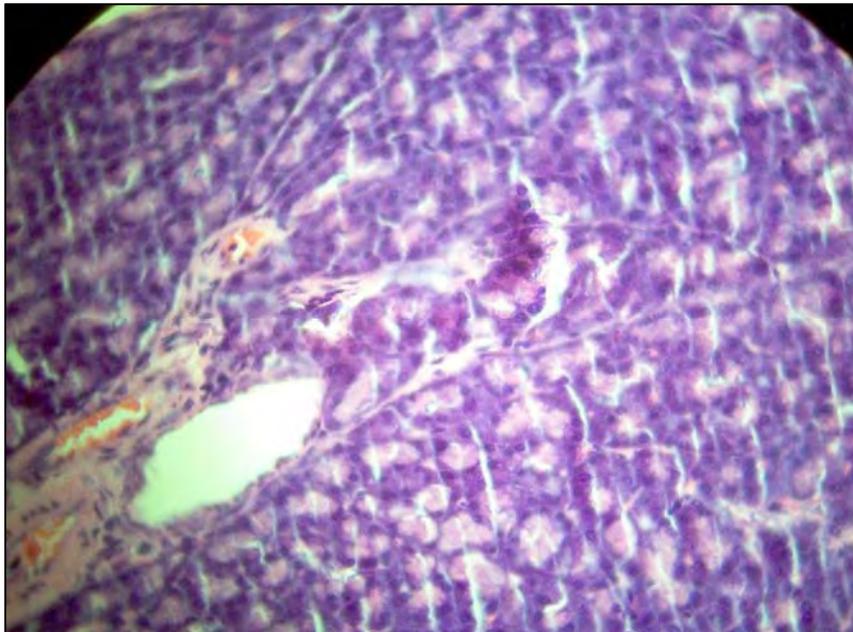


Fig.9. Páncreas de rata diabética: islote pancreático con área mortificada alrededor del conducto pancreático. Magnificación 250X. Lesión +++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

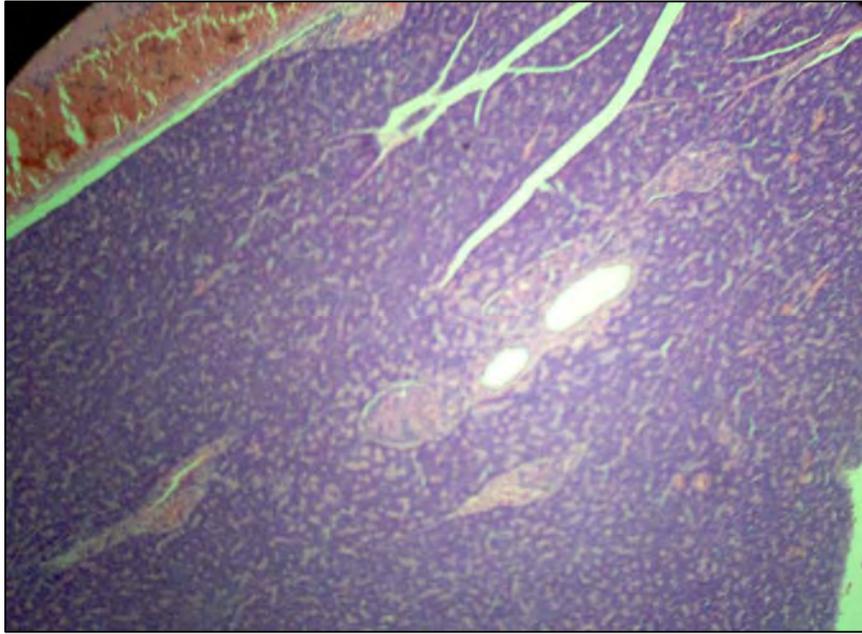


Fig.10. Páncreas de rata diabética más extracto etanólico de *Annona muricata* L. : islotes pancreáticos en estado normal. Magnificación. 10X. Lesión 0

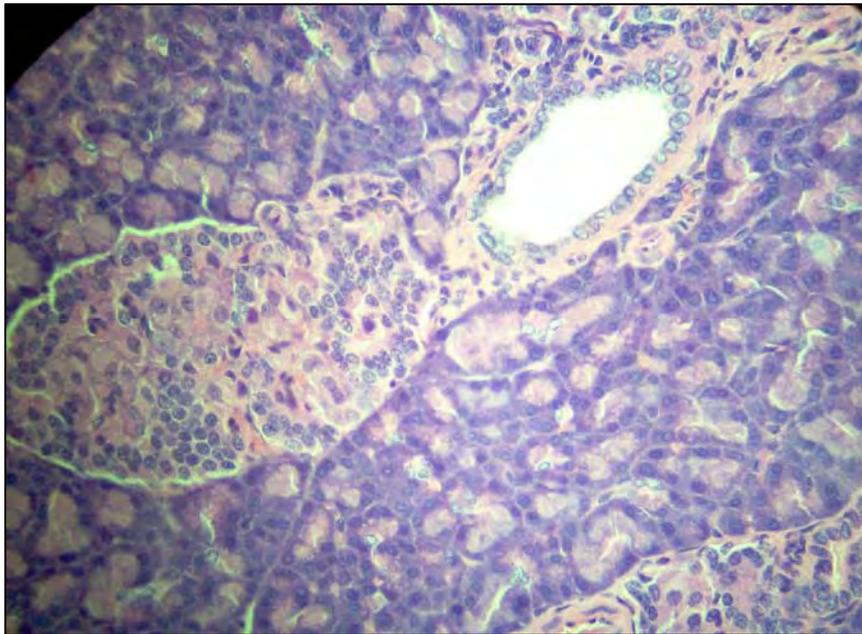


Fig.11. Páncreas de rata diabética más extracto etanólico de *Annona muricata* L.: islotes pancreáticos con inicio de necrosis. Magnificación 10X. Lesión ++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

