



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Uchuva (*Physalis peruviana* L.) cultivada bajo estrés salino y su efecto sobre el control de la glucosa”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

I.A.B. Nayely González Buenrostro

DIRIGIDO POR:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

CO-DIRECTOR:

Dra. Marely Graciela Figueroa Pérez

Querétaro, Qro a Febrero del 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Uchuva (Physalis Peruviana L.) cultivada bajo estrés salino y su efecto sobre el control de la glucosa

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A.B. Nayely González Buenrostro

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Co-dirigido por:

Dra. Marely Graciela Figueroa Pérez

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dra. Marely Graciela Figueroa Pérez
Co-Director

Dra. Minerva Ramos Gómez
Vocal

Dra. Silyia Lorena Amaya Llano
Suplente

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Febrero del 2021
México

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



González Buenrostro Nayely

Dirección General de Bibliotecas de la UAO

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme alcanzar este logro, por guiarme y darme la sabiduría en este proceso.

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, a mi padre por alentarme a continuar mi formación académica y profesional; muchos de mis logros se los debo a ustedes, me motivaron constantemente para alcanzar mis metas y ser mejor persona.

A Luis Alberto por su apoyo incondicional y compañía durante estos años, tu apoyo ha sido fundamental, has estado conmigo en todo momento. Ese proyecto no fue fácil pero siempre me motivaste a seguir adelante. Gracias por todo.

Dirección General de Bibliotecas de la UPO

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico durante la realización de este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Posgrado de Alimentos y programa de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos por la oportunidad de realizar mis estudios y el conocimiento adquirido, además de permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones.

A la Universidad Autónoma de México y al Laboratorio de Ruminología y Metabolismo Nutricional, por permitirme realizar una de las partes experimentales en sus instalaciones.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por su dirección, consejos, recomendaciones y apoyo durante todo el tiempo del programa y realización del proyecto.

A la Dra. Marely Graciela Figueroa Pérez por su orientación y apoyo para permitir la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez, Dra. Silvia Lorena Amaya Llano y al Dr. Edmundo M. Mercado Silva, miembros del comité evaluador, por sus observaciones y recomendaciones al presente proyecto.

A la Dra. Ofelia Mora y a la M. en C. María Laura González Dávalos del Laboratorio de Ruminología y Metabolismo Nutricional, Universidad Autónoma de México por sus consejos, apoyo y orientación al presente proyecto de investigación.

A la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez por su apoyo y orientación en el presente proyecto de investigación

A mis amigos de Laboratorio: Anita, Yuri, Alex, Mariana, Haiku, Jorge Copado, Ale, Karen, Nacho, Isis, Gaby, Julissa, Eréndira, Yaz; por el tiempo ameno que compartimos juntos y el apoyo que siempre me brindaron.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	12
2	ANTECEDENTES	14
2.1	Diabetes	14
2.2	Tratamientos para el control de la diabetes	14
2.3	Generalidades de <i>Physalis peruviana</i>	15
2.3.1	Efectos antidiabéticos de <i>Physalis peruviana</i>	18
2.4	Estrés salino y producción de metabolitos secundarios.....	21
3	JUSTIFICACIÓN	25
4	HIPÓTESIS	26
5	OBJETIVOS	26
5.1	Objetivo general	26
5.2	Objetivos específicos	26
6	MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1	Materiales.....	29
6.1.1	Material vegetal	29
6.1.2	Material biológico.....	29
6.2	Métodos	30
6.2.1	Medición de color en hoja y fruto deshidratados.....	30
6.2.2	Determinación de la composición fitoquímica.....	30
6.2.2.1	Preparación de las decocciones.....	30
6.2.2.2	Extracción de compuestos fenólicos totales en la hoja y fruto deshidratados.....	30
6.2.2.3	Concentración de compuestos fenólicos totales	31
6.2.2.4	Concentración de flavonoides totales.....	31

6.2.2.5	Concentración de proantocianidinas extraíbles	32
6.2.2.6	Concentración de proantocianidinas no extraíbles en hoja y fruto deshidratados.....	32
6.2.2.7	Concentración de polifenoles hidrolizables en hoja y fruto deshidratados.....	32
6.2.2.8	Determinación de carotenoides totales en fruto deshidratado.....	33
6.2.3	Evaluación de la capacidad antioxidante.....	34
6.2.3.1	Técnica del radical ABTS	34
6.2.3.2	Técnica DPPH.....	35
6.2.4	Selección de los tiempos de decocción	36
6.2.5	Análisis de metabolitos secundarios en decocciones de fruto y hoja deshidratados	36
6.2.5.1	Preparación de las muestras.....	36
6.2.5.2	Condiciones del análisis cromatográfico	36
6.2.5.3	Capacidad de inhibición de lipasa pancreática.....	37
6.2.6	Estudio <i>in vitro</i>	39
6.2.6.1	Mantenimiento de la línea celular	39
6.2.6.2	Diferenciación celular	40
6.2.6.3	Viabilidad celular	41
6.2.6.4	Prueba de captación de glucosa	42
6.2.7	Tolerancia oral al almidón en ratas sanas	42
6.2.8	Determinación de azúcares reductores en las decocciones de hoja y fruto	43
6.3	Análisis estadístico.....	44
7	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	45
7.1	Color del polvo de hojas y frutos	45

7.2	Cambios en el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en hoja y fruto deshidratados por efecto del estrés salino	48
7.3	Cambios en el contenido de compuestos fenólicos no extraíbles en hoja y fruto deshidratados por efecto del estrés salino	53
7.4	Cambios en el contenido de carotenoides totales en fruto deshidratado por efecto del estrés salino	55
7.5	Cambios en la capacidad antioxidante en hojas y frutos deshidratados por efecto del estrés salino	58
7.6	Cambios en los contenidos de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante de las aguas de decocción de hoja y fruto deshidratados de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a estrés salino.....	63
7.7	Perfil de compuestos fitoquímicos en el agua de decocción de hoja y fruto de <i>Physalis peruviana</i> sometida a 40 mM de estrés salino.....	76
7.8	Evaluación del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de las decocciones de hoja y fruto sometidas a 40 mM de estrés salino sobre lipasa pancreática	81
7.9	Evaluación del efecto hipoglucémico <i>in vivo</i> de las decocciones de hoja y fruto de <i>Physalis peruviana</i> sometidas a 40 mM de estrés salino.....	85
7.10	Prueba de viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1, cultivados en medio suplementado con las decocciones de la hoja y el fruto de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a 40 mM de estrés salino.....	89
7.11	Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1, cultivados en medio suplementado con las decocciones de la hoja y el fruto de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a 40 mM de estrés salino.....	93
8	CONCLUSIONES	96
9	REFERENCIAS	98

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición nutrimental y micronutrientes de <i>Physalis peruviana</i>	17
Cuadro 2. Contenido de compuestos bioactivos en <i>Physalis peruviana</i>	18
Cuadro 3. Valores de color en los polvos de hojas y frutos de <i>Physalis peruviana</i> cultivada bajo diferentes concentraciones de estrés salino.	47
Cuadro 4. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos extraíbles de hoja y fruto deshidratados de <i>Physalis peruviana</i> sometida a diferentes niveles de estrés salino.....	49
Cuadro 5. Cambios en los contenidos de compuestos fenólicos no extraíbles en hojas y frutos deshidratados de <i>Physalis peruviana</i> sometida a diferentes niveles de estrés salino.....	54
Cuadro 6. Cambios en el contenido de carotenoides totales en fruto deshidratado de <i>Physalis peruviana</i> sometida a diferentes niveles de estrés salino.	57
Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante en hojas y frutos deshidratados de <i>Physalis peruviana</i> sometida a distintos niveles de estrés salino.	63
Cuadro 8. Identificación de compuestos fitoquímicos mediante UPLC-MS-QTOF en el agua de las decocciones al 3% p/v de hoja y del fruto de <i>Physalis peruviana</i> sometida 40 mM de NaCl	78
Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante en las decocciones al 3% p/v liofilizadas de la hoja y el fruto de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a 40 mM de NaCl.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de tolerancia oral a la glucosa en cuyos (<i>Cavia porcellus</i>) tratados con extracto acuoso de hojas de <i>Physalis peruviana</i>	19
Figura 2. Señales en respuesta al estrés salino.....	22
Figura 3. Estrategia general de trabajo.....	28
Figura 4. Capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH de hojas y frutos deshidratados de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a distintos niveles de estrés salino.....	59
Figura 5. Capacidad antioxidante mediante el método del radical ABTS de hojas y frutos deshidratados de <i>Physalis peruviana</i> sometida a distintos niveles de estrés salino.....	61
Figura 6. Fenoles totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de hoja de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino	65
Figura 7. Flavonoides totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de hoja de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino.	66
Figura 8. Proantocianidinas extraíbles extraídas en agua a diferentes tiempos de decocción de hoja de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino	67
Figura 9. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical DPPH en las aguas de la decocción de hoja de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino.....	68
Figura 10. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical ABTS en las aguas de la decocción de hoja de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino.....	69
Figura 11. Fenoles totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de fruto de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino	71
Figura 12. Flavonoides totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de fruto de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino	72
Figura 13. Proantocianidinas extraíbles extraídas en agua a diferentes tiempos de decocción de fruto de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino	73

Figura 14. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical DPPH en las aguas de la decocción de fruto de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino.....	74
Figura 15. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical ABTS en las aguas de la decocción de fruto de <i>Physalis peruviana</i> , cultivada a distintos niveles de estrés salino.....	75
Figura 16. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del agua de las decocciones de hoja y fruto de <i>Physalis peruviana</i> sometidas a 40 mM de estrés salino sobre lipasa pancreática	82
Figura 17. Fenoles totales en el agua de las decocciones de hoja y fruto de <i>Physalis peruviana</i> sometida a 40 mM de estrés salino.....	84
Figura 18. Efecto de la administración del agua de las decocciones de hoja y fruto al 5% p/v de <i>Physalis peruviana</i> en la tolerancia oral al almidón en ratas Wistar sanas	86
Figura 19. Efecto de la administración del agua de las decocciones de hoja y fruto al 5% p/v de <i>Physalis peruviana</i> en la tolerancia oral al almidón en ratas Wistar sanas	87
Figura 20. Contenido de azúcares reductores en el agua de las decocciones al 5% p/v de la hoja y el fruto de <i>Physalis peruviana</i> sometida a 40 mM de estrés salino.	88
Figura 21. Porcentaje de proteína mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), en células de adipocitos 3T3-L1 cultivadas en medio suplementado con los liofilizados de las decocciones al 3% p/v de la hoja y el fruto de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a 40 mM de estrés salino.....	92
Figura 22. Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1, cultivados en medio suplementado con las decocciones de la hoja y el fruto al 3% p/v de <i>Physalis peruviana</i> , sometida a 40 mM de estrés salino.....	94

ABREVIATURAS Y SIGLAS

4CL: 4-cumarato CoA ligasa

ABTS⁺⁺: ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotazolín-6-sulfónico)

ANOVA: análisis de varianza

AtNHX1: antiportador vacuolar Na⁺/H⁺

BCA: ensayo del ácido bicinconínico

β-LCY: licopeno β-ciclase

C4H: cinamato 4-hidroxilase

cAMP: adenosín monofosfato ciclíco

CAT: catalase

CHI: chalcona isomerase

CHS: chalcona sintase

CNGC: canales cerrados por nucleótidos ciclícos

DA-NSCC: canales de voltaje independientes no selectivos

DFR: dihidroflavonol 4-reductase

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

DPPH^{*}: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EAG: equivalentes de ácido gálico

EPA: proantocianidinas extraíbles

ERO: especies reactivas de oxígeno

ESI: ionización por electrospray

F3050H: flavonoide 3050-hidroxilasa

F30H: flavonoide 30-hidroxilasa

F3H: flavanona 3-hidroxilasa

FLS: flavonol sintasa

HPLC-DAD: cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos

HPP: polifenoles hidrolizables

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IFR: isoflavona reductasa

IFS: isoflavona sintasa

IV-NSCC: canales de cationes no selectivos activados por despolarización

KOR: canal rectificador de iones potasio

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MYB111: factor de transcripción MYB

NEPA: proantocianidinas no extraíbles

OSCA-1: canal permeable al calcio regulado por hiperosmolalidad

PA: ácido fosfátidico

PAL: fenilalanina amonio liasa

PBS: solución salina amortiguada por fosfatos

PDA: detecto de matriz de fotodiodos

PLC: fosfolipasa C

RbohF: oxidasa homóloga F

SOD: superóxido dismutasa

STZ: estreptozocina

UFGT: flavonoide UDP glicosil transferasa

UPLC-MS-QTOF: cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador cuádruplo-tiempo de vuelo

WR: reactivo de trabajo

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

RESUMEN

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) ha sido usada en la medicina tradicional como tratamiento contra la diabetes. Las propiedades atribuidas están relacionadas con su perfil de metabolitos bioactivos y su concentración en la planta puede ser modificada mediante estrés salino. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del estrés salino sobre la composición de compuestos bioactivos en uchuva, así como la actividad hipoglucemiante de sus decocciones en un modelo *in vivo* e *in vitro*. Las plantas de uchuva fueron tratadas con NaCl hasta una concentración de 0, 10, 20, 30 y 40 mM en la solución nutritiva; se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos extraíbles, no extraíbles y capacidad antioxidante mediante DPPH y ABTS en frutos y hojas. El contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante se evaluó en las decocciones a intervalos de 5 min y el mejor tiempo de ebullición se eligió para determinar: el perfil de compuestos fitoquímicos en un sistema UPLC-MS-QTOF, la capacidad de inhibición de la enzima lipasa pancreática, tolerancia oral al almidón en ratas sanas y captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1. En hojas se observaron incrementos en fenoles totales de 103%, flavonoides de 25% y polifenoles hidrolizables (HPP) de 34%, mientras que en fruto incrementaron los flavonoides en 20%, las proantocianidinas extraíbles (EPA) y no extraíbles (NEPA) en un 39% y 19%, respectivamente, con el estrés salino. La quercetina rutinósido fue el compuesto mayoritario en decocción de hoja; mientras que, los ácidos cítrico e hidroxibenzoico hexósido fueron mayoritarios en decocción de fruto. La decocción del fruto al 5% p/v, sin estresar, inhibió a la lipasa pancreática en un 45 %. La decocción de hoja estresada a 40 mM, suplementada a adipocitos 3T3-L1 a 0.50 mg/mL, aumentó en un 16% la captación de glucosa, sin embargo; en ratas sanas el pico hiperglucémico disminuyó en un 8%. La aplicación de estrés salino aumentó el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en hoja de uchuva, potenciando su efecto sobre la disminución de glucosa en ratas sanas y adipocitos 3T3-L1, lo cual podría impactar de manera positiva en el control de la hiperglicemia en diabetes.

(Palabras clave: *Physalis peruviana*, estrés salino, diabetes, *in vitro*, *in vivo*)

ABSTRACT

Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) has been used in traditional medicine as a treatment for diabetes. The attributed properties are related to its profile of bioactive metabolites, and their concentration in the plant can be modified by saline stress application. The aim of this work was to determine the effect of salt stress in the composition of bioactive compounds of cape gooseberry, and hypoglycemic activity of its decoctions through *in vivo* and *in vitro* model. Cape gooseberry plants were treated with NaCl up to a concentration of 0, 10, 20, 30 and 40 mM in nutritive solution; extractable and non-extractable phenolic compounds, and antioxidant capacity were determined in leaf and fruit by DPPH and ABTS methods. Then, in decoctions, extractable phenolic compounds and antioxidant capacity were determined at intervals of 5 min, thus the best boiling time was selected to evaluate profile of phytochemical compounds in an UPLC-MS-QTOF system, pancreatic lipase inhibition capacity, oral starch tolerance in healthy rats and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. In leaves total phenols increased by 103%, flavonoids by 25% and hydrolyzable polyphenols (HPP) by 34%, whereas in fruits flavonoids increased by 20%, extractable proanthocyanidins (EPA) and non-extractable proanthocyanidins (NEPA) increased with saline stress by 39% and 19%, respectively. Quercetin rutinoside was the major compound in leaf decoctions, being citric and hydroxybenzoic acid hexoside in fruit decoction. Non-stressed fruit decoction at 5% w/v inhibited pancreatic lipase by 45%. 40 mM-treated leaf decoction, at a dose of 0.50 mg/mL, increased glucose uptake by 16% in 3T3-L1 adipocytes, however; in healthy rats the hyperglycemic peak decreased by 8%. Salt stress in cape gooseberry increased the content of extractable phenolic compounds in leaf, enhancing its effects on control of glucose levels in healthy rats and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, which could have a positive impact on hyperglycemia control in diabetes.

(Key words: *Physalis peruviana*, salt stress, diabetes, *in vitro*, *in vivo*)

1 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, 8.8% de la población mundial adulta padece la enfermedad (Katsarou *et al.*, 2017). En 2018, la prevalencia en México para adultos fue de 10.3% (ENSANUT, 2018) y en el 2017 fue la segunda causa de muerte (INEGI, 2018).

La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina, lo que genera una disminución en la captación de glucosa en tejidos periféricos, y un aumento en la producción de insulina y glucosa hepática (Evans *et al.*, 2002). Además, se presenta una disminución en el control de la lipólisis, lo que aumenta el nivel de ácidos grasos en la sangre (DeFronzo, 2004; Baynest, 2015).

Dentro de los tratamientos usados para el control de la diabetes y sus complicaciones se encuentran algunos componentes de las plantas que contienen compuestos bioactivos con propiedades hipoglucemiantes (Kooti *et al.*, 2016). En la actualidad se han buscado alternativas naturales para tratar la diabetes y sus complicaciones, donde el consumo de frutos y el agua de las decocciones de hojas como las de la uchuva (*Physalis peruviana*) pudieran ser una buena estrategia, ya que han sido utilizados en la medicina tradicional (Lock *et al.*, 2016).

El fruto de uchuva presenta capacidad de inhibición de enzimas digestivas como la α -amilasa y la α -glucosidasa (Rey *et al.*, 2015; Bernal *et al.*, 2018). De acuerdo a lo reportado por Rodríguez y Rodríguez (2007) el consumo de una porción de 25 g del fruto de *Physalis peruviana* reduce la glucosa postprandial en adultos jóvenes sanos; esta actividad podría asociarse a los flavonoides y fisalinas presentes en el fruto, debido a que son los compuestos mayoritarios, sin embargo, los autores no identificaron el mecanismo de acción. Asimismo, Kasali y colaboradores (2013) reportan que el extracto de hojas de *P. peruviana* reduce el pico hiperglucémico en cuyos (*Cavia porcellus*) de experimentación, después de una prueba de tolerancia a la glucosa.