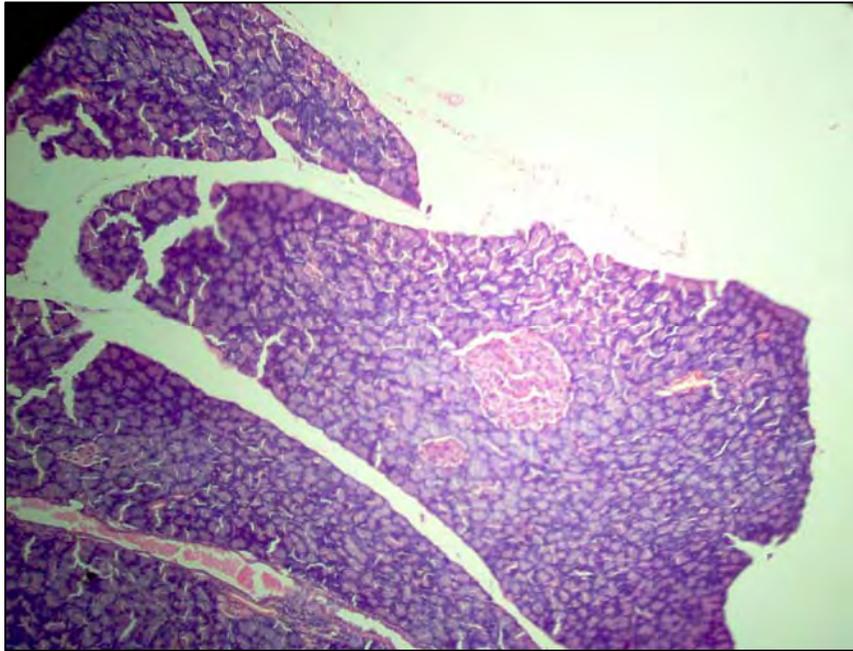


Fig.12. Páncreas de rata diabética más extracto etanólico de *Annona muricata* L. : islotes pancreáticos en estado normal. Magnificación. 10X. Lesión 0

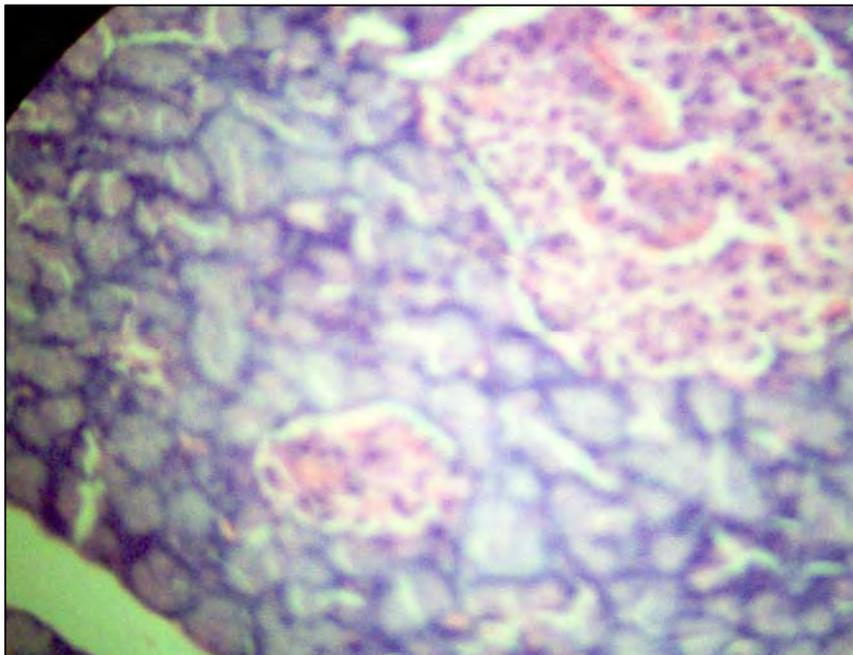


Fig.13. Páncreas de rata diabética más extracto etanólico de *Annona muricata* L. más insulina: islotes pancreáticos áreas mortificadas. Magnificación 400x. Lesión ++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

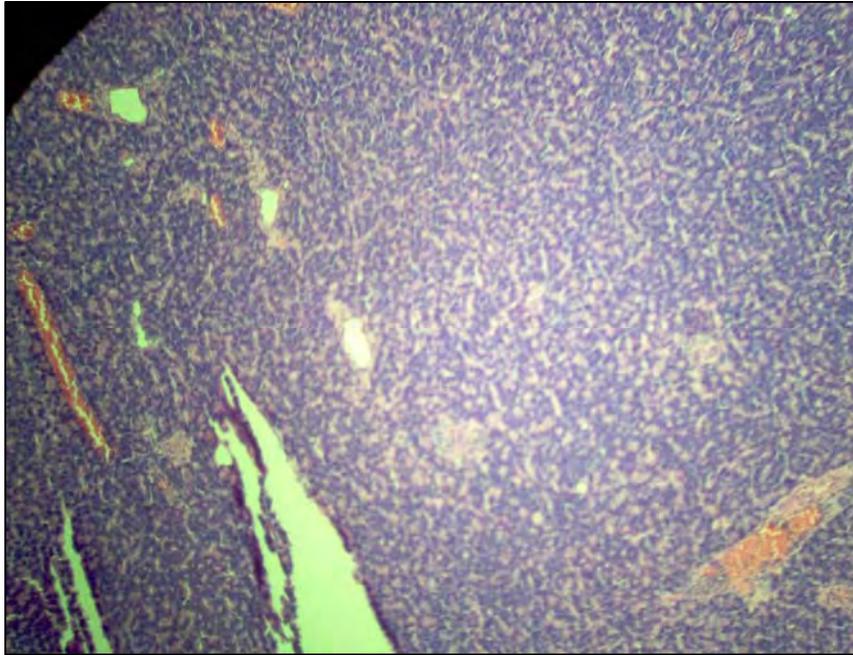


Fig.14. Páncreas de rata diabética más extracto etanólico de *Annona muricata* L. : islotes pancreáticos en estado normal. Magnificación. 10X. Lesión 0

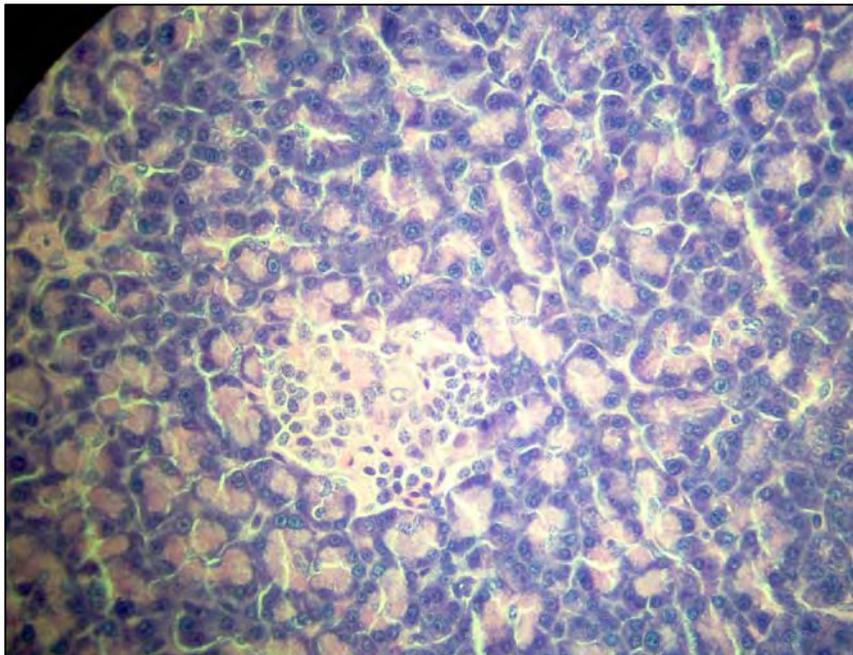


Fig.15. Páncreas de ratas diabéticas más glibenclamida: islote pancreático desordenado planta en aparente estado normal. Magnificación 250X. Lesión ++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

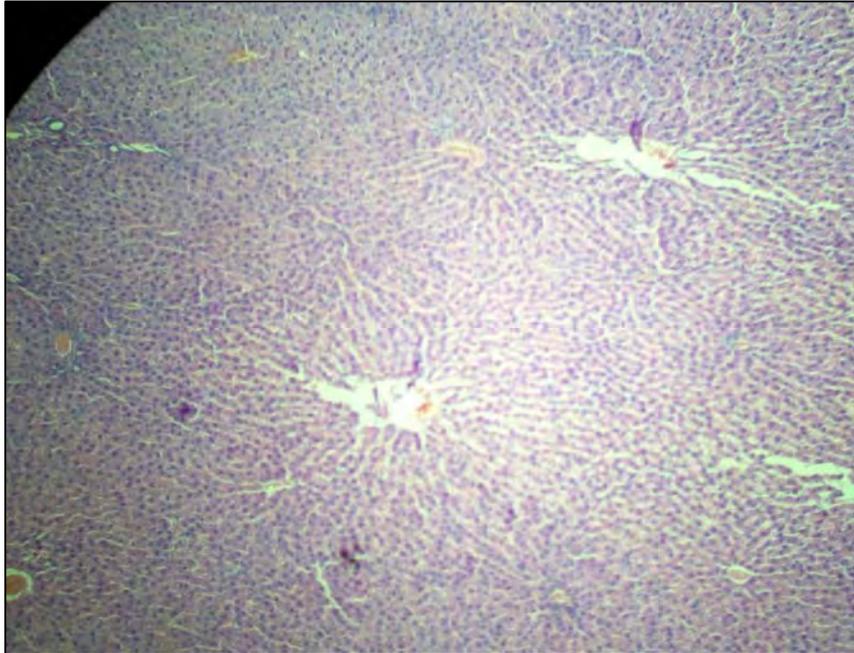


Fig.16.Hígado de rata diabética presencia de congestión venosa. Magnificación 250X. Lesión +