Por otro lado, una de las estrategias que se tienen para incrementar la acumulación de compuestos bioactivos en plantas es la aplicación de moléculas inductoras como las sales, que activan la síntesis de metabolitos secundarios (Ramakrishna y Gokare, 2011).

Respecto al estrés salino, no existen reportes sobre el fruto *P. peruviana*; sin embargo, Miranda y colaboradores (2014) demostraron que cuando la planta se somete a altas concentraciones de NaCl se incrementa la capacidad antioxidante de las hojas, así como el contenido de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Alves *et al.*, 2017). El estudio sugiere que la planta de uchuva presenta una resistencia al estrés salino y que otros mecanismos de respuesta al estrés salino, como la producción de metabolitos secundarios, se inducen bajo la condición de estrés.

Con base en lo anterior, y debido a que los efectos de la diabetes pueden prevenirse y reducirse con el consumo de compuestos bioactivos provenientes de la dieta, en este trabajo se propuso evaluar el efecto de la aplicación de diferentes niveles de cloruro de sodio en la solución nutritiva de fertilización de la planta, sobre la composición fitoquímica y capacidad antioxidante de la hoja y fruto de uchuva; así como, evaluar el efecto de las aguas de decocciones de esos órganos vegetales sobre la inhibición de la lipasa pancreática, tolerancia oral al almidón en ratas sanas y el control del transporte de glucosa en células de adipocitos 3T3-L1.

2 ANTECEDENTES

2.1 Diabetes

La diabetes es un desorden metabólico caracterizado por una hiperglicemia crónica, con efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (Baynest, 2015). En México la prevalencia del 2018 fue de 10.3% en adultos (ENSANUT, 2018); además, en 2017 la diabetes fue segunda causa de muerte en México (INEGI, 2018).

De manera general, ésta enfermedad se clasifica en diabetes tipo 1, derivada de una destrucción celular autoinmune de las células β -pancreáticas, lo que trae como consecuencia una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, requiriendo así su administración. (Holt, 2004; Zaccardi *et al.*, 2016). La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina, lo que disminuye la captación de glucosa en tejidos periféricos, aumenta la producción glucosa hepática e insulina (Evans *et al.*, 2002); se presenta además una disminución en el control lipólisis (Baynest, 2015) aumentando así el nivel de ácidos grasos en la sangre (DeFronzo, 2004). La hiperglicemia crónica genera inflamación, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico en las células β pancreáticas, así en etapas posteriores de la diabetes tipo 2 se puede requerir la administración de insulina (Thomas *et al.*, 2009).

2.2 Tratamientos para el control de la diabetes

El tratamiento con insulina, fármacos y una dieta controlada suelen ser las terapias para el control de la diabetes. Algunos fármacos estimulan la secreción de insulina, como las sulfonilureas y meglitinidas; otros incrementan la absorción de glucosa en tejidos periféricos, como las biguanidas y tiazolidinedionas; finalmente, existen los inhibidores de la α -glucosidasa intestinal y reductores de la gluconeogénesis hepática, como las biguanidas (Tahrani *et al.*, 2016).

Los blancos de tratamiento pueden actuar a distintos niveles y algunos compuestos fitoquímicos poseen mecanismos de acción similares a los fármacos anteriormente mencionados; además algunos son compuestos antioxidantes y antiinflamatorios que pueden emplearse para disminuir el estrés oxidativo e inflamación que presenta el enfermo diabético (Kooti *et al.*, 2016). La disminución de la digestión de carbohidratos y lípidos de la dieta, así como un aumento en la captación de glucosa son blancos de acción importantes, ya que, han mostrado una correlación positiva con la disminución de glucosa post-prandial y ácidos grasos libres (Hamden *et al.*, 2013).

2.3 Generalidades de *Physalis peruviana*

Physalis peruviana L. es una planta originaria de los andes peruanos perteneciente a la familia *Solanaceae*; es comúnmente conocida como uchuva o tomate silvestre. Su apariencia y sabor son similares al tomate; es consumida en fresco, salsas, mermeladas y deshidratada. La planta se adapta a varios tipos de suelos, altitudes, baja temperatura y tiene pocos requerimientos de fertilización (Puente *et al.*, 2011). La temperatura óptima para su desarrollo y crecimiento es de 8-20°C y es cultivada en altitudes de 1500-3800 metros. El crecimiento puede llevarse a cabo en suelos nutricionalmente pobres y de tipo ligeros (arenosos), medios (arcillosos) y pesados (arcillosos), sin embargo, prefiere suelos bien drenados (Fischer, 2000).

Entre los principales países productores del fruto se encuentran Colombia, Ecuador y Chile; además de Zimbabue, Kenia, Sudáfrica, Costa Rica, India, Australia y Nueva Zelanda (Fischer *et al.*, 2011). Existe interés en el cultivo de la planta debido a las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes que le son atribuidas (Fischer *et al.*, 2011). La producción del fruto ha aumentado a 18 889 toneladas en Colombia, principal país productor, debido al mercado emergente de frutos exóticos, principalmente en países europeos (Fischer y Melgarejo, 2020).

El fruto se considera exótico en México, sin embargo no se ha aprovechado su cultivo para fines comerciales al no existir áreas de producción extensiva; no obstante, en los últimos años se ha incrementado su cultivo principalmente con fines de investigación. Los estudios en México han evaluado su potencial productivo, manejo agronómico y adaptación a condiciones climáticas, comprobando que es viable su producción en condiciones de invernadero e hidroponía (Castañeda *et al.*, 2013; Gastelum-Osorio *et al.*, 2013; Sabino-López *et al.*, 2016).

Dentro de su composición nutrimental por 100 g de pulpa destaca el contenido de carbohidratos, así como: vitamina A, vitamina C, vitamina K, hierro y potasio (Cuadro 1) (Puente *et al.*, 2011).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Cuadro 1. Composición nutrimental y micronutrientes de *Physalis peruviana*

Compuesto	Cantidad/100 g	Referencia
Carbohidratos	19.6 g	Puente <i>et al.</i> , 2011
Lípidos	0.2 g	Puente <i>et al.</i> , 2011
Proteínas	0.3 g	Puente <i>et al.</i> , 2011
Fibra dietética	4.9 g	Puente <i>et al.</i> , 2011
α -tocoferol	4.7 mg ^b	Puente <i>et al.</i> , 2011
γ - tocoferol	11.9 mg ^b	Puente <i>et al.</i> , 2011
Vitamina C	43.0 mg ^a	Puente <i>et al.</i> , 2011
Vitamina E	23.2 mg ^b	Puente <i>et al.</i> , 2011
Vitamina K	0.5 mg ^b	Puente <i>et al.</i> , 2011
Fósforo	55.0 mg ^a	Hassanien, 2011
Hierro	1.2 mg ^a	Hassanien, 2011
Potasio	320 mg ^a	Puente <i>et al.</i> , 2011
Zinc	0.3 mg ^a	Puente <i>et al.</i> , 2011

^apor 100g de pulpa, ^bpor 100 g de fruto entero

Respecto al fruto, los compuestos fitoquímicos reportados incluyen compuestos fenólicos como rutina, miricetina, quercetina y kaempferol (Licodiedoff *et al.*, 2013), catequina y epicatequina, ácidos cafeico y gálico (Olivares-Tenorio *et al.*, 2016), catecol, apigenina, naringenina y ácido *p*-hidroxibenzoico (El-Beltagi *et al.*, 2019), siríngico, vanílico, *p*-cumárico, trans-ferúlico y cinámico (Vega-Gálvez *et al.*, 2014), salicílico, gentísico, protocatequínico, quínico, pirogálico, ferúlico, sináptico y clorogénico (Rockenbach *et al.*, 2008).

También se han identificado fitoesteroles como campesterol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, lanosterol, estigmasterol, Δ 7-avenasterol y ergosterol. Además, se incluyen los esteroides fisalina A, B, D, E, fiperunólido A, B, C, D, peruvianóxido, fiperunólido E, fiperunólido F, 4 β -hidroxiwitánólido, witánólido E, C y S (Puente *et al.*, 2011). Algunos de los compuestos cuantificados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Contenido de compuestos bioactivos en *Physalis peruviana*

Compuesto	Cantidad mg/100 g	Referencia
Miricetina	4.7 ^b	Licodiedoff <i>et al.</i> , 2013
Quercetina	42 ^b	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999
Rutina	78.6 ^b	Licodiedoff <i>et al.</i> , 2013
Kaempferol	2.4 ^b	Licodiedoff <i>et al.</i> , 2013
Δ 5-avenasterol	3.3 ^b	Puente <i>et al.</i> , 2011
Campesterol	3.6 ^b	Puente <i>et al.</i> , 2011
Linoleico C18:2 n-6	141 ^b	Hassanien, 2011
Oleico C18:1 n-9	26 ^b	Hassanien, 2011
Palmítico	17.2 ^b	Hassanien, 2011
β - caroteno	1460 ^a	Puente <i>et al.</i> , 2011

^apor 100 g de pulpa, ^bpor 100 g de fruto entero

2.3.1 Efectos antidiabéticos de *Physalis peruviana*

La uchuva es recomendada en la medicina tradicional peruana para las personas con diabetes (Lock *et al.*, 2016), en Colombia es utilizada con el mismo fin (Toscano-González *et al.*, 2006). Por otro lado, la hoja de *P. peruviana* es utilizada en el Congo para el tratamiento de la diabetes (Kasali *et al.*, 2013).

Kasali y colaboradores (2013) reportaron que el extracto acuoso de hojas de *P. peruviana* administrado a cuyos (*Cavia porcellus*) de experimentación redujo el pico hiperglicémico, después de 30 minutos, en una prueba de tolerancia a la glucosa, mostrando un menor pico hiperglicémico comparado con el producido por la glibenclamida y el grupo control (Figura 1).

En este estudio se sugirió que las fisalinas pueden ser las responsables de los efectos hipoglucémicos, ya que se le han asociado efectos antiinflamatorios relacionados al desarrollo de diabetes. El efecto antiinflamatorio asociado a las fisalinas no fue demostrado en el modelo utilizado.

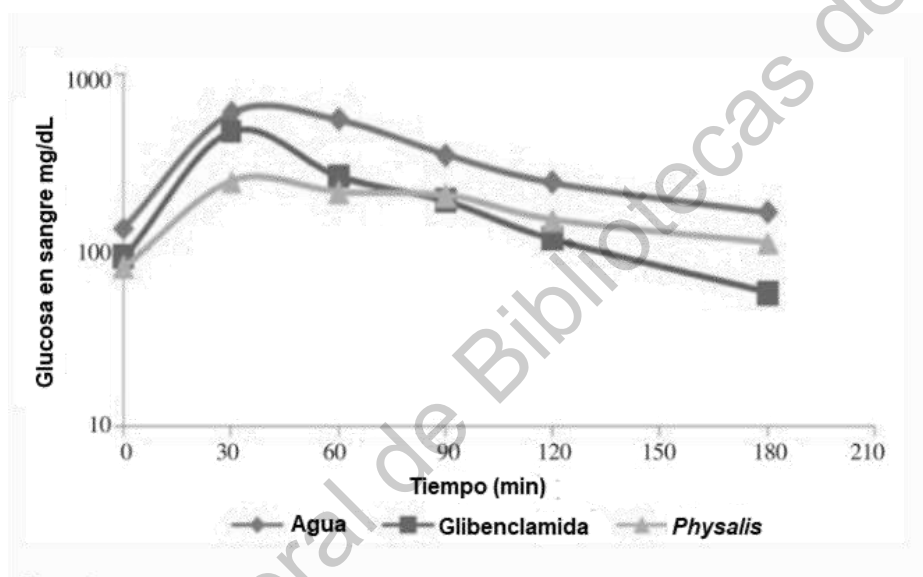


Figura 1. Curva de tolerancia oral a la glucosa en cuyos (*Cavia porcellus*) tratados con extracto acuoso de hojas de *Physalis peruviana*. El grupo control positivo recibió glibenclamida 2.5 mg/kg, el grupo tratado 100 mg/kg de extracto de hojas de *Physalis peruviana* y el control negativo 1 mL de solución salina, de forma enteral (Adaptada de Kasali *et al.*, 2013).

Respecto al fruto se ha demostrado que uno de los mecanismos de acción está relacionado a la inhibición de enzimas digestivas.

Rey y colaboradores (2015) reportaron que el extracto etanólico del fruto de *P. peruviana* mostró una inhibición no competitiva de la enzima α -amilasa de *Saccharomyces cerevisiae* e inhibición competitiva de la α -glucosidasa y maltasa intestinal de rata.

Los autores no asociaron el efecto a compuestos específicos presentes en el fruto, no obstante, se ha reportado que el kaempferol presente en el fruto de uchuva, inhibe a la enzima α -glucosidasa, por eso es posible sugerir que este fruto pudiera tener esta propiedad (Peng *et al.*, 2016).

Rodríguez y Rodríguez (2007) reportaron que el consumo de 25 g del fruto de *P. peruviana* reduce la glucosa postprandial después de 90 minutos de haberse administrado en adultos jóvenes sanos; se sugirió que el efecto puede estar relacionado a los flavonoides y las fisalinas presentes; sin embargo, los autores no realizaron una identificación y asociación de los fitoquímicos presentes en el fruto con los efectos benéficos presentados.

Sathyadevi y colaboradores (2014) estudiaron el efecto de la administración enteral del extracto etanólico del fruto (200 mg/kg) durante 30 días, en ratas con diabetes tipo 2 inducida por STZ (estreptozocina). Este tratamiento redujo el consumo de alimento y agua; también se presentó una disminución de los niveles de glucosa e insulina en plasma y se incrementaron los niveles de glucógeno en hígado y músculo. Los resultados sugieren que el tratamiento protege a las células β pancreáticas del daño oxidativo producido por la STZ o que algunos componentes del fruto podrían mejorar la liberación o acción de la insulina; dichos mecanismos no fueron evaluados en el estudio.

La decocción es una de las formas de empleo de esta planta en la medicina tradicional, donde se podrían presentar los efectos benéficos asociados a los extractos no acuosos de uchuva. La disminución de la digestión de carbohidratos *in vivo* y captación de glucosa son blancos de acción importantes, que deben ser comprobados; éste efecto podría ser potenciado al modificar el perfil y contenido de compuestos fitoquímicos en la planta, utilizando tecnologías agrícolas como el estrés salino. Por ello, es de importancia comprobar el efecto de las decocciones, para consumirse como parte de la dieta y control de la enfermedad.

2.4 Estrés salino y producción de metabolitos secundarios

Las plantas superiores producen metabolitos secundarios que actúan como defensa en respuesta a patógenos, herbívoros y factores de estrés. La acumulación y producción de metabolitos puede ocurrir debido al estrés generado por elicitores o moléculas inductoras de defensa contra agentes externos como las sales (Ramakrishna y Gokare, 2011).

P. peruviana es moderadamente tolerante a la sal (Miranda *et al.*, 2010); cuando se induce un estrés salino con NaCl, se incrementa la actividad antioxidante de las hojas (Miranda *et al.*, 2014). Alves y colaboradores (2017) mediante cultivo de tejidos estudiaron los efectos de diferentes niveles de estrés salino (0.5 y 1% de NaCl) durante el crecimiento de segmentos nodales de *P. peruviana*, observando un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y CAT.

En plantas pertenecientes a la familia de la uchuva (Solanacéas), como el tomate *Lycopersicon esculentum*, el estrés salino aumenta el contenido de carotenoides totales y licopeno en el fruto (Pascale *et al.*, 2001); éste efecto no se ha estudiado en el fruto de *P. peruviana*.

Los estudios sugieren que *P. peruviana* posee tolerancia al estrés salino y que la activación de otros mecanismos de defensa, como la producción de metabolitos secundarios, se presentan en la planta.

La salinidad además de causar sequía fisiológica, desbalance iónico y reducción en la fotosíntesis, causa un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Han *et al.*, 2008). La acumulación de enzimas y compuestos antioxidantes, en las plantas sometidas a estrés salino, se deriva de la sobreproducción de ERO, que deben ser eliminadas por los sistemas antioxidantes como primer medida para evitar un daño fisiológico o estrés oxidativo (Parida y Das, 2005).

El mecanismo inicia cuando el sodio entra a través de las células corticales y de la raíz mediante los canales de cationes no selectivos activados por despolarización (IV-NSSC), lo que lleva a la activación del DA-NSSC (canales de voltaje independientes no selectivos) y KOR (canal rectificador de iones potasio), provocando la despolarización de la membrana (Figura 2) (Parida y Das, 2005).

El aumento de turgencia induce la activación de las quinasas que producen cAMP (adenosín monofosfato cíclico) y del canal OSCA-1 (canal permeable al calcio regulado por hiperosmolalidad) (Parida y Das, 2005). Posteriormente, el cAMP inhibe KOR y DA-NSSC, e induce la apertura de canales cerrados por nucleótidos cíclicos (CNGC), llevando a un incremento de Ca^{2+} apoplástico en el citosol (Julkowska y Testerink, 2015). El calcio como segundo provoca la activación de la oxidasa homóloga F (RbohF), induciendo la producción de ERO (Julkowska y Testerink, 2015).

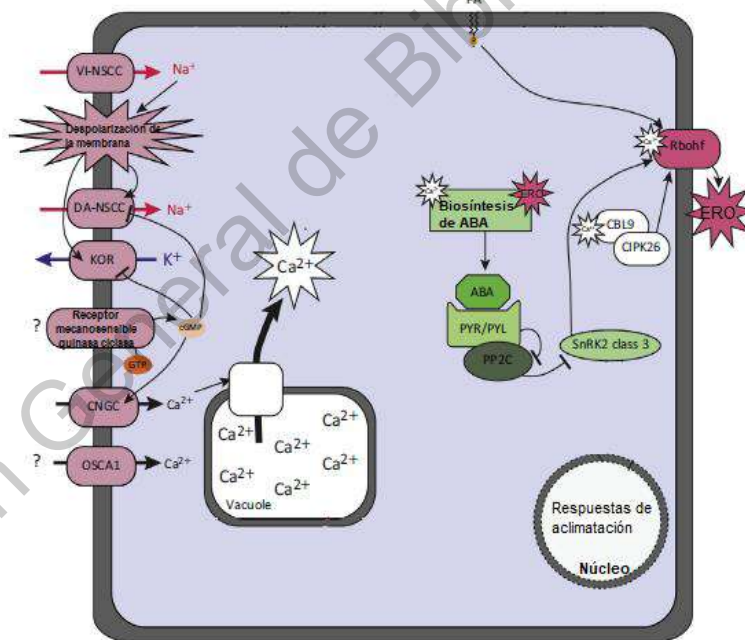


Figura 2. Señales en respuesta al estrés salino. IV-NSSC: canales de cationes no selectivos activados por despolarización, DA-NSSC: canales de voltaje independientes no selectivos, KOR: canal rectificador de iones potasio, cAMP: adenosín monofosfato cíclico, OSCA-1: canal permeable al calcio regulado por hiperosmolalidad, CNGC: canales cerrados por nucleótidos cíclicos, CBL9: proteína tipo calcineurina B 9, CIPK26: proteína quinasa de serina/treonina que interactúa con CBL, RbohF: oxidasa homóloga F, PA: ácido fosfátidico, PYR/PYL: receptores de resistencia a pirabactina, PP2C: fosfatasa 2C dependiente de ABA, SnRK2 clase 3: proteína quinasa 2 relacionada con SNF1 (Adaptada de Julkowska y Testerink, 2015).