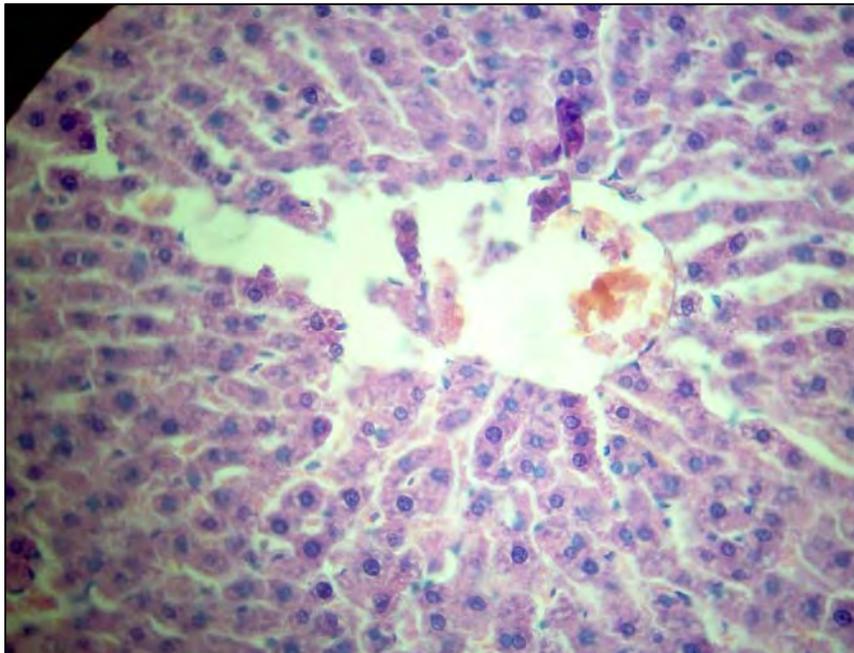


Fig.17. Hígado de rata diabética más extracto etanólico de *Annona muricata* L: estado normal. Magnificación 250X. Lesión ++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

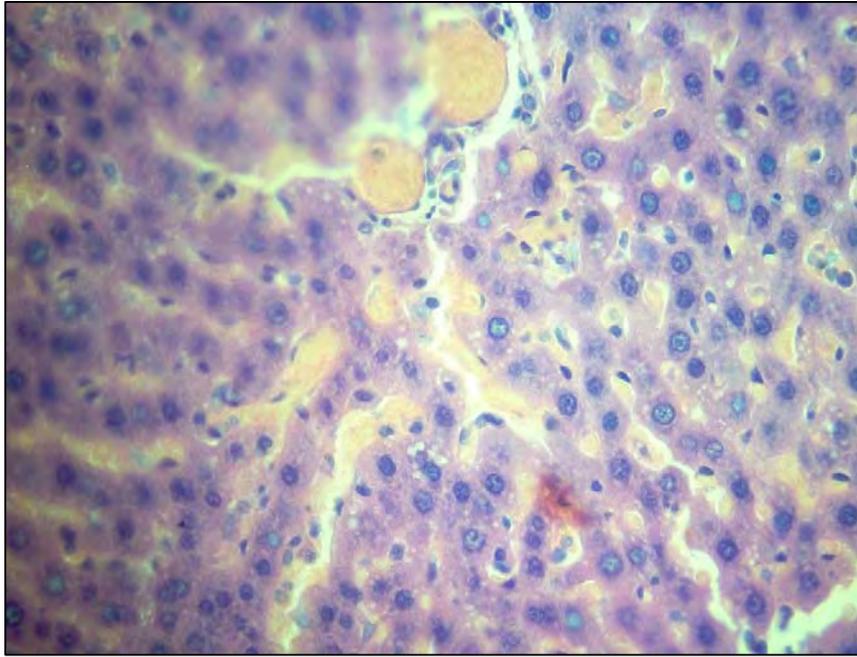


Fig.18. Riñón de rata diabética con capa cortical con glomérulos alterados. Magnificación 10X. Lesión +++

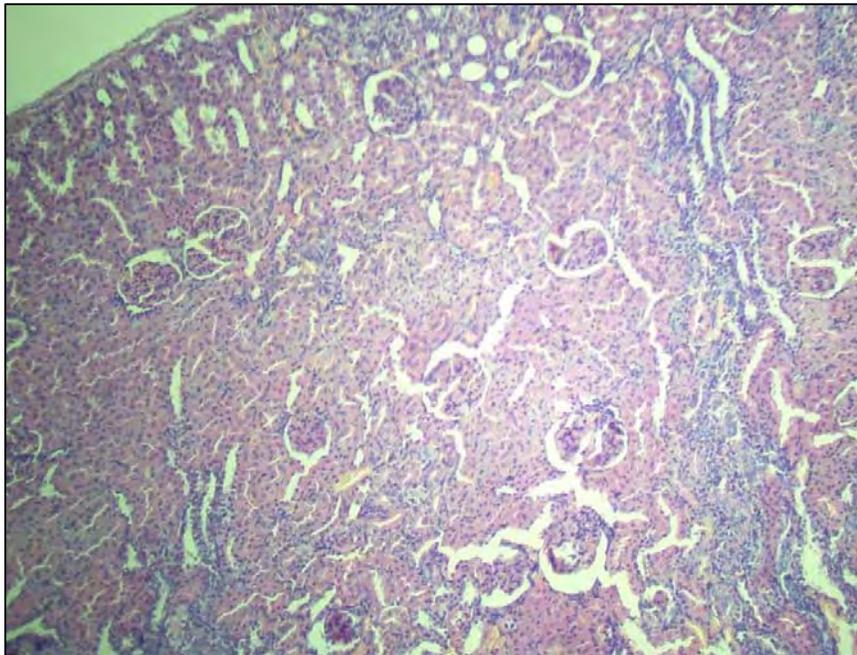


Fig.19. Riñón de rata diabética con capa cortical con glomérulos alterados. Magnificación 10X. Lesión +++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

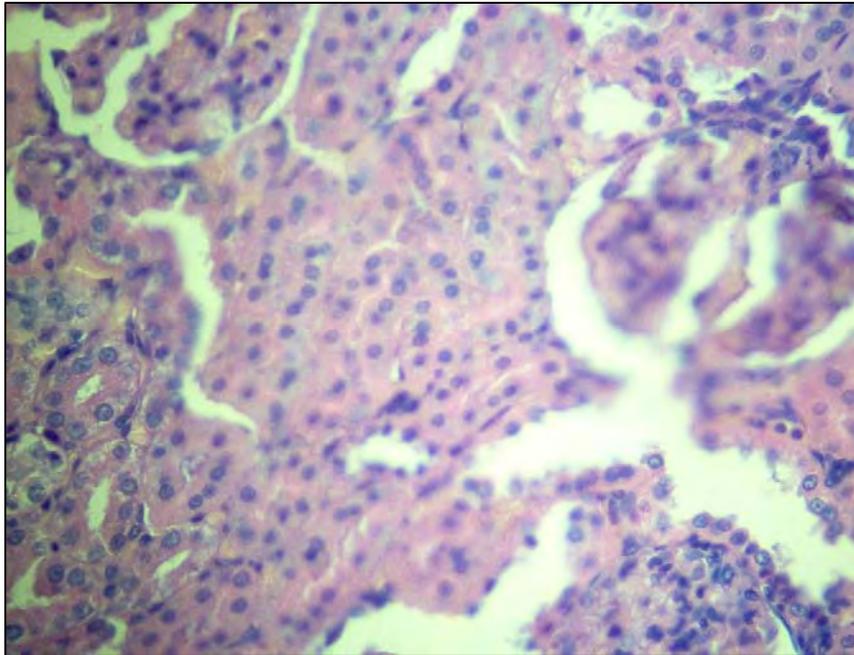


Fig.20. Riñón de rata diabética más glibenclamida con glomerulitis nefritis. Magnificación 250X. Lesión +++

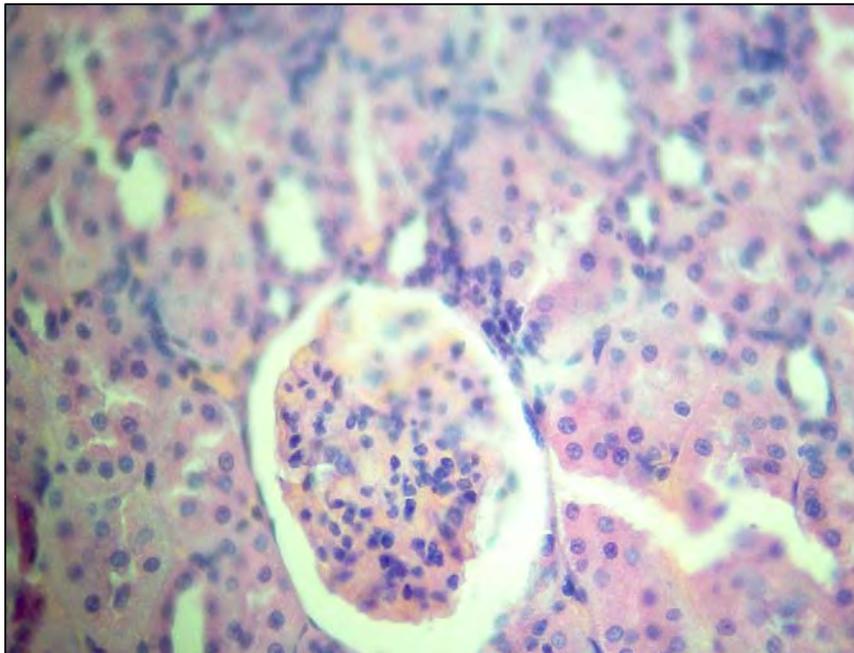


Fig.21. Riñón de rata diabética más extracto etanólico *Annona muricata* L: capa cortical con glomérulos alterados. Magnificación 400X. Lesión ++

0 = normal; + = leve congestión; ++ = moderada congestión y turbidez; +++ = necrosis

V. DISCUSION

En la presente investigación se ha determinado la actividad hipoglicemiante empleando el extracto etanólico de *Annona muricata* L. (Guanábana) en ratas aloxanizadas.

La diabetes experimental fue inducida utilizando el método de Kameswara Rao et al, 1999 utilizando como inductor el aloxano (Tabla 2) el cual produce la toxicidad selectiva de las células B pancreáticas, y al dañarlas disminuye el nivel de insulina e induciendo un estado de diabetes mellitus insulino-dependiente.^(37,38) El mecanismo del daño pancreático por el aloxano se justifica debido a su similitud molecular con la estructura de la glucosa; ^(39,40) por ello el aloxano debe ser recaptado por la célula, vía transportador de glucosa GLUT-2 de baja afinidad en la membrana plasmática. El aloxano puede generar “especies reactivas de oxígeno” (ROS) en una reacción cíclica redox, produciendo el ácido dialúrico (AH₂). Por lo tanto, se asume que la acción tóxica del aloxano producida en las células β es iniciada por la formación intracelular de radicales libres en esta reacción redox. La auto-oxidación de ácido dialúrico (AH₂) genera radicales superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y finalmente radical hidroxilo (OH). La auto-oxidación de AH₂ implica la formación intermedia del radical aloxano (AH). La reducción de aloxano a AH₂ en la célula requiere la presencia de tioles como el tripéptido de glutatión (GSH) y otros tioles intracelulares presentes a bajas concentraciones, tales como, el monotiol de cisteína y ditioles.^(41,42,43) Por lo tanto, la habilidad de las células de captar aloxano vía el transportador de glucosa GLUT-2 el cual disminuye el potencial de defensa antioxidativo contra el estrés oxidativo y la formación del radical hidroxilo explica la acción tóxica selectiva a las células β y la acción diabetogénica del aloxano.^(44,45,46)