Un segundo mecanismo involucra la inducción de la fosfolipasa C (PLC), que contribuye a la producción de ácido fosfátidico (PA), el cual actúa sobre Rboh (Julkowska y Testerink, 2015) (Figura 2).

El estrés oxidativo causa daños celulares al afectar la producción de proteínas y generar daños a la membrana celular, debido a esto, las plantas activan los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las plantas con mayor contenido de compuestos antioxidantes han mostrado tener mayor resistencia a las condiciones de estrés abiótico (Gholizadeh *et al.*, 2010). El estrés oxidativo se acompaña de una regulación en el nivel de transcritos involucrados en la síntesis de compuestos fenólicos, como : PAL (fenilalanina amonio liasa), C4H (cinamato 4-hidroxilasa), 4CL (4-cumarato CoA ligasa), CHI (chalcona isomerasa), F3H (flavanona 3-hidroxilasa), F3O3H (flavonoide 3-O-hidroxilasa), F3O5H (flavonoide 3-O-hidroxilasa), DFR (dihidroflavonol 4-reductasa), FLS (flavonol sintasa), IFS (isoflavona sintasa), IFR (isoflavona reductasa) y UFGT (flavonoide UDP glicosil transferasa) (Sharma *et al.*, 2019).

La producción de PAL como respuesta al estrés salino ha sido documentada, se ha observado que las plantas que crecen bajo condiciones de salinidad tienen mayor actividad de la PAL y esto se asocia a una mayor capacidad antioxidante (Sirin y Aislim, 2018). La PAL está involucrada en la síntesis de varios metabolitos secundarios derivados de la fenilalanina que involucran las rutas de los fenilpropanoides y flavonoides que dan origen a las flavonas, isoflavonas, flavanoles, catequina, epicatequina y antocianinas (Singh *et al.*, 2009). La sobreexpresión de la licopeno β -ciclase (β -LCY), involucrada en la síntesis de α y β carotenos, incrementa la tolerancia al NaCl en *Arabidopsis thaliana* transgénica, reduciendo el contenido de ERO y aumentando el contenido de carotenoides (Chen *et al.*, 2011).

De acuerdo a lo reportado el contenido de compuestos fitoquímicos puede ser aumentado en respuesta a la defensa antioxidante, bajo condiciones de estrés salino.

Los estudios consultados hasta el momento, no han estudiado los cambios en el contenido de compuestos fenólicos derivado del estrés salino en uchuva; así como, los mecanismos de acción relacionados al transporte de glucosa e inhibición de enzimas digestivas *in vivo* de las decocciones de hoja y fruto de uchuva, una de las formas de consumo en la medicina tradicional.

La disminución de la digestión de carbohidratos y lípidos de la dieta, así como un aumento en la captación de glucosa son blancos de acción importantes para el tratamiento de la diabetes; ya que, han mostrado una correlación positiva con la disminución de ácidos grasos libres y glucosa post-prandial (Hadem *et al.*, 2013). El estudio del efecto de los compuestos fitoquímicos sobre estos blancos de acción emplea la prueba de tolerancia oral al almidón, que además de demostrar la inhibición de α -amilasa *in vivo*, demuestra la capacidad de los compuestos fenólicos para actuar sobre otros mecanismos, como: la absorción de glucosa, secreción de insulina, daño a las células β -pancreáticas, transcripción de genes relacionados al metabolismo de carbohidratos y captación de glucosa (Dias *et al.*, 2017). Por otro lado, los adipocitos 3T3-L1 son un modelo adecuado para estudiar la señalización de insulina, ya que con su diferenciación se induce el fenotipo de adipocito, que presenta las principales señalizaciones de la insulina: transporte de glucosa, lipogénesis e inhibición de lipólisis (Petersen y Shulman, 2018).

3 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la encuesta nacional de salud el 10.3% de los adultos en México presentaban diabetes en 2018. Una alternativa para controlar los niveles de glucosa en sangre, mejorar la respuesta a la insulina y complicaciones de la diabetes, es el consumo de alimentos ricos en compuestos fitoquímicos con actividad hipoglucemiante.

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es una planta de interés para su cultivo, debido al crecimiento del mercado emergente de alimentos exóticos y con propiedades benéficas a la salud; además de que se adapta a varios tipos de suelo, temperatura y altitudes. La uchuva es utilizada en la medicina tradicional en forma de decocción para el tratamiento de la diabetes debido a su composición nutrimental y fitoquímica. Las hojas y el fruto de *P. peruviana* presentan efectos antidiabéticos al disminuir los niveles de glucosa en sangre, que puede asociarse a una mejora en el transporte de glucosa en tejidos dependientes de la insulina e inhibición de enzimas digestivas *in vivo*. Lo anterior requiere demostrarse para generar información básica, enfocar futuros estudios *in vivo* y comprobar sus propiedades antidiabéticas.

Por otro lado, se sabe que el estrés salino con NaCl aplicado durante el cultivo puede aumentar el contenido de compuestos fitoquímicos. Por lo tanto, si la planta de *P. peruviana* es sometida a estrés salino se podría modificar su perfil y contenido fitoquímico lo que generaría una planta con mejores contenidos de esos compuestos y una mejor capacidad de estos en la regulación de los niveles de glucosa en sangre de pacientes diabéticos. También, este estudio podría señalar la capacidad de esta planta para adaptarse a suelos agrícolas con problemas de salinidad.

4 HIPÓTESIS

La inducción de estrés salino durante el cultivo de *Physalis peruviana* mejora el perfil de fitoquímicos de las decocciones de fruto y hojas, incrementando su capacidad antioxidante, lo cual potencia sus efectos sobre la inhibición de enzimas digestivas y tolerancia al almidón, relacionado a un aumento en el transporte de glucosa en un modelo *in vitro*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el impacto del estrés salino sobre la composición fitoquímica y capacidad antioxidante de la hoja y fruto de *Physalis peruviana*, así como sus respectivas decocciones, y determinar el efecto de éstas sobre la inhibición de enzimas digestivas relacionadas con diabetes, tolerancia oral al almidón *in vivo* y transporte de glucosa en un modelo *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos extraíbles, no extraíbles, carotenoides totales y capacidad antioxidante de hoja y fruto deshidratados de *P. peruviana* sometida a estrés salino.

5.2.2 Evaluar el impacto del tiempo de cocción sobre el contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante de las decocciones de hoja y fruto de *P. peruviana* sometida a estrés salino.

5.2.3 Determinar el perfil de compuestos fitoquímicos mediante UPLC-MS-QTOF en las decocciones de hoja y fruto de *P. peruviana* tratada con estrés salino, que presenten menor impacto debido al tratamiento térmico.

5.2.4 Comprobar la capacidad de las decocciones de hoja y fruto, que presenten menor impacto debido al tratamiento térmico, para disminuir los niveles de glucosa durante una prueba de tolerancia oral al almidón en ratas sanas.

5.2.5 Evaluar el efecto *in vitro* de las decocciones de hoja y fruto, que presenten menor impacto debido al tratamiento térmico, sobre la capacidad de inhibición de enzimas digestivas, viabilidad celular y transporte de glucosa en una línea celular de adipocitos 3T3-L1.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

6 MATERIALES Y MÉTODOS

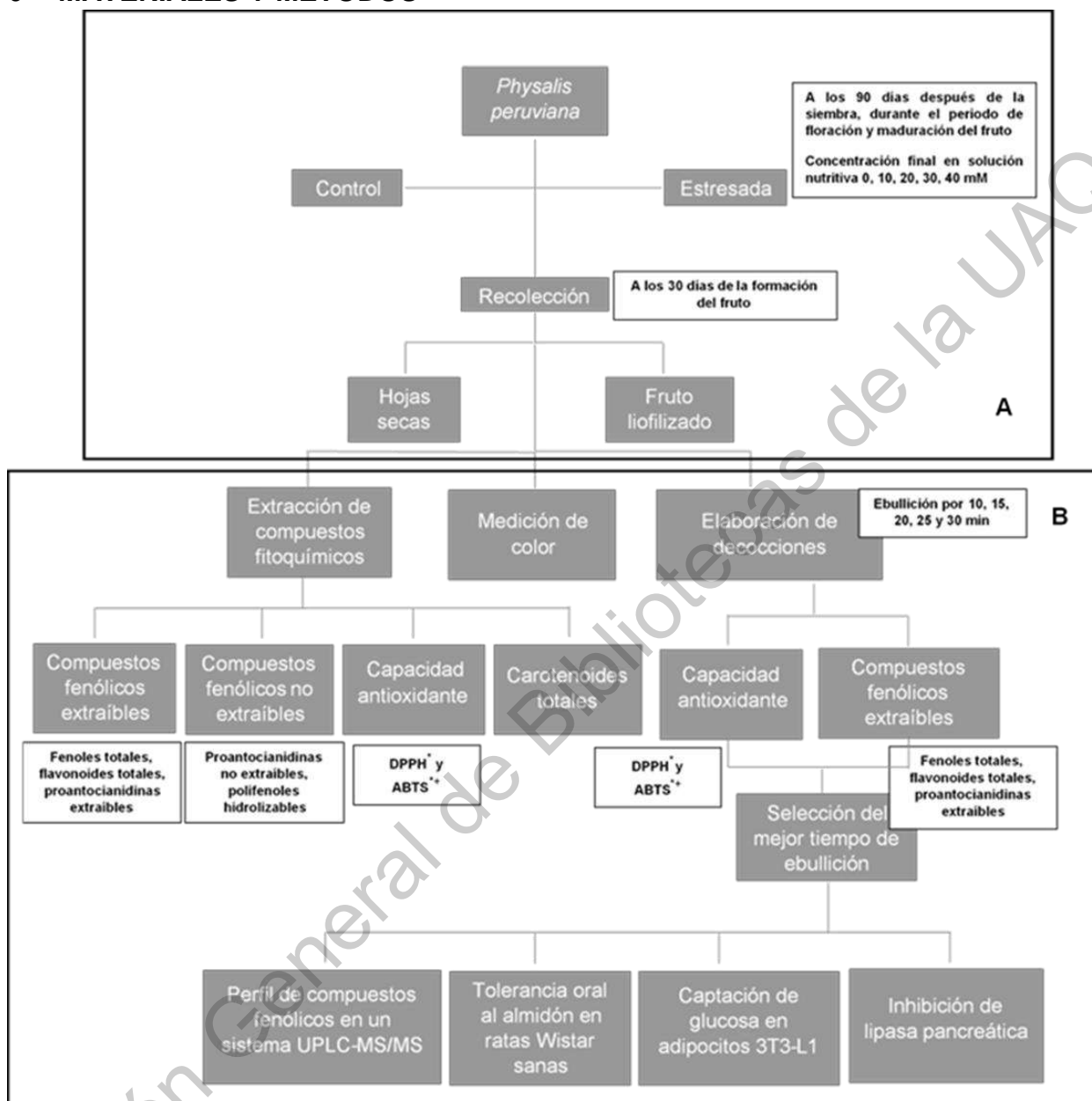


Figura 3. Estrategia general de trabajo. **A.** Metodología realizada por la Universidad Tecnológica de Culiacán, en Culiacán, Sinaloa. **B.** Metodología realizada en la Universidad Autónoma de Querétaro en Querétaro, Querétaro. **DPPH[•]**: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo **ABTS^{•+}**: ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)

6.1 Materiales

6.1.1 Material vegetal

. El estudio se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero, utilizando semillas de uchuva (*Physalis peruviana* L.), adquiridas en la casa Comercial GYA® en Ciudad de México, México. La siembra se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades con Peat moss Sunshine Mix 3® como sustrato. El sustrato se mantuvo húmedo con irrigación diaria hasta los 45 días después de la germinación. Las plantas se trasplantaron en macetas bajo sistema de fertirriego. La irrigación se realizó por goteo con solución Steiner, tres veces al día. Las plantas se sometieron a estrés salino a los 90 días de siembra, mediante la aplicación gradual de NaCl en la solución nutritiva, durante el periodo de floración y maduración del fruto, hasta alcanzar concentraciones finales de 0 (control), 10, 20, 30, 40 y 50 mM. La conductividad eléctrica se mantuvo por debajo de los 6 dS/m. El estudio se llevó a cabo bajo el diseño experimental de bloques al azar con 6 repeticiones, 8 macetas por unidad experimental. A los 30 días de la formación del fruto, las hojas y los frutos se cosecharon, las hojas se secaron a 50 °C y el fruto se liofilizó. El cultivo de la planta y procesamiento del fruto se llevó a cabo por la Universidad Tecnológica de Culiacán, en Culiacán, Sinaloa México.

6.1.2 Material biológico

La línea celular de preadipocitos de ratón 3T3-L1 se donó por el laboratorio de Ruminología y Metabolismo Nutricional (RuMeN) del Instituto de neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla.

Dieciséis ratas hembra Wistar de 250-300 g fueron donadas por el Bioterio del Instituto de neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla. Las ratas fueron sometidas a una semana de aclimatación, dos animales por jaula, en condiciones controladas de humedad y temperatura (50 % de HR y 23 °C) con ciclos de 12 h de luz/oscuridad, acceso libre a dieta estándar (Rodent Diet 5001, Purina ®) y agua.

6.2 Métodos

6.2.1 Medición de color en hoja y fruto deshidratados

La medición de color en hoja y fruto deshidratados se realizó mediante un colorímetro Konica Minolta ® CM5100-W, las condiciones del iluminante y observador fueron D65 y 10°, respectivamente. La medición se realizó colocando la muestra en una caja Petri con superficie y laterales blancos, ubicando el lente sobre la muestra. La correcta medición del color se aseguró calibrando el equipo frente a una placa de calibración de color blanco. Para la adquisición de las coordenadas L*, a*, b* se utilizó el software Espectra Magic NX CM 5100 W ®.

6.2.2 Determinación de la composición fitoquímica

6.2.2.1 Preparación de las decocciones

Las decocciones se prepararon con 7.5 g de fruto u hoja deshidratados y 250 mL de agua (3% p/v), en ebullición durante 10, 15, 20, 25 y 30 min, posteriormente fueron filtradas con un filtro de 0.5 mm de tamaño de poro. Para la liofilización se elaboró una decocción al 3% p/v, con el tiempo de ebullición que presentó menor impacto sobre el contenido fitoquímico. Después, se llevó a -75°C en un ultracongelador durante 12 h y posteriormente a 0.22 bar. Las decocciones liofilizadas (0.025 g) fueron reconstituidas en 2 mL de agua para la determinación de fenoles totales, flavonoides totales, proantocianidinas extraíbles y capacidad antioxidante.

6.2.2.2 Extracción de compuestos fenólicos totales en la hoja y fruto deshidratados

Para la obtención de los extractos se mezcló 0.5 g del material deshidratado con 20 mL de una solución metanol/agua (50:50, v/v), pH 2 con HCl. Se agitó la mezcla a 1500 g, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó el extracto durante 10 min, a 4000 g y 4 °C, para recuperar el sobrenadante (Hassan *et al.*, 2011).

Después, se adicionó 20 mL de una solución acetona/agua (70:30, v/v) al residuo, se agitó a 1500 g, durante una 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 4000 g, durante 10 min y 4 °C, para recuperar el sobrenadante. El segundo sobrenadante (acetona/agua 70:30 v/v) se utilizó para la determinación de proantocianidinas extraíbles. Los sobrenadantes (metanol/agua 50:50 p/v y acetona/agua 70:30 v/v) se mezclaron para determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante (Hassan *et al.*, 2011).

El residuo obtenido al final de estas dos extracciones se secó a 45 °C por 24 h y se utilizó para la determinación de polifenoles hidrolizables y proantocianidinas no extraíbles (Hassan *et al.*, 2011).

6.2.2.3 Concentración de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y colaboradores (1999). En una microplaca se colocó 6-10 µL de muestra y el volumen se llevó a 50 µL con H₂O, posteriormente se adicionó 25 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. La mezcla se reposó durante 5 min y se adicionó 125 µL de Na₂CO₃ al 20% p/v. Finalmente, se agitó la reacción durante 30 min, protegida de la luz y la absorbancia se midió a 765 nm. Los resultados se interpolaron a partir de una curva estándar de ácido gálico (0.002-0.011 mg equivalentes de ácido gálico/mL de reacción) y se expresan como mg equivalentes de ácido gálico/g muestra seca o 100 mL de decocción (Singleton *et al.*, 1999).

6.2.2.4 Concentración de flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método colorimétrico descrito por Oomah y colaboradores (2005). Del extracto obtenido se tomó 25-100 µL de muestra y se llevó a 230 µL con agua destilada. Posteriormente, se adicionó 20 µL de una solución al 1% p/v de 2-aminoetil difenilborato y la reacción se midió a 404 nm. Los resultados se interpolaron a partir de una curva estándar de rutina de 10-56 µg equivalentes de rutina/mL de reacción, y se expresan como µg equivalentes de rutina/g de muestra seca o 100 mL de decocción.

6.2.2.5 Concentración de proantocianidinas extraíbles

Del extracto se tomó 500-2000 μL de muestra y se llevó a 5 mL con una solución de n-butanol/HCl (95:5, v/v), la cual contenía 0.7 g de FeCl_3/L . El tubo se incubó a 100 °C durante 1 h. Posteriormente, se tomó 200 μL de la muestra hidrolizada y se leyó la absorbancia a 450 nm y 555 nm (Zurita *et al.*, 2012).