En la presente investigación se ha demostrado que el aloxano produjo lesión y muerte de las células B pancreáticas en los animales de experimentación sin recibir tratamiento, en tanto que en los tratados con extracto de hojas de guanábana se evidencia protección por parte de la planta (Fig 10, Fig12). Dado a la presencia de compuestos fenólicos especialmente flavonoides que poseen diferentes actividades biológicas, pero la más importante son la actividad antioxidante, efecto protector capilar e inhiben varios procesos tumorales. Los compuestos fenólicos son conocidos como excelentes “barredores” de especies reactivas de oxígeno debido a su propiedad de donar electrones. Su actividad antioxidante depende de la estabilidad de diferentes sistemas, así como, también del número y la localización de grupos hidroxilos. En muchos estudios *in vitro* los compuestos fenólicos han demostrado un alto nivel antioxidante comparado con vitaminas antioxidantes y carotenoides. En particular los flavonoides que poseen estructura catecol (estructura *o*-dihydroxil) son notablemente superiores en donar electrones ya que poseen grupos hidroxilos en posición próxima y por lo tanto, ejercen una poderosa actividad de barrer electrones.^(47,48,49) Lo anterior justifica que el hígado y el riñón no se han visto alterado (Fig 17, Fig 21).

La reducción del nivel de glicemia evidenciada en la presente investigación (Tabla 4, Fig3, Fig4, Fig5 y Fig6) se explicaría por la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (Tabla 1); al presente existen estudios sobre un tipo de glicósido de flavona (derivados de flavonoide)⁽⁵⁰⁾ quien demostró actividad hipoglicemiante debido a estaría ligado a los receptores proliferadores de peroxisomas (PPARs) o antagonistas de receptores glucagón, inhibidor dipeptidil peptidasa IV y activador de los receptores de insulina.⁽⁵¹⁾

Hay tres subtipos de PPAR, el PPAR- α , PPAR- γ , y PPAR- δ . El PPAR- α se encuentra en el hígado, músculo esquelético y riñones, mientras que el PPAR- δ está ampliamente expresado. El PPAR- γ está relacionado con la regulación y maduración del adipocito, siendo el sitio de acción para los fármacos sensibilizadores a la acción de la insulina como la troglitazona, pioglitazona y rosiglitazona los que conllevan a la reducción de la glicemia ^(52,53,54,55), este blanco molecular podría ser el sitio de acción donde posiblemente actuarían los flavonoides presentes en el extracto etanólico de las hojas de la guanábana (tabla 1), porque se ha demostrado actividad hipoglicémica con derivados de flavonoides como la quercetina⁵⁶ y la isoorientina⁵⁷.

La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una enzima que degrada a la incretina; la incretina es una hormona siendo el principal tipo de incretina predominante el GLP- 1 quien estimula la secreción de insulina, suprime la liberación de glucagon, enlentece el vaciamiento gástrico, mejora la sensibilidad a la insulina, y reduce el consumo de alimentos ^(58,59); y los flavonoides estarían favoreciendo la presencia del inhibidor dipeptidil peptidasa IV. ⁽⁶⁰⁾

Otros metabolitos secundarios que estarían coadyuvando con el efecto hipoglicémico son los alcaloides, quienes inducen la secreción de insulina solo en concentraciones altas de glucosa, lo cual disminuye el riesgo de hipoglicemia ^(61,62,63); lo que ha sido confirmado mediante estudios *in vitro* como los ejecutados por García López P. et al., 2004 quien al aislar los islotes pancreáticos y someterlos al alcaloide tipo quinolizidine conlleva a secreción de insulina, y esta fue medida por radioinmunoensayo. ⁽⁶⁴⁾

Realizando una comparación del efecto hipoglicemiante dado por otras plantas en ratas *Holtzmann* aloxanizadas, se observó que la actividad hipoglicemiante del *Geranium diesianum* Knuth (pasuchaca) presentó el efecto máximo a las cuatro horas de la administración de extracto acuoso a dosis de 10 g/kg de peso, mientras que con el *Solanum sessiliflorum* Dunal el periodo de latencia como hipoglicemiante fue menor que pasuchaca pero con menor eficacia; y la infusión de *Gentianella thyrsoidea* a ratas (*Rattus norvegicus*) diabéticas mostró una reducción de la glicemia a los cinco días⁽⁷⁾ ; en tanto, que se ha observado un inicio de efecto a las 48 horas con un 36.52% de eficacia hipoglicemiante al administrar por vía oral 200 mg/kg el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* L (tabla 3).

La presente investigación sirvió para demostrar que el extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L. (Guanábana) posee actividad hipoglicemiante en las condiciones experimentales y podría ser considerada como un producto natural de utilidad como coadyuvante en los tratamientos de pacientes que presentan intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus.