Los resultados se calcularon empleando la curva reportada por Zurita y colaboradores (2012), debido a la falta de un estándar comercial, y se reportan como mg equivalentes de proantocianidinas extraíbles/g muestra seca o 100 mL de decocción.

6.2.2.6 Concentración de proantocianidinas no extraíbles en hoja y fruto deshidratados

Para el ensayo de proantocianidinas no extraíbles se utilizó el residuo obtenido después de la extracción de compuestos fenólicos totales (punto 6.2.2.2) en la hoja y fruto deshidratados. El análisis se llevó a cabo mezclando 300 mg del residuo y 4 mL de la solución de hidrólisis de n-butanol/HCl (95:5 v/v), la cual contenía 0.7 g de FeCl_3/L (Zurita *et al.*, 2012).

El tubo se incubó a 100 °C durante 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 3500 g por 10 min y temperatura ambiente, para recuperar el sobrenadante. El residuo se lavó dos veces con volúmenes de 2 mL de la solución de hidrólisis y finalmente se ajustó el volumen a 10 mL con la misma solución (Zurita *et al.*, 2012). La absorbancia se leyó a 450 nm y 555 nm, los resultados se calcularon empleando la curva reportada por Zurita y colaboradores (2012) y se reportan como mg equivalentes de proantocianidinas no extraíbles/g muestra seca.

6.2.2.7 Concentración de polifenoles hidrolizables en hoja y fruto deshidratados

Para la determinación de polifenoles hidrolizables, se siguió la técnica descrita por Hartzfeld y colaboradores (2002), con algunas modificaciones.

A 100 mg del residuo, obtenido después de la extracción de compuestos fenólicos totales (punto 6.2.2.2), se le adicionó 4 mL de una solución metanol/H₂SO₄ (90:10 v/v), se mezcló e incubó durante 20 h a 85 °C. La muestra se centrifugó a 3000 g durante 10 min y temperatura ambiente, el sobrenadante se recuperó y el residuo se lavó dos veces con volúmenes de 2 mL de agua destilada (Hartzfeld *et al.*, 2002).

El volumen final se llevó a 10 mL con agua destilada y a dicho extracto se le determinó el contenido de fenoles totales mediante la técnica descrita en el punto 6.2.2.3. Los resultados se reportan como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca.

6.2.2.8 Determinación de carotenoides totales en fruto deshidratado

La cuantificación de carotenoides totales se siguió de acuerdo a la técnica descrita por Olives y colaboradores (2006), con algunas modificaciones. Se mezcló 250 mg del fruto deshidratado con 10 mL de una solución hexano:acetona:etanol (50:25:25, v/v/v) y agitó a 1500 g durante 30 min.

Posteriormente, se adicionó 3 mL de agua destilada y se centrifugó a 2500 g/5 min a 4 °C para recuperar la fase superior. El proceso de extracción se repitió y ambas fases orgánicas se mezclaron, la absorbancia se leyó a 446 nm. El contenido de carotenoides totales se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg equivalentes de } \beta \text{ caroteno}}{L \text{ de extracto}} = \frac{\text{Abs (446 nm)} * PM}{\epsilon * d}$$

Donde:

PM = peso molecular del β -caroteno = 536.87 g*mol⁻¹

ϵ = coeficiente de extinción molar del β -caroteno = 139200 L*mol⁻¹*cm⁻¹

d = distancia = 1 cm

Los resultados se reportan como mg equivalentes de β -caroteno/100 g de muestra seca.

6.2.3 Evaluación de la capacidad antioxidante

6.2.3.1 Técnica del radical ABTS

Para la formación del radical ABTS^{•+} se mezcló: 88 µL de una solución 140 mM de persulfato de potasio con 5 mL de una solución 7 mM de ABTS^{•+}, la mezcla se agitó y colocó en reposo durante 12 h en obscuridad y temperatura ambiente (Re *et al.*, 1999).

La mezcla se diluyó en etanol grado reactivo hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Posteriormente, 10-20 µL de muestra se llevó a 20 µL con agua destilada y mezcló con 230 µL del radical diluido (Re *et al.*, 1999).

El blanco 1 consistió en 20 µL de etanol y 230 µL de agua, el blanco 2 en 20 µL de agua con 230 µL de etanol. El control 1 se preparó mezclando 20 µL de etanol con 230 µL de radical diluido, el control 2 mezclando 20 µL de agua con 230 µL de radical diluido. Finalmente, la reacción se agitó durante 6 min y la absorbancia se midió a 734 nm (Re *et al.*, 1999).

El porcentaje de inhibición se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(Abs\ c - Abs\ b) - (Abs\ m - Abs\ b)}{Abs\ c - Abs\ b} * 100$$

Donde:

Abs c = absorbancia promedio de los controles 1 y 2

Abs b = absorbancia promedio de los blancos 1 y 2

Abs m = absorbancia de la muestra

Los resultados se interpolaron a partir de una curva estándar de trolox de 25-800 µM equivalentes de trolox/mL de reacción, y se expresan como mM equivalentes de trolox/g de muestra seca o 100 mL de decocción (Re *et al.*, 1999).

6.2.3.2 Técnica DPPH

Para la formación del radical DPPH^{*}, 8 mg del radical se mezcló con 100 mL de metanol y se agitó la mezcla para ajustar la absorbancia de 0.75-0.78 a 517 nm. Posteriormente, 10-20 µL de muestra se ajustó a 20 µL con agua y mezcló con 200 µL del radical. El control consistió en 20 µL de metanol con 200 µL de radical, el blanco en 200 µL de agua con 20 µL de metanol. Después, la reacción se agitó durante 6 min y la absorbancia se midió a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición del radical de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(Abs\ c - Abs\ b) - (Abs\ m - Abs\ b)}{Abs\ c - Abs\ b} * 100$$

Donde:

Abs c = absorbancia promedio del control

Abs b = absorbancia promedio del blanco

Abs m = absorbancia de la muestra

Los resultados se interpolaron a partir de una curva estándar de trolox de 25-800 µM equivalentes de trolox/mL de reacción, y se expresan como mM equivalentes de trolox/g de muestra seca o 100 mL de decocción (Brand-Williams *et al.*, 1995).

6.2.4 Selección de los tiempos de decocción

Las decocciones de las partes de la planta (hojas o frutos), procedentes de los distintos tratamientos de estrés salino y tiempos de cocción, que presentaron el mayor contenido de fenoles, flavonoides totales, proantocianidinas extraíbles y capacidad antioxidante; se eligieron para evaluar su perfil de compuestos fenólicos, capacidad de inhibición de lipasa pancreática, prueba de tolerancia oral al almidón y para el estudio *in vitro* de transporte de glucosa.

6.2.5 Análisis de metabolitos secundarios en decocciones de fruto y hoja deshidratados

6.2.5.1 Preparación de las muestras

Las decocciones se prepararon con 7.5 g de fruto u hoja deshidratados y 250 mL de agua (3% p/v) y se llevaron a ebullición durante 10 min (hoja) y 30 min (fruto), posteriormente se filtraron con un filtro PVDF de tamaño de poro de 45 µm. Esto se utilizó para la identificación de polifenoles extraíbles.

6.2.5.2 Condiciones del análisis cromatográfico

Para la determinación del perfil de compuestos fenólicos se siguió la técnica descrita por Amaya-Cruz y colaboradores (2019) con algunas modificaciones.

El perfil se determinó mediante un sistema UPLC-MS-QTOF (cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador cuádruplo-tiempo de vuelo) inyección automática (Waters Class I), operado a 0.5 mL/min y 35 °C, acoplado a un detector de diodos (PDA eλ detector). Se inyectó 2 µL de las muestras y se utilizó la columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, tamaño de partícula 1.7 µm) a 35 °C. Como fase móvil se utilizó un gradiente de concentración compuesto de agua acidificada con 0.1 % de ácido fórmico (A) y acetonitrilo al 100% (B) como disolvente, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min (Amaya-Cruz *et al.*, 2019).

Las condiciones de gradiente utilizadas fueron: 0% de B a los 0 min, 15% de B a los 2.5 min, 21% de B a los 10 min, 90% de B a los 12 min, 95% de B a los 13 min, 0% de B a los 15 min y 0% de B a los 17 min. Las absorbancias se leyeron a 214, 280, 320 y 360 nm, para la identificación de los distintos grupos de compuestos fenólicos (Amaya-Cruz *et al.*, 2019).

Los siguientes estándares comerciales, en concentraciones de 1 mg/mL, se utilizaron para la cuantificación: ácido clorogénico (ácidos hidroxicinámicos), ácido hidroxibenzoico (ácidos hidroxibenzoicos), apigenina (flavonas), genisteína (isoflavonas), quercetina rutinósido o rutina (flavonoles) y ácido cítrico (ácidos orgánicos). Los resultados se expresan como mg del compuesto/100 mL de decocción (Amaya-Cruz *et al.*, 2019).

Para el análisis de masas se utilizó un sistema de detección Vion IMS QTof (Waters), acoplado al sistema UPLC mediante interfase ESI (ionización por electrospray) para la adquisición de datos, operado en ionización negativa (compuestos fenólicos) en un rango de masas de 100-1200 Da. Las condiciones de operación fueron: 50-1800 m/z, voltaje del capilar 2kV, voltaje del cono 40 eV, temperatura de la fuente 120 °C, flujo del gas de cono 50 L/h, temperatura y flujo del gas de solvatación (N₂) 450 °C a 800 L/h, energía de colisión 6 V y 15-45 V energía de la rampa de colisión 15-45 eV (Amaya-Cruz *et al.*, 2019).

6.2.5.3 Capacidad de inhibición de lipasa pancreática

La capacidad de inhibición de lipasa pancreática (porcino) se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Macdougall y colaboradores (2009), con algunas modificaciones. La decocción se elaboró en concentraciones del 1-5% p/v, de acuerdo a lo recomendado en la medicina tradicional para la elaboración de este tipo de extractos (Fauron, 1994), en ebullición continua durante 10 min (hoja) y 30 min (fruto). La enzima se preparó disolviendo 10 mg/mL de lipasa pancreática porcina (Sigma®) liofilizada en solución amortiguadora de Tris 100 mM, pH 8.2 con HCl, a una concentración de 10 mg/mL; la mezcla se centrifugó a 1600 g/5 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante.

El control positivo se preparó disolviendo una capsula del fármaco inhibidor de lipasa pancreática Orlistat (120 mg) en 12 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) (99 %) y se centrifugó a 1600 g/5 min a temperatura ambiente, para recuperar el sobrenadante. El sustrato se preparó disolviendo *p*-nitrofenil laurato al 0.08% p/v en acetato de sodio (5 mM, pH 5.0 con HCl) con 1% de triton X-100, la mezcla se sometió a ebullición hasta su completa clarificación (Macdougall *et al.*, 2009).

En una placa de 96 pocillos se adicionó 80 µL de Tris 100 nM (pH 8.2 con HCl), 30 µL de lipasa pancreática porcina (10 mg/mL), 90 µL de *p*-nitrofenil laurato 0.08% p/v, disuelto en acetato de sodio (5 mM, pH 5.0 con HCl) con 1% de triton X-100 y finalmente 10 µL el agua de las decocciones, a las concentraciones porcentuales en peso/volumen señaladas anteriormente. El control negativo (100% de actividad enzimática) se preparó sustituyendo el agua de la decocción por 10 µL de agua Milli-Q®, para el control de enzima se sustituyó la lipasa pancreática y decocción por 40 µL de agua Milli-Q®, para el control sin sustrato se sustituyó el *p*-nitrofenil laurato y agua de la decocción por 100 µL de agua Milli-Q®, para el control positivo se sustituyó el agua de la decocción por 10 µL de Orlistat a 10 mg/mL (Macdougall *et al.*, 2009).

Los blancos de la muestra se prepararon sustituyendo la enzima por 30 µL de agua Milli-Q® (Macdougall *et al.*, 2009). La reacción se incubó a 37 °C durante 2 h, y la absorbancia se leyó en cada pocillo a 400 nm (Macdougall *et al.*, 2009).

Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición de lipasa pancreática, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(Abs\ c - prom(Abs\ ce, Abs\ cs))(Abs\ m - Abs\ bm)}{(Abs\ c - prom(Abs\ ce, Abs\ cs))} * 100$$

Donde:

Abs c = Absorbancia del control con 100% de actividad enzimática

Abs ce = Absorbancia del control enzima

Abs cs = Absorbancia del control sin sustrato

Abs m = Absorbancia de la muestra

Abs bm = Absorbancia del blanco de la muestra

6.2.6 Estudio *in vitro*

6.2.6.1 Mantenimiento de la línea celular

La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 se mantuvo en medio de mantenimiento formulado de la siguiente manera: 8.3 g de medio Eagle modificado por Dulbecco D5030 (DMEM) (Sigma®), glucosa a 4.5 g/L (Sigma®), rojo fenol a 0.0158 g/L (Sigma®), L-glutamina a 0.584 g/L (Fluka®), 3.7 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma®), 1% de mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco®), 0.1% de antimicótico fungizone (anfotericina B) (Gibco®) y 10% de suero fetal bovino (Sigma®). El pH del medio se ajustó a 6.8-7.2 con HCl, el volumen se aforó a 1 L y finalmente se filtró con un filtro de tamaño de poro de 0.2 µm (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

Los preadipocitos se sembraron y mantuvieron en cajas Petri para cultivo celular de 100 x 20 mm (Corning®), en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 37 °C, se colocó medio de mantenimiento fresco cada 2 días. Cuando la monocapa celular alcanzó un 90% de confluencia (crecimiento) se disoció de la superficie de crecimiento para realizar un nuevo pasaje a caja Petri y promover su proliferación (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

Primero, se realizaron 2 lavados con 5 mL de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (Gibco®) (pH 7.2, 10.58 mM de KH₂PO₄, 1151.72 mM de NaCl y 29.66 mM de Na₂HPO₄-7H₂O), para retirar los residuos de medio. Después, se adicionaron 0.5 mL de tripsina (TrypLE™ express, Gibco®) y se incubó durante 5 min a 37 °C, en atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se recuperaron las células mediante la adición de 4 volúmenes de medio de mantenimiento y se centrifugaron a 150 g/5 min a temperatura ambiente, para recuperar el precipitado celular.

El precipitado celular se disolvió en 1 mL de medio de mantenimiento y se realizó el recuento celular mediante exclusión con colorante azul tripano en una cámara de Neubauer. Las células se sembraron en medio de mantenimiento en una densidad inicial de 300, 000 células.

6.2.6.2 Diferenciación celular

La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 se sembró en una densidad de 2000 células para la prueba de viabilidad celular (placa de 96 pozos, Costar®) y en una densidad de 40 000 células (placa 6 pozos, Costar®) para la prueba de captación de glucosa.

Los cultivos se llevaron a cabo en medio de mantenimiento con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomina y 0.1% de antimicótico. Las células se incubaron a 37 °C con una atmosfera al 5% de CO₂, hasta confluencia del 90% (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

El medio anterior fue succionado y se adicionó el medio de diferenciación 1, que consistió en medio de mantenimiento adicionado con 2% de suero fetal bovino, 5 µg/mL de insulina (Gibco®), 0.25 µM de dexametasona (Sigma®) y 0.5 mM de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (Gibco®). Las células se incubaron a 37°C con una atmosfera al 5% de CO₂ por 48 h, para inducir su diferenciación (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

Posteriormente, las células se incubaron durante 24 h en el medio de diferenciación 2, a las condiciones antes descritas, que consistió en medio de mantenimiento con 2% de suero fetal bovino y 5 µg/mL de insulina (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

El medio fue remplazado con medio de mantenimiento adicionado con 2% de suero fetal bovino y se incubaron las células durante 4 días, tiempo durante el cual el medio anterior fue reemplazado por medio fresco cada 48 h. Finalmente, la diferenciación se comprobó con la acumulación de gotas lipídicas en las células mediante visualización con microscopía de luz (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

6.2.6.3 Viabilidad celular

El ensayo de viabilidad mediante la determinación del porcentaje de proteína, considera que el contenido de proteína en el precipitado celular (masa celular) es proporcional al número de células viables. La disminución en el contenido de proteína después de aplicar un tratamiento sugiere que la sustancia está ejerciendo un efecto citotóxico, debido a que la síntesis de proteínas es una función metabólica básica común a todas las células (McGaw *et al.*, 2014).

Después de que las células fueron tratadas durante 48 h con el primer medio de diferenciación, éstas se incubaron con 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg de decocción liofilizada/mL del segundo medio de diferenciación durante 24 h, para evitar la interferencia debida al crecimiento de la monocapa celular. El control negativo consistió en el segundo medio de diferenciación y como control positivo el segundo medio de diferenciación adicionado con 100 nM de insulina.

Posteriormente, se realizaron 2 lavados con 200 μ L de PBS, se retiró el medio de lavado y se adicionó 50 μ L de PBS para lisar las células y recuperar el contenido proteico intracelular. La lisis celular se llevó a cabo mediante 3 series de congelación/descongelación a -72 °C/temperatura ambiente (Thermo Scientific Pierce BCA Protein assay kit, 2020).

La determinación del contenido de proteína en el precipitado celular se llevó a cabo mediante el método de BCA (ensayo del ácido bicinconínico) con la adición de 200 μ L del reactivo WR (reactivo de trabajo) (Pierce™, BCA™, Thermo Fisher), a cada pocillo de la placa donde se llevó a cabo el cultivo y lisis celular. Posteriormente, se realizó la incubación a 37 °C y 5% de CO₂, durante 30 min, la reacción se protegió de la luz, se agitó durante 30 s y la absorbancia se leyó a 562 nm (Thermo Scientific Pierce BCA Protein assay kit, 2020).

Los resultados se interpolaron de una curva de albúmina (0.5-1.2 μ g de albúmina/mL de reacción) y se expresan como porcentaje de proteína respecto al control negativo (Thermo Scientific Pierce BCA Protein assay kit, 2020).

6.2.6.4 Prueba de captación de glucosa

La resistencia a la insulina tiene como una de sus consecuencias la disminución de la captación de glucosa en tejidos periféricos, lo que conduce a un estado de hiperglicemia. La evidencia de diversos estudios sugiere que los compuestos fenólicos pueden actuar estimulando el transporte de glucosa hacia las células de tejido adiposo (Hanhieva *et al.*, 2010), como consecuencia los niveles de glucosa extracelular disminuyen.

La prueba se realizó cuando se observó la acumulación de gotas lipídicas mediante microscopía de luz, lo que es un indicativo de la diferenciación celular. Las células se cultivaron durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂, en medio de mantenimiento sin suero fetal bovino para inducir el ayuno. Después, se trataron con 0.25 mg/mL y 0.50 mg/mL (que influyeron en menor medida sobre la viabilidad celular) de las decocciones liofilizadas disueltas en medio de mantenimiento con 0.11 mM de glucosa, durante 1 h a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂ (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

El control negativo se incubó con medio de mantenimiento con 0.11 mM de glucosa y el control positivo con medio de mantenimiento con 0.11 mM de glucosa adicionado con 100 nM de insulina. La concentración de glucosa se midió en el medio de cultivo con un kit de Spinreact® (Pérez-Ramírez *et al.*, 2017).

6.2.7 Tolerancia oral al almidón en ratas sanas

La inhibición de enzimas digestivas es uno de los mecanismos *in vitro* asociados al fruto de uchuva; sin embargo, este mecanismo debe demostrarse en un modelo animal, mediante una prueba de tolerancia oral al almidón, uno de los principales carbohidratos de la dieta. La prueba demuestra la capacidad de inhibición de α -amilasa *in vivo* además, después de actuar sobre enzimas digestivas, los compuestos fenólicos pueden disminuir la absorción de glucosa, aumentar la secreción de insulina y aumentar la captación de glucosa en tejidos periféricos, por lo que la prueba además indica estos mecanismos (Dias *et al.*, 2017).

Las ratas se asignaron de forma aleatoria en 6 grupos (n=4) y sometieron a 12 h de ayuno después de una semana de aclimatación. El grupo control negativo recibió agua (22 mL/kg) vía canulación intragástrica, el grupo control positivo acarbosa (10 mg/kg) y los grupos de tratamiento recibieron las decocciones al 5% p/v de hoja y fruto deshidratados de *P. peruviana* (22 mL/kg). Después de 5 min se les administró una solución de almidón soluble de papa (3 g/kg) y se midió el nivel de glucosa en sangre a los 0, 30, 60, 90 y 120 min a partir de sangre obtenida de la vena de la cola (vena safena), con un glucómetro y tiras reactivas de Accu-chek performa (Roche ®). El área bajo la curva (mg*h/dL) se calculó usando la fórmula trapezoidal, la cual aproxima el área bajo la curva mediante a suma de las áreas de un trapecio por cada intervalo de tiempo (Mohamed *et al.*, 2015).

6.2.8 Determinación de azúcares reductores en las decocciones de hoja y fruto

El reactivo de color (ácido 3,5-Dinitrosalicílico) se preparó solubilizando 0.25 g de DNS (Sigma®) con 5 mL de NaOH 2 M (solución A) (Garriga *et al.*, 2017).

La solución B se preparó mediante la mezcla de 7.5 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado con 25 mL de agua destilada. Las soluciones A y B se mezclaron y sometieron a calentamiento sin ebullición y agitación hasta su completa solubilización (Garriga *et al.*, 2017).

La reacción se llevó a cabo mezclando 1 mL de muestra con 1 mL del reactivo de color (solución A+B), se sometió a 100 °C durante 10 min y la absorbancia se leyó a 540 nm. Los datos de absorbancia de la muestra se interpolaron de una curva estándar de glucosa de 0-1000 mg/mL, y se expresan como mg de glucosa/100 mL de decocción (Garriga *et al.*, 2017).

6.3 Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza 95% y 90% para el caso de las comparaciones en los modelos biológicos. El análisis de comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey para la comparación contra todas las medias, con la prueba de t-student para la comparación de dos medias y Dunnett para comparar el cambio respecto a los controles sin tratamiento. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico R® versión 3.5.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

7 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

7.1 Color del polvo de hojas y frutos

El color es un parámetro de calidad y afecta directamente a la preferencia de los consumidores. Las muestras se deshidrataron para generar un producto para el consumo, por lo que los valores de color pudieron afectarse. Además, la evaluación de color debido al estrés por salinidad es importante ya que en el fruto de *P. peruviana* el color es atribuido a su contenido de carotenoides, como el β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina (Ramadan, 2011); en consecuencia, los cambios en los parámetros de color se podrían asociar a cambios en el contenido de estos compuestos.

La apariencia del color está basada en tres atributos: valor (intensidad lumínica), cromaticidad (saturación) y matiz (variaciones en el tono) (X-rite, 2002). Uno de los métodos para expresar el color es a través de las coordenadas internacionales de color o espacio de color CIE $L^*a^*b^*$. En el sistema la coordenada L^* señala la luminosidad de la muestra, a mayores valores indica la luminosidad y menores valores denota tonos de color negro u oscuros. Los valores de a^* expresan las variaciones de color, desde el verde (valores negativos) al rojo (valores positivos). El valor b^* indica las tonalidades de colores desde el azul (valores negativos) al amarillo (valores positivos) (Konica Minolta, s.f.). Por otra parte, en el espacio de color $L^*C^*h^*$ el valor L^* representa la luminosidad, C^* representa la saturación, y h^* es el ángulo de matiz ($^\circ$ hue). El valor de C^* comienza en 0 al centro, en colores apagados, conforme se aleja del centro los colores son más vivos. El ángulo de matiz comienza en el eje $+a^*$ y es expresado en grados (0° es rojo, 90° es amarillo, 180° es verde y 270° es azul) (Konica Minolta, s.f.)











En hoja a partir del tratamiento de 20 mM (Cuadro 3) se observó un incremento en la luminosidad, así como un incremento en la coordenada a^* , es decir con tonalidades más cercanas al rojo y una disminución en la escala del verde, lo que se podría asociar a una degradación de la clorofila (Guiné y Barroca, 2012). La reducción de la clorofila con la aplicación de estrés salino se observó en hojas de tomate (*L. esculentum*) tratado con 25-200 mM de NaCl.

La clorofila-a y clorofila-b son los principales pigmentos involucrados en la fotosíntesis, así que la disminución de estos compuestos se consideró una disminución en la fotosíntesis, debido al estrés generado en la hoja (Doganlar *et al.*, 2010).

El valor de b^* en fruto disminuyó en el tratamiento de 20 mM y 40 mM ($p < 0.05$), es decir disminuyó el valor del color amarillo. El valor de a^* (color rojo) aumentó dentro de los frutos tratados ($p < 0.05$) (Cuadro 3) conforme se aplicaron mayores niveles de estrés salino; asociado a esto se presentó una tendencia a disminuir la cromaticidad (Valor C) lo que dio como resultado colores más apagados. El aumento en las concentraciones de estrés salino generó un color menos puro con valores más cercanos al rojo, lo que podría estar asociado a una disminución en el contenido de carotenoides.

Se han reportado valores de color más altos en el fruto fresco de *P. peruviana* con valores de L^* (70.31), a^* (14.31), b^* (60.84), C (62.50) y hue° (79.66) (Vega-Gálvez *et al.*, 2009). Nuestros valores de color son menores en todos los parámetros, lo que indica que el proceso de liofilización cambió de manera significativa el color. Valdenegro y colaboradores (2013) evaluaron el efecto del secado por liofilización del fruto de *P. peruviana* sobre los parámetros de color, describiendo valores similares L^* (59.76), a^* (15.89), b^* (46.97) y C (49.59) a los registrados en el presente estudio (Cuadro 3). El tratamiento de liofilización del fruto provocó el oscurecimiento del fruto y tonalidades más cercanas al verde/naranja con un color menos puro o cromaticidad, lo anterior puede asociarse a reacciones de oscurecimiento no enzimáticas, autooxidación de compuestos fenólicos, degradación de pigmentos como el β -caroteno y formación de complejos hierro-fenol (Vega-Gálvez *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Valores de color en los polvos de hojas y frutos de *Physalis peruviana* cultivada bajo diferentes concentraciones de estrés salino.

Coordenada	Tratamiento				
	Control	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM
Hoja					
L*	52.31 ± 0.25 ^c	53.27 ± 0.17 ^{bc}	54.99 ± 0.05 ^a	53.27 ± 0.94 ^{bc}	54.06 ± 0.27 ^{ab}
a*	0.29 ± 0.03 ^d	0.06 ± 0.01 ^e	0.61 ± 0.04 ^c	1.80 ± 0.12 ^a	1.12 ± 0.02 ^b
b*	20.05 ± 0.14 ^{ab}	20.49 ± 0.26 ^a	18.10 ± 0.13 ^c	19.61 ± 0.18 ^b	20.24 ± 0.14 ^a
C	20.00 ± 0.14 ^{ab}	20.47 ± 0.37 ^a	18.11 ± 0.13 ^c	19.69 ± 0.18 ^b	20.27 ± 0.14 ^a
hue ^o	89.17 ± 0.09 ^b	89.85 ± 0.02 ^a	88.07 ± 0.11 ^c	84.76 ± 0.35 ^e	86.82 ± 0.06 ^d
Color					
Fruto					
L*	59.09 ± 0.85 ^b	62.17 ± 1.37 ^a	57.50 ± 0.57 ^{bc}	59.28 ± 0.57 ^b	55.85 ± 0.17 ^c
a*	12.08 ± 0.10 ^{bc}	10.59 ± 0.43 ^d	11.74 ± 0.27 ^c	12.93 ± 0.37 ^{ab}	13.04 ± 0.42 ^a
b*	40.10 ± 1.31 ^a	40.38 ± 1.52 ^a	36.92 ± 1.25 ^b	40.05 ± 0.11 ^a	36.30 ± 0.65 ^b
C	41.88 ± 1.29 ^a	41.75 ± 1.58 ^{ab}	38.74 ± 1.27 ^{bc}	42.09 ± 0.20 ^a	38.57 ± 0.72 ^c
hue ^o	73.23 ± 0.39 ^b	75.30 ± 0.08 ^a	72.36 ± 0.19 ^{bc}	72.11 ± 0.45 ^c	70.25 ± 0.41 ^d
Color					

Datos expresados como la media ± desviación estándar, n=3. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. Luz de día iluminante estándar (D65). **L***: luminosidad (0 indica negro, 100 indica blanco), **a***: coordenada rojo/verde (+60 indica rojo, -60 indica verde), **b***: coordenada amarillo/azul (+60 indica amarillo, -60 indica azul), **C**: cromaticidad/saturación (0 indica color apagado, 100 indica color vivo), **hue^o**: matiz/hue (0° - 180° indica variaciones en el tono, en donde 0° = rojo y 90° = amarillo).

7.2 Cambios en el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en hoja y fruto deshidratados por efecto del estrés salino

Los compuestos fenólicos extraíbles son aquellos que pueden disolverse en solventes acuosos-orgánicos, generalmente en condiciones de bajo pH, e incluye aquellos de bajo peso molecular, desde monómeros a decámeros. En el grupo de estos compuestos se incluye a los ácidos fenólicos (ácidos benzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides, proantocianidinas extraíbles de 3-10 unidades de flavan-3-oles y taninos hidrolizables oligómeros de ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Tsao, 2010).

En la hoja de *P. peruviana* los contenidos de fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas mostraron cambios diferenciados respecto de los niveles de estrés salino a los que estuvo expuesta la planta. El contenido de fenoles totales no fue diferente del control en el tratamiento de 10 mM, pero estos se incrementaron a partir de los tratamientos de 20 a 40 mM de estrés salino (Cuadro 4); esto representó un incremento del 56-103% respecto al control ($p < 0.05$). Mientras que, el contenido de flavonoides totales solo mostró un incremento significativo (25%) en el mayor nivel de estrés salino (40 mM), y los otros tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto del control ($p < 0.05$). De manera contrastante al contenido de flavonoides, el contenido de proantocianidinas extraíbles aumentó (21%) ($p < 0.05$) en el nivel más bajo de estrés salino (10 mM), en tanto que, disminuyeron en el nivel más alto de estrés (27%) ($p < 0.05$), mostrando una tendencia a disminuir dentro de los tratamientos con estrés salino (Cuadro 4). Esto indica que la respuesta de la planta al estrés salino afecta de manera diferenciada la biosíntesis de estos compuestos, lo cual puede tener implicaciones importantes para el uso de esta planta como fuente de compuestos bioactivos

Un comportamiento sustancialmente diferente se observó en el fruto; el contenido de flavonoides totales solo mostró un incremento del 20% en el tratamiento de mayor estrés salino (40 mM) ($p < 0.05$), mientras que los otros niveles de estrés no indujeron cambios significativos respecto del control.

A diferencia de lo que se observó en las hojas, los contenidos de proantocianidinas extraíbles mostraron incrementos del 39 y 32 % ($p < 0.05$), en los niveles de estrés de 30 y 40 mM respectivamente, en tanto que, los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto del grupo control. De manera interesante el contenido de fenoles totales no mostró cambios significativos en respuesta al estrés salino aplicado.

Cuadro 4. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos extraíbles de hoja y fruto deshidratados de *Physalis peruviana* sometida a diferentes niveles de estrés salino.

Compuesto	Tratamiento				
	Control	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM
Hoja					
Fenoles totales ¹	12.36 ± 1.18 ^c	11.88 ± 0.57 ^c	19.26 ± 0.54 ^b	19.99 ± 0.75 ^b	25.12 ± 1.61 ^a
Flavonoides totales ²	15.74 ± 0.98 ^b	13.94 ± 0.44 ^b	15.63 ± 0.33 ^b	15.77 ± 0.82 ^b	19.64 ± 1.39 ^a
Proantocianidinas extraíbles ³	7.19 ± 0.71 ^b	8.70 ± 0.40 ^a	7.16 ± 0.27 ^b	5.99 ± 0.46 ^{bc}	5.27 ± 0.35 ^c
Fruto					
Fenoles totales ¹	6.24 ± 0.55 ^a	6.03 ± 0.33 ^a	5.62 ± 0.47 ^a	6.24 ± 0.14 ^a	6.48 ± 0.23 ^a
Flavonoides totales ²	0.44 ± 0.02 ^b	0.37 ± 0.01 ^b	0.44 ± 0.02 ^b	0.39 ± 0.04 ^b	0.53 ± 0.03 ^a
Proantocianidinas extraíbles ³	0.44 ± 0.04 ^b	0.55 ± 0.04 ^{ab}	0.53 ± 0.04 ^{ab}	0.61 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.05 ^a

Datos expresados como la media ± desviación estándar, n=3. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. ¹ Fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g muestra seca), ² flavonoides totales (mg equivalentes de rutina/g de muestra seca), ³ proantocianidinas extraíbles (mg equivalentes de proantocianidinas extraíbles/g de muestra seca).

En hoja, el contenido de fenoles totales es fue similar al reportado por Wu y colaboradores (2009) para el extracto acuoso, de 18.57 mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/g de hoja seca, y menor al de flavonoides, de 37.39 mg equivalentes de rutina/g de hoja seca; las diferencias pudieron deberse a que se utilizó una técnica distinta para la determinación de flavonoides. Por otro lado, el contenido de fenoles totales en fruto es similar al reportado por Rop y colaboradores (2012), de 6.14-8.31 mg EAG/g de fruto seco. El contenido de flavonoides totales en fruto se encuentra dentro del rango determinado por López y colaboradores (2013), de 0.71 mg equivalentes de quercetina/g de fruto seco.

El aumento de flavonoides y proantocianidinas extraíbles en fruto (Cuadro 4) se encuentra en el rango de 0.09-0.17 mg/g muestra seca, sin embargo, a pesar de que hubo diferencia estadística podría no ser importante fisiológicamente como tratamiento. Se ha reportado que el consumo de compuestos fenólicos en la población oscila entre los 1000-2000 mg/2000 kcal (Tesserra-Rimbau *et al.*, 2013), por lo tanto, el consumo de una porción de 25 g fruto (Rodríguez y Rodríguez, 2007) estresado aportaría un 0.3-0.4 % de compuestos fenólicos extras, del consumo diario, respecto a una porción de fruto no estresado.

La acumulación de compuestos fenólicos como respuesta al estrés salino ha sido documentada en diversas plantas. La aplicación de cloruro de sodio en el cultivo involucra un estrés oxidativo manifestado por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, lo cual genera cambios en el metabolismo, donde se ven afectados la síntesis de metabolitos secundarios, asociados al metabolismo de los fenilpropanoides (Hichem *et al.*, 2009). El efecto sobre la producción de metabolitos en la planta dependerá del genotipo y su sensibilidad a salinidad, así como, las condiciones en las cuales se llevó a cabo el estrés (duración, tipo de elicitor, edad de la planta) lo cual determina los mecanismos fisiológicos de respuesta involucrados (Waśkiewicz *et al.*, 2013).

Respecto al efecto del estrés salino sobre el cambio de compuestos fenólicos extraíbles en fruto y hoja *P. peruviana* no se encontraron reportes. Alves y colaboradores (2017) inocularon segmentos nodales de *P. peruviana* con dos niveles de estrés salino (0.5 y 1.0% de NaCl) y ácido silícico (0.0, 0.5 y 1,0 g/L). Los resultados mostraron un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y catalasa, incrementando así la capacidad de la planta para eliminar las especies reactivas de oxígeno, después de ser expuestas a los tratamientos con NaCl. Además, se observó un aumento en el contenido de prolina, la cual actúa como osmoprotector de enzimas citosólicas y mantiene la integridad de la membrana. El estudio anterior señala la capacidad de la planta para adaptarse a las condiciones de estrés salino e inducir la síntesis de compuestos como mecanismo de defensa.

En otras plantas de la familia Solanacéa, a la que pertenece *P. peruviana*, se han encontrado respuestas variables dependiendo de los genotipos y las condiciones de estrés salino. En hojas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. M82, sensible al estrés salino, se observó un decremento en el contenido de fenoles totales. Por otro lado, en las hojas de *S. pennelli*, tolerante al estrés salino, se observó un incremento en el contenido de fenoles totales con la aplicación de cloruro de sodio, durante 21 días (Frery *et al.*, 2010). Los resultados aquí encontrados sugieren o confirman que *P. peruviana* tiene tolerancia al estrés salino, debido a su capacidad para incrementar su contenido de compuestos fenólicos extraíbles en las hojas.

El principal efecto del estrés salino se presenta a nivel de hoja, donde se presentó mayor contenido de flavonoides respecto a los frutos y el estrés salino más alto indujo un mayor contenido de estos compuestos en ambos tipos de órganos. La producción y papel de los flavonoides como defensa al estrés salino ha sido reportada. El factor de transcripción MYB111 es un regulador positivo en la síntesis de flavonoides, involucrado en la expresión de enzimas como la CHS (chalcona sintasa), F3H (flavanona 3-hidroxilasa) y FLS1 (Flavonol sintasa) (Li *et al.*, 2019).