Por lo anterior, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las limitaciones, se recomienda realizar estudios de mayor duración por ser la diabetes mellitus una patología crónica, así como separar los metabolitos secundarios para verificar los posibles responsables de la actividad farmacológica, profundizar los estudios de seguridad con la finalidad de proyectar ensayos clínicos controlados, inicialmente en personas que padecen de intolerancia a la glucosa, para continuar en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

VI. CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* L. ha demostrado presencia de alcaloides, taninos, flavonoides y otros tipos de glicósido.
2. Se ha demostrado la eficacia hipoglicemiente al utilizar el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. (Guanábana) administrado por vía oral durante 5 días en ratas machos aloxanizados, con dosis de 200mg/kg.
3. El extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L. (Guanábana) en dosis de 200 mg/kg evidenció mayor incremento de los niveles de insulina al quinto día de tratamiento en las ratas con inducción de diabetes tipo 2, comparativamente con la glibenclamida.
4. El estudio histopatológico del páncreas, hígado y riñón ha demostrado una detención del daño inducido por aloxano en las ratas que recibieron el extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L. (Guanábana).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Girogino F, Laviola L, Leonardini A. Pathophysiology of type 2 diabetes: Rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005;68:S22-S29.
2. Charlton Fe, Nuñez O, Tapia Z L, Tapia Z G. Complicaciones tardías en diabetes mellitus tipo 2 en el Hospital II Essalud – Cañete. *Rev Med Hered* 2004; 15:64-69.
3. Barriga R. “Plantas Útiles de la Amazonía Peruana”. Iquitos; 1989.
4. Rutter RA. “Catálogo de Plantas Útiles de la Amazonia Peruana.” Lima; 1990.
5. Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Lima; 1987.
6. Campos R, Risco G. Estudio farmacognóstico y determinación de la actividad hipoglucemiante del fruto del *Solanum sessiliflorum* Duna “Cocona”.
7. Gutiérrez M. Efecto de *Gentianella thyrsoidea* “Tucuma” en el metabolismo de la glucosa en *rattus norvergicus* var. albina [Doctorado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
8. Naturmedica. [http:// www.naturmedica.com/graviola.htm/5/8/5](http://www.naturmedica.com/graviola.htm/5/8/5)
9. Guanábana. [http:// www.defiendetusalud.com/4903/17224.html/5/8/5](http://www.defiendetusalud.com/4903/17224.html/5/8/5)
10. Brack E. “Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú”. Cusco; 1996
11. Recursos Naturales [http:// www.minag.gob.pe/rrnn_guanabana.shtml](http://www.minag.gob.pe/rrnn_guanabana.shtml)
12. Branch, L.C. and da Silva, I.M.F. "Folk Medicine of Alter do Chao, Para, Brazil." *Acta Amazónica*. 1983;13: 737-797.

13. Meyer, TM. The Alkaloids of *Annona Muricata*. *Journal Natural Products*.1941;6: 64-86
14. Wu FE, Zeng L, Gu ZM, Zhao GX, Zhang Y, Schwedler JT, et al. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal Natural Products*. 1995; 6: 902-908.
15. Wu FE, Zeng L, Gu ZM, Zhao GX, Zhang Y, Schwedler JT, et al. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, anomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal Natural Products* 1995;6: 830-836.
16. Rieser, Kozlowski, WoodKV, Laughlin, et al: Muricatacin: a Simple Biologically Active Acetogenin Derivative from the Seeds of *Annona Muricata* (Annonaceae). *Tetrahedron Lett* 1991; 32 9: 1137-1140.
17. Padma P, Pramod NP, Thyagarajan SP, Khosa RL. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. *Journal Ethnopharmacology*. 1998;61:81-3.
18. Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu FE, Sastrodihardjo S, McLaughlin JL. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*. 1998;49:565-71
19. Bories C, Loiseau P, Cortes D, Myint SH, Hocquemiller R, Gayral P, et al. Antiparasitic Activity of *Annona Muricata* and *Annona Cherimolia* Seeds. *Planta Med*. 1991;57: 434-436.
20. Tattersfield, Potter .The Insecticidal Properties of Certain Species of *Annona* and an Indian Strain of *Mundulea Sericea*. *Journal Natural Products*. 1940;27: 262-273.
21. Hasrat J, De Bruyne T, De Backer J, Vauqueline, Vlietinck. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists

- in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *Journal of Ethnopharmacology* 1997;49:1145-1149.
22. Rieser MJ, Gu ZM, Fang XP, Zeng L, Wood KV, McLaughlin JL. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal Natural Products*. 1996;59:1035-1042.
23. Wu FE, Zeng L, Gu ZM, Zhao GX, Zhang Y, Schwedler JT, et al. New bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, anomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal Natural Products*. 1995; 58: 909-915.
24. McLaughlin, Oberlies NH, Croy VL, Marietta L, Harrison and Jerry L. The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*. 1997;115: 73-79
25. McLaughlin, Landolt JL, Ahammadsahib KI, Hollingworth RM, Barr R, Crane F, et al. Determination of structure-activity relationship of Annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*. 1995; 98: 1-13
26. Sobral BV, Lima Filho JF, Montenegro MBSM, Araújo AN and Lins SA. Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003; 33: 1025-1031
27. Motoyama T, Yabunaka H, Miyoshi. Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 12: 2089-2092.
28. Lannuzel A, Michel PP, Höglinger GU, Champy P, Jousset A, Medja F, et al. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience*. 2003; 121: 287-296

29. Cave A, Figadere B, Laurens A, Cortes D. Acetogennis from Annonaceae. Journal of Ethnopharmacology.1997; 57: 2502-52.
30. Angulo P. La Medicina Tradicional en el desarrollo de los medicamentos. 1ra.ed Ed. De Mar EIRL. Lima; 1997. p16.
31. National Advisory Committe for Laboratory Animal Research. Guideline on the Care and Use of animal scientific purposes; 2004.
32. Domínguez, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. Centro regional de ayuda técnica. México/Buenos Aires; 1988.
33. Lock de Ugaz, O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales.Lima, Fondo Editorial Pontificia universidad Católica del Perú. Lima; 1988,p 1-7.
34. Kameswara Rao, B, Kesavulu, M , Giri et al. Antidiabetic and hypolipidemic effects of Momardica cymbalaria Hook. fruit powder in alloxan diabetic rats. Journal Ethnofarmacology.1999;67: 103-109
35. R. González, R. Tarazona, M.D. Galiani, G, M. P. Espinosa y J. Peña. Métodos Basados en la unión Ag-Ac. http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/texto_pdf/tema_17.pdf.
36. Luna, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rded., McGraw-Hill Book Company. New York, USA, 1968
37. Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hidrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. Biochem Pharmacol. 1991; 42: 1385-1391.