La sobreexpresión de MYB111 en *Arabidopsis thaliana*, tratada con NaCl a 150 mM, aumenta la germinación y crecimiento de la raíz y reduce la acumulación de especies reactivas de oxígeno; es decir mejora la resistencia al estrés salino, asociado a un aumento en el contenido de flavonoides, capacidad antioxidante y la expresión de CHS, F3H y FLS1. La suplementación externa de flavonoides como dihidrokaempferol y quercetina, eliminó el efecto adverso sobre el crecimiento y germinación, presentados en la planta no alterada y en la mutante en la cual se silenció la expresión de MYB111 (Li *et al.*, 2019); destacando así la importancia de los flavonoides en la resistencia al estrés salino. El aumento en el contenido de flavonoides en nuestro estudio podría estar asociado a una mejor protección contra los efectos adversos presentados bajo condiciones de estrés salino.

El incremento de compuestos fenólicos en hoja podría deberse a una respuesta inducida por una mejor respuesta al estrés salino en este tipo de órgano. En *L. esculentum* la sobreexpresión del antiportador vacuolar Na^+/H^+ (atNHX1), incrementó el contenido de Na^+ en hojas y prolina (osmoprotector) respecto al fruto; es decir, presentó mayores mecanismos de defensa comparado al fruto. (Zhang y Blumwald, 2001). Así mismo, en *Capsicum annum* la aplicación de 50 y 100 mM de NaCl disminuyó la peroxidación lipídica (niveles de malondialdehído) y aumentó los niveles de superóxido dismutasa y ácido ascórbico en hoja, comparado con el fruto (Azuma *et al.*, 2010).

El contenido de polifenoles extraíbles en hoja (Cuadro 4) sugiere que a dosis mayores de estrés salino se aumenta el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides. Las proantocianidinas extraíbles mostraron una disminución en su contenido por efecto del estrés salino (Cuadro), por lo tanto, el aumento en los flavonoides totales se puede deber a la despolimerización de las proantocianidinas extraíbles almacenadas en la pared celular de la planta (Koskimäki *et al.*, 2009) o a una regulación negativa en la ruta de producción de 2,3-trans-flavan 3-oles (precursores de las proantocianidinas), quedando hasta la producción de precursores de flavonoides como los flavan-3,4-dioles en donde se representa el punto de ramificación para la síntesis de compuestos poliméricos (Abeynayake *et al.*, 2011).

Es decir, que dado que las rutas de biosíntesis de flavonoides y proantocianidinas, están estrechamente ligadas y por ello un aumento en la biosíntesis de flavonoides afecta negativamente a la biosíntesis de las proantocianidinas; bajo este punto de vista, pareciera ser posible que el incremento del estrés salino podría inducir la expresión de los factores de transcripción MYB los cuales, inducen la biosíntesis de flavonoides (Li *et al.*, 2019) provocando una menor síntesis de proantocianidinas.

Los resultados observados señalan que la planta de *P. peruviana* muestra respuestas diferenciadas al estrés salino en la biosíntesis de compuestos fenólicos a nivel de órganos pareciendo ser esa una respuesta dependiente de la función del mismo órgano; la hoja con una función fotosintética y el fruto con una función de almacenamiento de fotosintatos.

7.3 Cambios en el contenido de compuestos fenólicos no extraíbles en hoja y fruto deshidratados por efecto del estrés salino

Los compuestos fenólicos no extraíbles son aquellos que quedan retenidos en el residuo resultante después de la extracción de los compuestos extraíbles y son liberados mediante hidrólisis química o enzimática. Estos compuestos incluyen a aquellos de elevado peso molecular, o pueden ser de bajo peso molecular pero unidos a polisacáridos de la pared celular, proteínas o inaccesibles a los solventes por encontrarse en la matriz alimentaria (Shahidi y Yeo, 2016). Los compuestos fenólicos no extraíbles se consideran la mayor parte de los polifenoles presentes en los alimentos y llegan al colon donde son fermentados por la microbiota, dando lugar a compuestos de menor tamaño que pueden ejercer un efecto local o absorberse y continuar su metabolismo (Pérez-Jiménez *et al.*, 2015).

En el grupo de compuestos no extraíbles se incluyen a los taninos hidrolizables (galotaninos o elagitaninos), polifenoles hidrolizables (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxinámicos unidos a la matriz alimentaria) y proantocianidinas polímeros de flavan-3-oles de alto peso molecular (Pérez-Jiménez *et al.*, 2015).

La proporción de compuestos fenólicos no extraíbles (Cuadro 5) fue mayor respecto a los extraíbles (Cuadro 4), representando el 65% y 66% del total de compuestos fenólicos presentes en hoja y fruto, respectivamente, tratadas con 40 mM. En el Cuadro 5 se observa que en la hoja se presentó un aumento en el contenido de polifenoles hidrolizables, de un 22-34% a partir del tratamiento de 20 mM, respecto al control ($p < 0.05$), y una disminución de las proantocianidinas no extraíbles de hasta 42% para el tratamiento de 40 mM. En el fruto se mantuvo el contenido de polifenoles hidrolizables. Las proantocianidinas no extraíbles en fruto aumentaron en un 19% para el tratamiento de 30 mM respecto al control ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Cambios en los contenidos de compuestos fenólicos no extraíbles en hojas y frutos deshidratados de *Physalis peruviana* sometida a diferentes niveles de estrés salino.

Compuesto	Tratamiento				
	Control	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM
Hoja					
Polifenoles hidrolizables ¹	28.29 ± 0.43 ^c	31.79 ± 1.16 ^{bc}	35.53 ± 3.38 ^{ab}	38.02 ± 1.22 ^a	34.62 ± 3.17 ^{ab}
Proantocianidinas no extraíbles ²	19.67 ± 1.35 ^a	15.72 ± 1.37 ^b	12.96 ± 0.97 ^{bc}	12.16 ± 0.68 ^c	11.36 ± 1.02 ^c
Fruto					
Polifenoles hidrolizables ¹	11.48 ± 0.67 ^a	11.03 ± 0.60 ^a	11.22 ± 0.43 ^a	11.45 ± 0.87 ^a	10.67 ± 0.93 ^a
Proantocianidinas no extraíbles ²	2.12 ± 0.07 ^b	1.91 ± 0.17 ^b	2.07 ± 0.20 ^b	2.53 ± 0.14 ^a	2.00 ± 0.14 ^b

Datos expresados como la media ± desviación estándar, n=3. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. ¹ Polifenoles hidrolizables (mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca), ² proantocianidinas no extraíbles (mg equivalentes de proantocianidinas no extraíbles/g de muestra seca).

Los valores encontrados en este estudio son mayores a los reportados para otros géneros de la familia *Solanaceae*. Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2015) reportaron valores de 3.79 mg/g fruto seco de polifenoles hidrolizables y valores no detectables para proantocianidinas no extraíbles en tomate (*Solanum lycopersicum*).

En general, se observó una menor influencia del estrés salino sobre la producción de compuestos fenólicos no extraíbles, lo cual se puede relacionar al tipo de estrés aplicado. Los compuestos fenólicos extraíbles modulan los sistemas antioxidantes, participan en la quelación de iones metálicos y disminuyen la fluidez de la membrana para evitar la peroxidación, durante el estrés abiótico (Rodrigo y Libuy, 2014). Los compuestos fenólicos no extraíbles estarían más asociados al estrés biótico, debido a su función en la planta dado que son sustancias antinutricias que se unen a polisacáridos y proteínas de la dieta, a que poseen sabor astringente (evitar que sean consumidas por insectos y mamíferos); además el entrecruzamiento de proantocianidinas en la pared celular aumenta su resistencia, evitando el ataque por herbívoros y patógenos (Spiteller, 2008).

Las diferencias entre el fruto y la hoja podrían explicarse mediante la preferencia de la hoja por la síntesis de materiales que den rigidez a la pared celular. Durante el estrés salino se entrecruzan compuestos fenólicos y glicoproteínas para reducir la extensibilidad de la pared celular, debido al aumento en la turgencia celular y pérdida de agua que ocurre bajo el estrés salino (Julkowska y Testerink, 2015).

7.4 Cambios en el contenido de carotenoides totales en fruto deshidratado por efecto del estrés salino

Los carotenoides son los responsables del color naranja en los frutos de *P. peruviana* (Puente *et al.*, 2011). El perfil de carotenoides en *P. peruviana* se analizó mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia), encontrándose al β -caroteno como el carotenoide mayoritario, que representa el 76% de los carotenoides totales (Ramadan, 2011).

En el presente estudio el contenido total de carotenoides aumentó en 27% (Cuadro 6) para el nivel bajo de estrés salino (10 mM), mientras que, a mayores niveles de estrés no se observó un cambio significativo respecto al control ($p < 0.05$).

Por otro lado, en el presente estudio se presentó una correlación estadísticamente significativa respecto al contenido de carotenoides totales con el color rojo/verde a^* (-0.90). Las variaciones están más relacionadas a la disminución de las tonalidades rojizas, así mismo el tratamiento de 10 mM que presentó mayor contenido de carotenoides (Cuadro 6), es la muestra con mayor luminosidad y h° cercano a las tonalidades amarillas (Cuadro 3).

En muestras de frutos de *P. peruviana* procedentes de Colombia en distintos estados de madurez se reportaron valores de 2.5-21.5 mg de carotenoides totales/100 g de fruto seco; correspondiendo los valores más altos a los frutos maduros (Etzbach *et al.*, 2018). No obstante, Corrales-Bernal y colaboradores (2015) reportan valores notablemente más altos para frutos de *P. peruviana* procedentes de Colombia, de 26.6-39.6 mg equivalentes de β -caroteno/100 g de fruto seco. Tomando en cuenta los resultados del estudio de Etzbach y colaboradores (2018) los resultados se encuentran dentro del rango reportado, sin embargo, nuestros resultados son menores a los reportados para el fruto maduro. Las diferencias pueden ser debidas a las condiciones del análisis, ya que Etzbach y colaboradores (2018) realizaron una concentración del extracto para cuantificar mediante HPLC-DAD (cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos), lo cual aumenta la sensibilidad del análisis; sin embargo, el método espectrofotométrico utilizado en el presente estudio es un método rápido que nos permitió observar las diferencias en el contenido de carotenoides inducidas por el estrés salino.

El efecto del estrés salino se ha evaluado en frutos de la familia *Solanaceae*. Pascale y colaboradores (2001) reportan valores de 7.37-12.26 mg carotenoides totales/100 g peso fresco en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum*), tratado con NaCl y diferentes fuentes de nitrógeno en el agua de irrigación.

El contenido aumenta gradualmente (7.37-12.26 mg/100 g fruto fresco) a niveles moderados de estrés salino (0.5-4.4 dS/m) y disminuye (9.60-8.24 mg/100 g de fruto fresco) a conductividades eléctricas mayores (8.5-15.7 dS/m).

El estudio anterior muestra que existe una respuesta diferencial en la síntesis de carotenoides dependiendo del nivel de estrés salino aplicado, ya que altos niveles de estrés salino reducen la síntesis de estos compuestos. Los autores del estudio señalaron que este efecto puede ser debido a una reducción del área foliar y por tanto un aumento a la exposición de luz solar de los frutos a mayores conductividades eléctricas. Además, la inducción en la biosíntesis de licopeno promovida por el estrés salino podría activar la actividad de la enzima licopeno β ciclasa a bajos niveles de estrés salino; la misma podría ser inhibida a altas conductividades en la solución nutritiva (Pascale *et al.*, 2001). En otros estudios se ha reportado que altos niveles de estrés salino reducen la expresión de genes relacionados con la síntesis de carotenoides como los de la fitoeno sintasa, fitoeno desaturasa, y caroteno desaturasa, en hojas de tomate (*L. esculentum*) (Babu *et al.*, 2011).

Cuadro 6. Cambios en el contenido de carotenoides totales en fruto deshidratado de *Physalis peruviana* sometida a diferentes niveles de estrés salino.

Compuesto	Tratamiento				
	Control	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM
Carotenoides totales ¹	14.71 \pm 0.44 ^{bc}	18.64 \pm 0.79 ^a	16.01 \pm 0.31 ^b	15.29 \pm 0.61 ^{bc}	14.04 \pm 0.76 ^c

Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n=3. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. ¹ Carotenoides totales (mg equivalentes de β -caroteno/100 g de fruto seco).

Los resultados resaltan la importancia del nivel de estrés salino a aplicar dependiendo del tipo de compuesto que se busca incrementar, ya que a bajas concentraciones de estrés salino se induce la producción de carotenoides en *P. peruviana*.

7.5 Cambios en la capacidad antioxidante en hojas y frutos deshidratados por efecto del estrés salino

La técnica de capacidad antioxidante mediante el radical DPPH (DPPH•) expresa la capacidad de una muestra para atrapar radicales libres y se basa en la reducción del radical mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno y electrones de compuestos donadores, lo que genera una disminución de la absorbancia del compuesto a 515 nm (de púrpura intenso a amarillo pálido) (Foti, 2015). La técnica de capacidad antioxidante mediante el radical ABTS (ABTS•⁺) también mide la capacidad antioxidante de un compuesto, mediante una reacción de reducción o transferencia de electrones del compuesto oxidante hacia el ABTS •⁺. Los antioxidantes inhiben la formación del catión del radical (color verde), la reacción se mide a 734 nm (Schaich *et al.*, 2015).

Las diferencias entre ambas técnicas radican en el medio en el cual se llevan a cabo. La técnica de DPPH• se desarrolla en medios hidrofóbicos, respecto a la técnica de ABTS•⁺ que se lleva a cabo en medios hidrofílicos. El medio, por lo tanto, afecta la solubilidad de algunos compuestos fenólicos y por ello altera la reacción de reducción de cada una de las técnicas (Schaich *et al.*, 2015).

La capacidad antioxidante de las hojas medida por el método del radical DPPH se incrementó a medida que los niveles de estrés salino también se incrementaron, observándose el máximo incremento (91% mayor al grupo control) en las hojas de plantas sometidas a 40 mM de NaCl (Figura 4) ($p < 0.05$). Esta capacidad medida por el método del ABTS aumentó en 168% en las hojas sometidas a 40 mM de NaCl (Figura 5) ($p < 0.05$). Estos datos muestran que la respuesta de la planta a mayores niveles de estrés está representada por una mayor proporción de compuestos reductores o donadores de electrones.

La tendencia de incremento de la capacidad antioxidante de las hojas fue similar a la tendencia observada en los contenidos de compuestos fenólicos totales. Miranda y colaboradores (2014) también describieron incrementos de la capacidad antioxidante, analizada por la reducción del nitrodisulfonato de potasio, en las hojas, cuando se incrementó los niveles de cloruro de sodio de 0 a 120 mM en el sustrato.

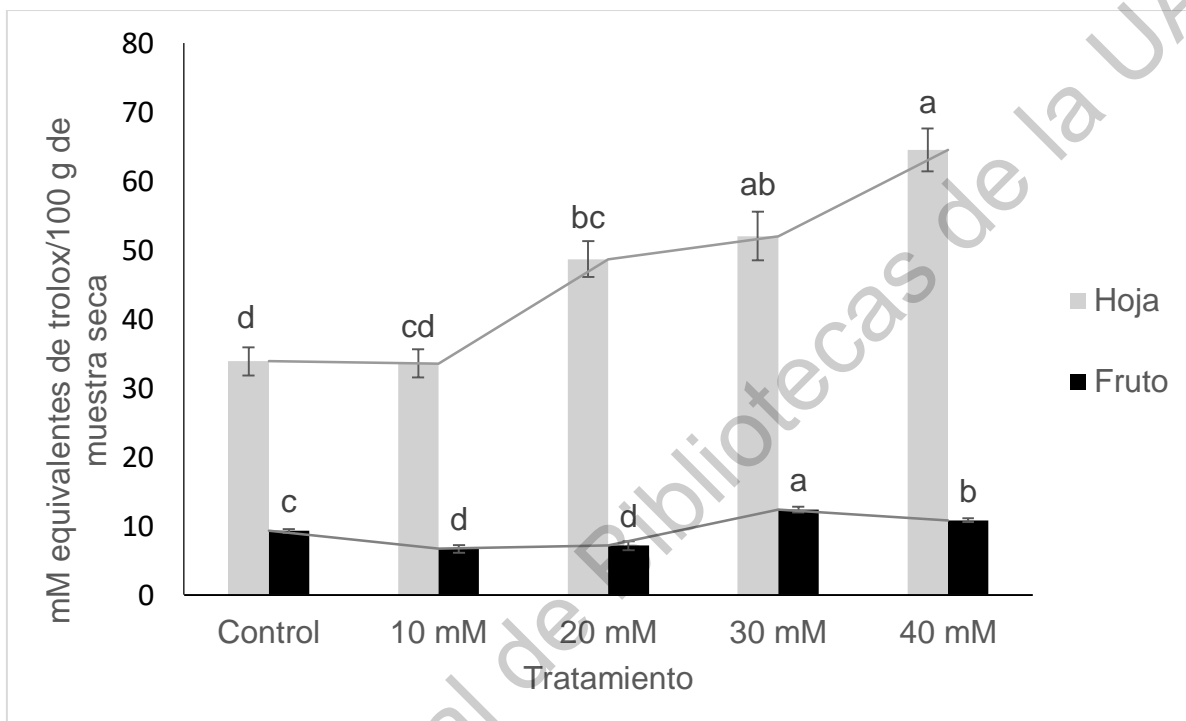


Figura 4. Capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH de hojas y frutos deshidratados de *Physalis peruviana*, sometida a distintos niveles de estrés salino. Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n=3. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **DPPH[•]**: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

Incrementos más discretos de la capacidad antioxidante fueron observados en los frutos; aquellas plantas tratadas con 30 mM de NaCl mostraron incrementos de 33 y 34 % para el análisis por DPPH[•] (Figura 4) o ABTS^{•+} (Figura 5), respectivamente.

López y colaboradores (2013) reportaron valores mayores de capacidad antioxidante para el fruto (29.3 mM/100 g fruto seco), mediante la técnica del radical DPPH, sin embargo, los autores realizaron tres extracciones con acetona/agua (70:30, v/v). Narvaéz-Cuenca y colaboradores (2014) reportaron contenidos de 10-22.5 mM equivalentes de trolox/100 g de fruto seco mediante ABTS^{•+} en el extracto metanólico. En el presente estudio se determinaron valores similares para el método de ABTS^{•+} (11.42-18.89 mM equivalentes de trolox/100 g de fruto seco), por lo que el hecho de usar una extracción metanol/agua (50:50, v/v) y acetona/agua (70:30, v/v) no afectó la capacidad antioxidante mediante éste método.