38. Sotoa C, Menab R, Lunab J, Cerbonc M, Larrietad E, Vitald P, Uriae E, et al. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2003;136: 205–212.
39. Matthias Elsner, Ewa Gurgul-Convey and Sigurd Lenzen. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Journal Biology and Medicine*.2006;41: 825-834.
40. Udai Nakamura, Masanori Iwase, Yuji Uchizono, Kazuo Sonoki, Nobuhiro Sasaki, Hirofumi Imoto, et al. Rapid intracellular acidification and cell death by H₂O₂ and alloxan in pancreatic β cells. *Journal Biology and Medicine*.2006;40: 2047-2055.
41. Elsner, M, Tiedge M, Guldbakke, B, Munday, R, Lenzen, S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia* 2002;45:1542-1549.
42. Lortz S, Tiedge M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulinproducing cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;34:683-688.
43. Elsner, M, Tiedge M, Lenzen, S. Mechanism underlying resistance of human pancreatic beta cells against toxicity of streptozotocin and alloxan *Diabetologia* 2003;46:1713-1714.
44. Fridlyand, L, Philipson, L. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? *Diabetes*. 2004;53:1942-1948.
45. Young Jang Y, Ho Song J, Kyoo Shin Y, Sook Han E and Soo Lee C. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*. 2000;42:361-371.
46. John A. O. Ojewole. Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* (Willd) Hook methanolic root extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;81:231-237.

47. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A and Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*. 2005;51:117-123.
48. Shambhu D. Varma and Jin H. Kinoshita. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids—Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. *Biochemical Pharmacology*. 1976;25: 2505-2513.
49. Arroyo J, Rojas J, Ruez E, Ronceros G, Bonilla P, Li E. Influencia de compuestos fenólicos y triterpenoides de *Annona muricata* más *Krameria lappacea* sobre el proceso inflamatorio crónico. Estudio preclínico y clínico. *An Fac Med*. 2004;10:65-36.
50. Asgary S, Naderi Gh, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafie M and Arefian A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1999;73: 223-226.
51. Feinstein D, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavrilyuk V and Dello Russo C. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key?. *Biochemical Pharmacology*. 2005;70:177-188.
52. Bailey C.J. Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21: 259-265.
53. Panunti B, Jawa A. and Fonseca V. Mechanisms and therapeutic targets in type 2 diabetes mellitus *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2004;1:151-157.
54. Jannetta P.J. and Hollihan L. Type 2 diabetes mellitus, etiology and possible treatment: preliminary report. *Surgical Neurology*. 2004;61: 422-426.
55. Bradley C. The glitazones: a new treatment for type 2 diabetes mellitus. *Intensive and Critical Care Nursing*. 2002;18:189-191.

56. Vessal M, Hemmati M and Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2003;135: 357-364.
57. Sezika E, Aslana M, Yesiladaa E, Shigeru Ito. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay- directed fractionation techniques. *Life Sciences*. 2005;76: 1223–1238.
58. Christopher H, McIntosh S, Hans-Ulrich Demuth, J, Pospisilik A and Raymond P. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents?. *Regulatory Peptides*. 2005;128: 159-165.
59. Arechavaleta Granell R. El efecto fisiológico de las hormonas incretinas. *Adv Stud Med*. 2006;6:S581-S585.
60. Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Jang, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1985; 43:2800–2802.
61. Costantino L, Raimondi L, Pirisino R, Brunetti T, Pessotto P, Giannessi F, Paulino A, Barlocco D, Antolini L and El-Abady S. Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. *Pharmacy Research*. 2003;58:781-785.
62. Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E and Swiader K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Science and Chemistry*. 2007;100: 579-583.
63. Podsedek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. *LWT - Food Science and Technology*. 2007;40: 1-11.
64. García L, Garzón M, Wysocka W, Maiztegui B, Alzugaray M, Héctor Del Zotto H and Borelli M. Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology* 2004;504:139-142.

65. Harrigan R , Nathan M and Beattie P. Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology, toxicity, and treatment. *Annals of Emergency Medicine*. 2001;38:68-78.
66. Eckel R H, Grundy S and Zimmet P. The metabolic syndrome. *The Lancet* 2005;365:1415-1428.
67. Williams R, Amin R, Saukkonen T and Dunger D. Recent advances in diabetes mellitus. *Current Paediatrics*. 2003;13: 128-133.
68. Groop L. Glucosa and free fatty acid metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 1989; 84: 205-213.
69. Sameer M, Asia T, R.N.K. Bamezai and Najma Z. Modulation of glucose transporter (GLUT4) by vanadate and *Trigonella* in alloxan-diabetic rats. *Life Sciences*. 2006;78:820-824.
70. Robertson, R. Consequences on beta-cell function and reserve after long-term pancreas transplantation. *Diabetes*. 2004;53:633-644.
71. Lortz S, Tiedge M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulinproducing cells. *Free Radic. Biol. Med*. 2003;34:683-688.
72. Murota K and Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003;417: 12-17.
73. Kojima I and Umezawa K. Conophylline: A novel differentiation inducer for pancreatic β cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006;38: 923-930.