Sin embargo, en el fruto no se observa un comportamiento similar en cuando al contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante, ya que la muestra con mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles (40 mM) no correspondió con la muestra de mayor capacidad antioxidante. Lo anterior podría explicar que existió un cambio en el perfil a favor de compuestos con mayor capacidad de reducción de los radicales para el tratamiento de 30 mM. Resultados de este tipo han sido reportados en la literatura, Tawaha y colaboradores (2007) evaluaron la relación entre la capacidad antioxidante mediante ABTS^{•+} y el contenido de fenoles totales en el extracto acuoso y metanólico de 51 plantas medicinales. La capacidad antioxidante en algunas plantas no estaba relacionada al contenido de compuestos fenólicos; por ejemplo, la cantidad de fenoles totales en el extracto acuoso de *Hypericum triquetrifolium* fue mayor que en *Arbutus andrachne*, no obstante, su capacidad antioxidante fue menor.

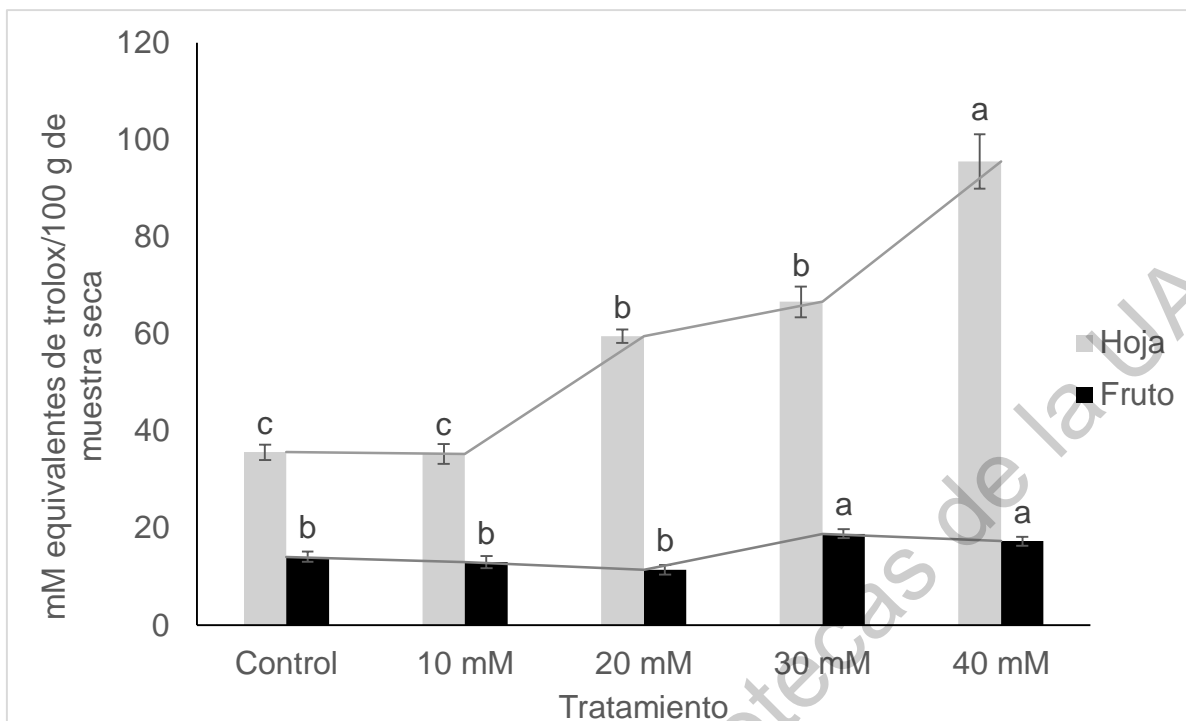


Figura 5. Capacidad antioxidante mediante el método del radical ABTS de hojas y frutos deshidratados de *Physalis peruviana* sometida a distintos niveles de estrés salino. Datos expresados como la media \pm desviación estándar, $n=3$. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **ABTS^{••}**: ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotazolín-6-sulfónico)

De forma general las muestras con mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides presentan mayor capacidad antioxidante; una de las formas de saber cuáles son los compuestos que están contribuyendo en mayor medida a dicha capacidad es el coeficiente de correlación de Pearson. Los compuestos fenólicos no extraíbles fueron excluidos del análisis debido a que se determinaron a partir del residuo obtenido después de la extracción de compuestos fenólicos extraíbles.

El factor que tiene mayor peso sobre la capacidad antioxidante de hoja deshidratada son los fenoles totales ($p < 0.05$) y en segundo lugar los flavonoides totales, únicamente significativa para el caso de ABTS^{•+} ($p < 0.05$) (Cuadro 7); lo que probablemente se debe a que la técnica de ABTS^{•+} se lleva a cabo en medios hidrofílicos (Schaich *et al.*, 2015) y los flavonoides puedan reaccionar de mejor manera con este radical debido a los glucósidos de flavonoides son de carácter hidrofílico (Ferreira y Pinho, 2012).

Por otro lado, se presentó una correlación negativa entre la capacidad antioxidante de hoja y su contenido de proantocianidinas extraíbles ($p < 0.05$) (Cuadro 7), debido a que a mayores niveles de estrés salino los valores de estos compuestos disminuyeron (Cuadro 4). Por lo tanto, la capacidad antioxidante en hoja se podría deber al resto de los compuestos fenólicos incluidos en la fracción soluble: ácidos fenólicos (ácidos benzoicos e hidroxicinámicos) y/o taninos hidrolizables oligómeros de ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Tsao, 2010), y en menor medida a los flavonoides, los cuales presentaron un aumento al mayor nivel de estrés salino (Cuadro 4).

El factor que tiene mayor peso sobre la capacidad antioxidante en fruto deshidratado son los fenoles totales y en menor medida las proantocianidinas extraíbles y flavonoides totales (Cuadro 7), sin embargo, estas correlaciones no resultaron significativas.

La capacidad antioxidante en fruto sufrió cambios discretos 33 y 34 % para el análisis por DPPH[•] (Figura 4) o ABTS^{•+} (Figura 5), respectivamente. Adicionalmente, el contenido de fenoles totales en fruto deshidratado no sufrió cambios por efecto del estrés salino; el contenido de flavonoides totales y proantocianidinas extraíbles aumentaron de manera discreta para el tratamiento de 40 mM en 20 y 32 %, respectivamente (Cuadro 4). Debido a que el estrés salino afectó en menor medida a los parámetros anteriormente mencionados, no existe una relación directa o inversa entre el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, dado que no aumentan o disminuyen una respecto a la otra en proporción constante.

Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante en hojas y frutos deshidratados de *Physalis peruviana* sometida a distintos niveles de estrés salino.

Determinación	Hoja		Fruto	
	DPPH*	ABTS**	DPPH*	ABTS**
Fenoles totales	0.99*	0.99*	0.71	0.79
Flavonoides totales	0.85	0.89*	0.34	0.25
Proantocianidinas extraíbles	-0.88*	-0.88*	0.44	0.59

Los valores representan el coeficiente de correlación de Pearson. El peso de una variable sobre otra será mayor conforme el valor sea más cercano a 1, la relación puede ser negativa o positiva. * indica una correlación estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Los resultados señalan que *Physalis peruviana* sometida a estrés salino tiene la capacidad de síntesis de compuestos con capacidad antioxidante, particularmente en hoja, y estos compuestos podrían estar asociados a una mejor respuesta ante las condiciones adversas presentadas durante el estrés, así como mejores propiedades hipoglucemiantes.

7.6 Cambios en los contenidos de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante de las aguas de decocción de hoja y fruto deshidratados de *Physalis peruviana*, sometida a estrés salino

La decocción es un método de extracción mediante ebullición continua del material vegetativo que puede extraer compuestos hidrosolubles de manera eficiente, lo cual depende de diversos factores como; solvente, temperatura y tiempo. Los cambios químicos durante el proceso dependen del tipo de material utilizado, lo que puede aumentar o disminuir los rendimientos en la extracción (Zhang *et al.*, 2014). Las decocciones se elaboraron en una concentración del 3% p/v en agua en ebullición continua, con las hojas y frutos deshidratados, de acuerdo a lo recomendado en la medicina tradicional para este tipo de extractos (Fauron, 1994).

El tiempo y la temperatura utilizados para la extracción por decocción de hoja provocó una disminución en el contenido total de compuestos fenólicos, de un 42 % para el caso de la hoja a 40 mM de NaCl, a los 30 min ($p < 0.05$) (Figura 6). Lo anterior sugiere que los compuestos fenólicos de la hoja son termosensibles, por lo cual se eligió el tiempo de 10 min para la elaboración de las decocciones. Bajo esa condición de decocción, los tratamientos con estrés salino más severo fueron los tratamientos con mayor contenido de compuestos fenólicos en las decocciones.

Debido a que 10 min fue el tiempo más corto analizado, es posible que menores tiempos y temperaturas puedan tener un menor efecto sobre la degradación de compuestos fenólicos. El efecto del tiempo/temperatura en la elaboración de decocciones se evaluó en el subproducto de algarrobo (*Ceratonia siliqua*) bajo superficie de respuesta; en tiempos de 8-20 min y temperaturas de 81.5-98.5 °C. La extracción de compuestos fenólicos, taninos y capacidad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS se favoreció a mayores temperaturas (98.5 °C y 90 °C) y tiempos (17 min). Los autores discuten que esto se debe a una debilitación del tejido vegetal, favoreciendo así la ruptura de los enlaces entre los compuestos fenólicos y componentes de la matriz como proteínas y polisacáridos (Roseiro *et al.*, 2013), además el calor aumenta los coeficientes de solubilidad y difusión de los compuestos (Wissam *et al.*, 2012).

El estudio anterior destaca la importancia del tipo de matriz alimentaria, donde el estado de unión y solubilidad de los compuestos fenólicos es distinta, ya que a diferencia de la hoja, el tiempo y temperatura aumentaron la extracción en algarrobo; por lo que la temperatura podría afectar o no a las decocciones de uchuva. Sin embargo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de cocción a una de las concentraciones y temperatura usadas para la preparación de estos extractos (Fauron, 1994). El efecto de otros factores que influyen en la extracción como solvente, temperatura y concentración (Zhang *et al.*, 2014) serían interesantes de evaluar en un estudio de optimización, donde ya se tengan comprobados los efectos benéficos de las decocciones.

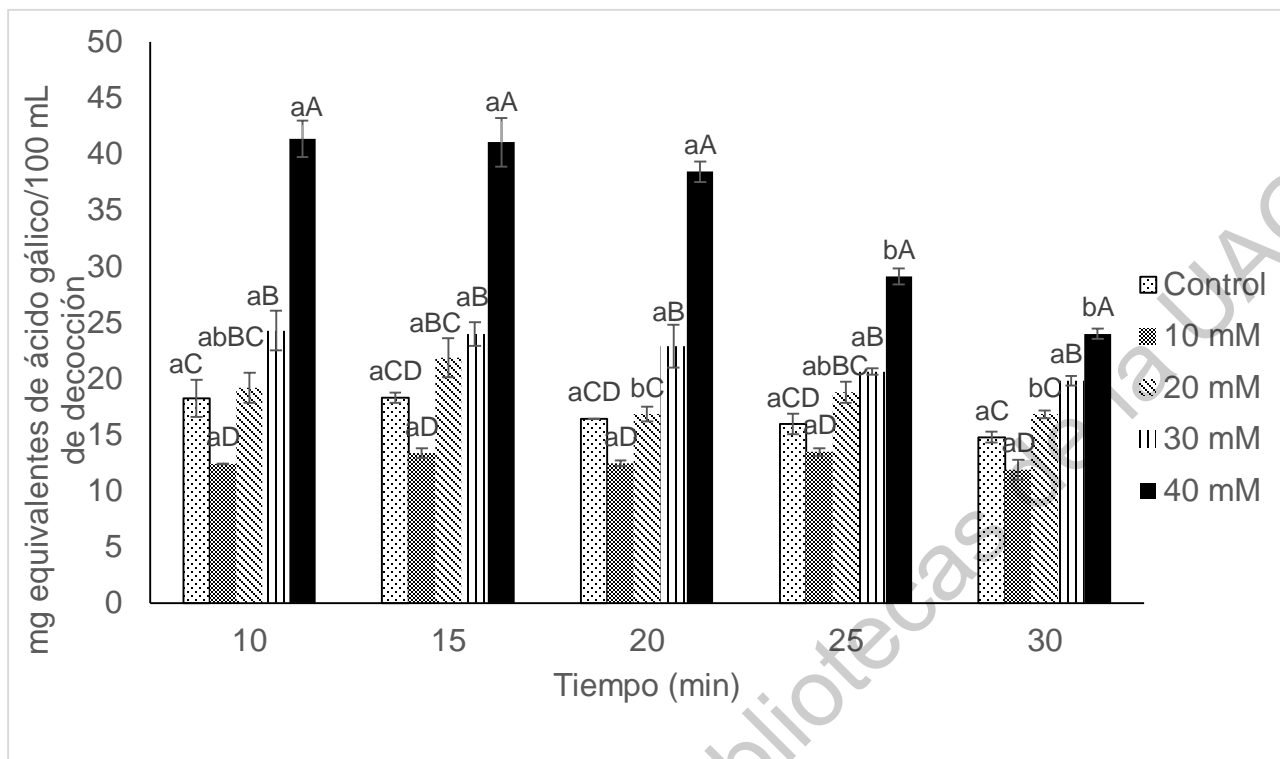


Figura 6. Fenoles totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de hoja de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n = 2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control:** hoja sin estresar.

El contenido de flavonoides totales en el agua de decocción de hoja presentó su máxima extracción a los 15 min de ebullición, tiempo después del cual comenzó a disminuir, hasta en un 27% para el tratamiento de 40 mM ($p < 0.05$) (Figura 7). El porcentaje de disminución de flavonoides fue menor respecto al de fenoles totales, lo que indica que esta fracción extraíble presenta menor termosensibilidad o que se tiene una compensación debido a los flavonoides liberados de los compuestos poliméricos y matriz celular.

Esto último se comprueba en la Figura 8, donde se observa una disminución del 18% en el contenido de proantocianidinas extraíbles a los 30 min de ebullición para hoja control y 20% para hoja 40 mM, por lo cual estas proantocianidinas podrían estar contribuyendo al contenido de flavonoides totales.

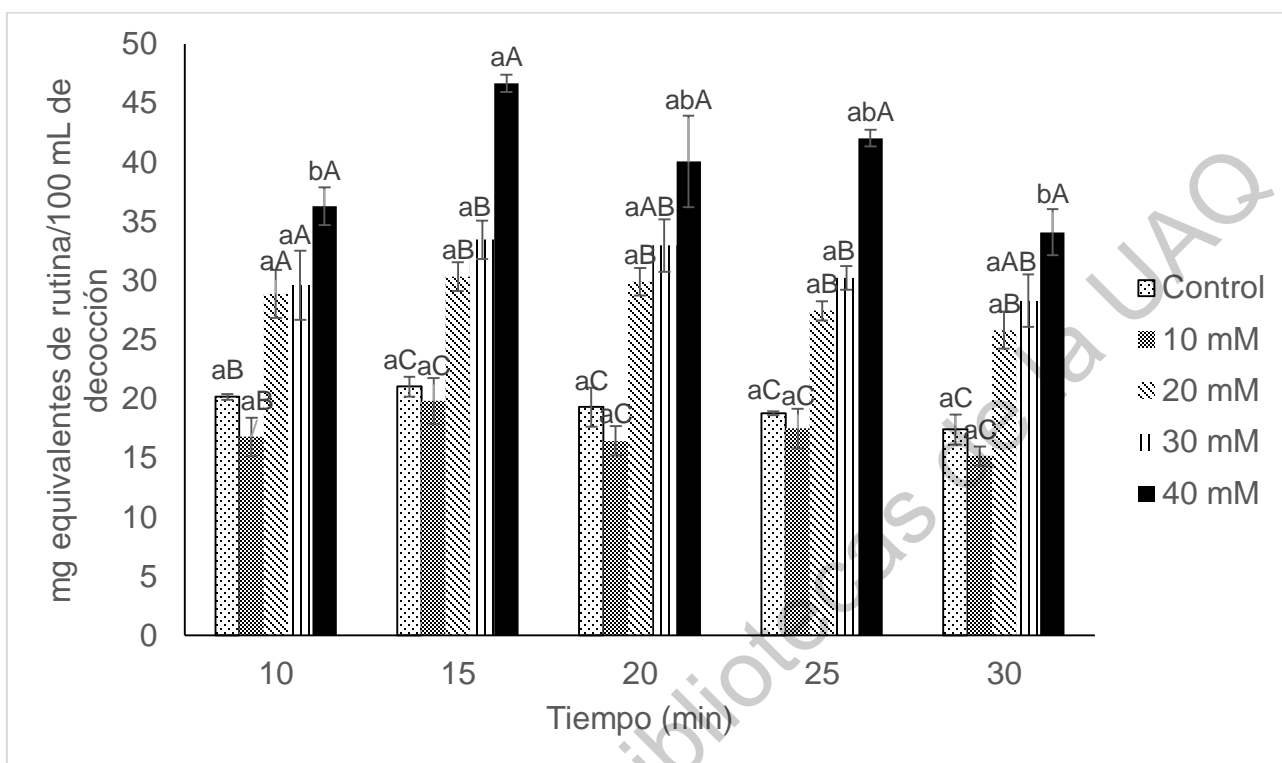


Figura 7. Flavonoides totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de hoja de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de rutina/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n=2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control:** hoja sin estresar.

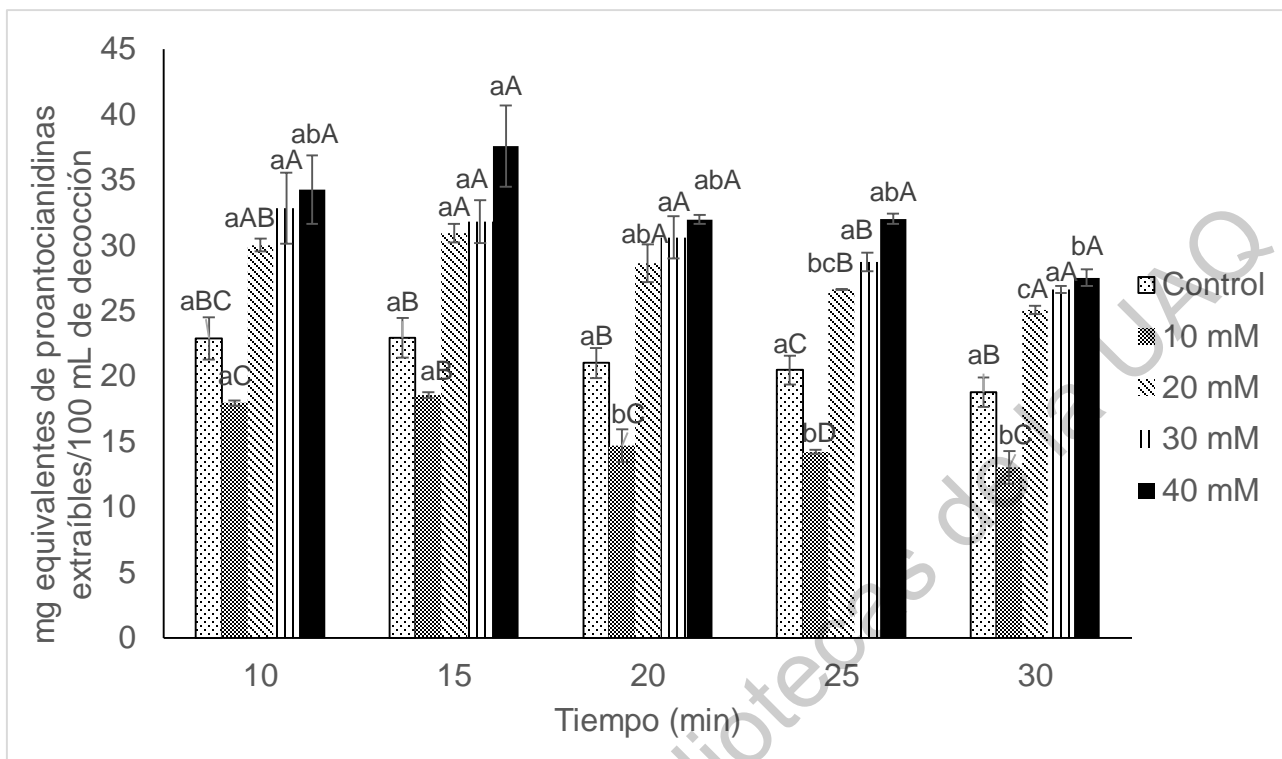


Figura 8. Proantocianidinas extraíbles extraídas en agua a diferentes tiempos de decocción de hoja de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de proantocianidinas extraíbles/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n=2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control:** hoja sin estresar.

El tratamiento térmico disminuyó la capacidad antioxidante mediante la técnica del radical DPPH en un 20% para la hoja control y en un 54% para hoja 40 mM ($p<0.05$) (Figura 9). Por otro lado, mediante la técnica de ABTS se observa una tendencia inversa entre la disminución en la capacidad antioxidante y el tiempo de ebullición, lo cual provocó una disminución del 30% para el tratamiento de 40 mM ($p<0.05$) (Figura 10). La disminución de la capacidad antioxidante fue más notoria para el radical DPPH por lo cual, el tratamiento térmico disminuyó en mayor medida el tipo y contenido de compuestos fenólicos con capacidad de reducción del radical DPPH.

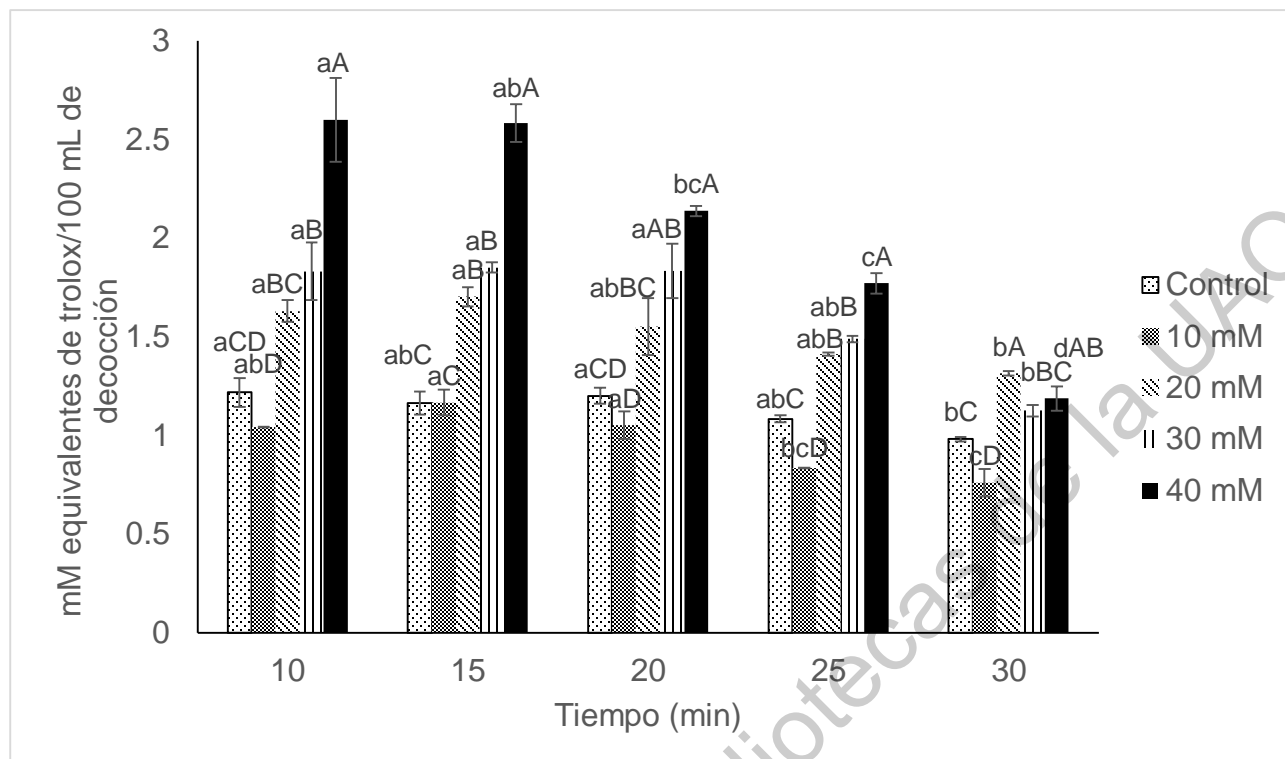


Figura 9. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical DPPH en las aguas de la decocción de hoja de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mM equivalentes de trolox/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n=2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. **Control:** hoja sin estresar.

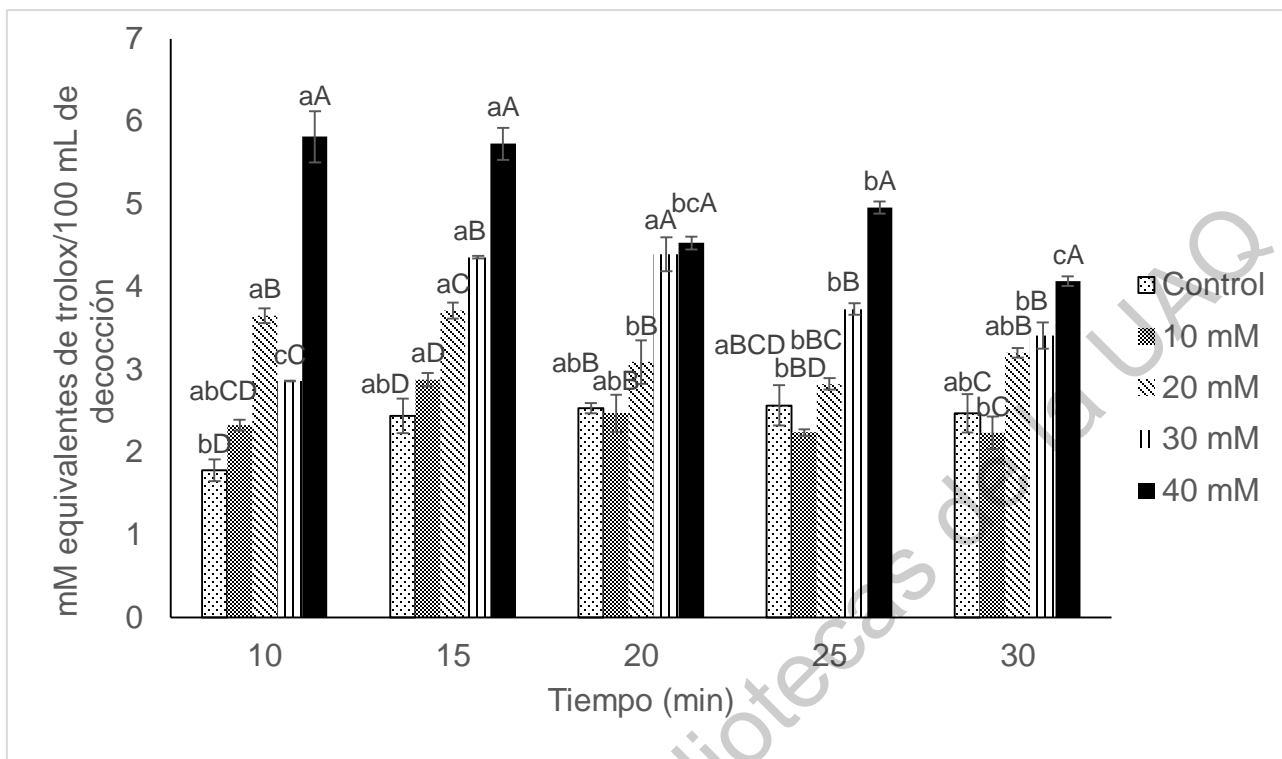


Figura 10. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical ABTS en las aguas de la decocción de hoja de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mM equivalentes de trolox/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n = 2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey **ABTS**: ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotazolín-6-sulfónico). **Control**: hoja sin estresar.

Los cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales siguieron una tendencia similar en las muestras de fruto deshidratado y en las aguas de las decocciones; los tratamientos de 10-20 mM presentaron menor contenido de compuestos fenólicos y los tratamientos de 30-40 mM mayor contenido de compuestos fenólicos respecto al control (Figura 11). Adicionalmente, el contenido de compuestos fenólicos por cada 100 mL de agua de decocción se podría considerar bajo, ya que éste representaría alrededor del 0.63% de la cantidad de compuestos fenólicos consumidos diariamente en la población de 1000-2000 mg/2000 kcal (Tesserra-Rimbau *et al.*, 2013).

El rendimiento de extracción de compuestos fenólicos, además de depender del tipo de solvente utilizado, depende de la temperatura y tiempo de extracción (Kaneria *et al.*, 2012). En el presente estudio se observó que el contenido de compuestos fenólicos totales no fue afectado por el tiempo de ebullición (Figura 11). El comportamiento observado sugiere que los compuestos están cambiando de tal forma que no se afecta la capacidad de reducción del reactivo de Folin.

La fracción de compuestos fenólicos cambia durante el tratamiento térmico, mediante diversos mecanismos. En decocciones herbales, el tiempo de ebullición aumenta la fracción libre de ácidos fenólicos y disminuye la fracción unida a la matriz alimentaria, mediante enlaces glucosídicos y estér. (Xu *et al.*, 2007). La aplicación de calor provoca: la despolimerización de la proantocianidinas (De Taeye *et al.*, 2017), la hidrólisis de los glucósidos de flavonoides (Zhang *et al.*, 2014) y la formación de productos de degradación de flavonoides. Los productos formados pueden tener mayor o menor capacidad antioxidante dependiendo de su estructura (Chaaban *et al.*, 2017); por lo tanto, el comportamiento observado se podría explicar por modificaciones en el perfil de compuestos, ya que estos pueden estar cambiando de tal forma que no se afecte la capacidad de reducción del reactivo de Folin.

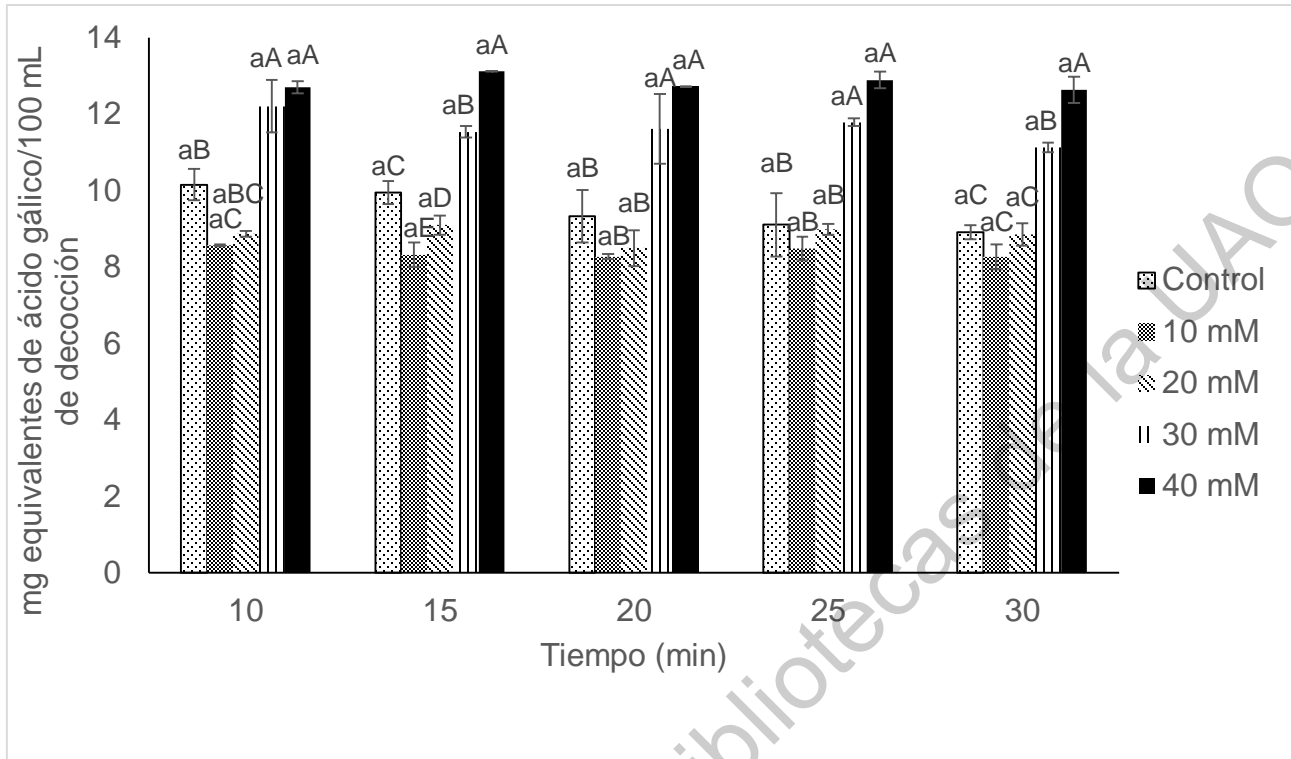


Figura 11. Fenoles totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de fruto de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n=2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey **Control:** fruto sin estresar.

Respecto al contenido de flavonoides totales, en la Figura 12 se observa que a los 30 min de ebullición se alcanza el máximo de extracción en todos los tratamientos. El aumento fue del 42% en el tratamiento control y del 39% en el tratamiento de 40 mM ($p<0.05$). El aumento de flavonoides, en el tiempo de 30 min, podría estar relacionado a la extracción de flavonoides con menor termosensibilidad y despolicimerización de las proantocianidinas (De Taeye *et al.*, 2017).

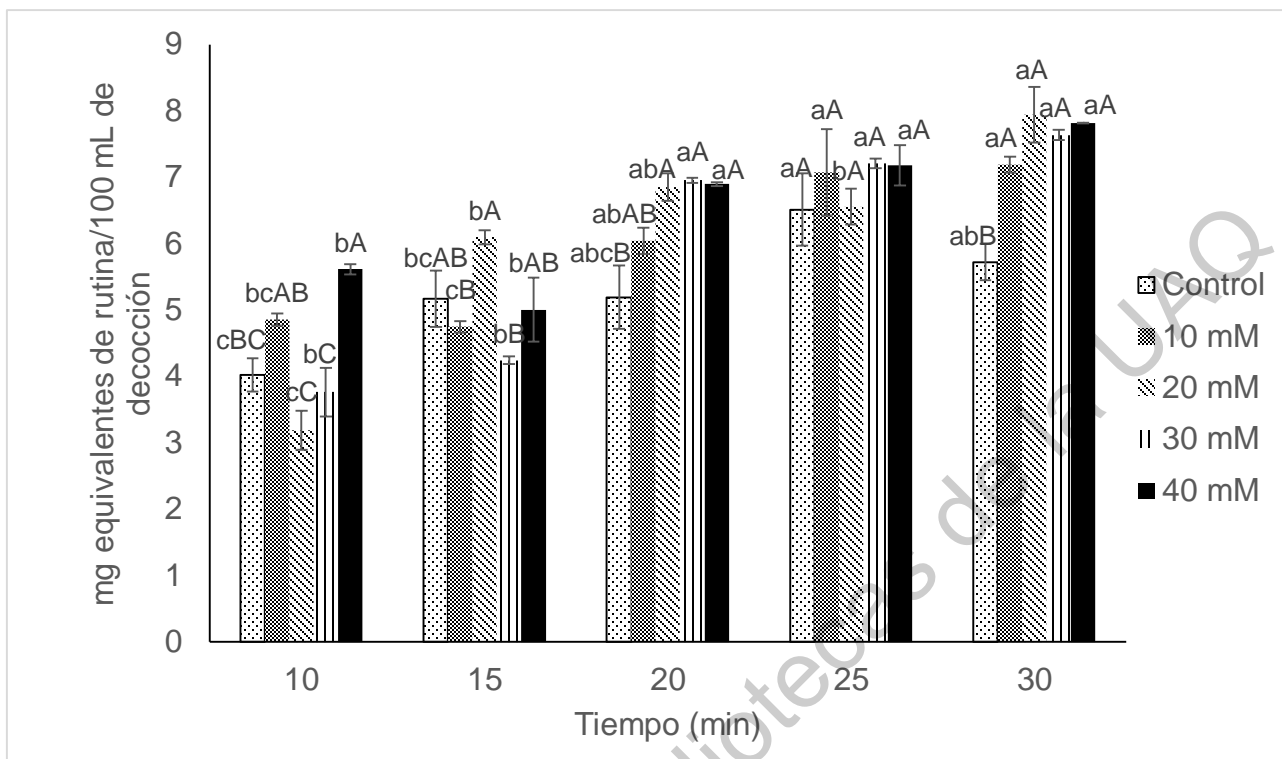


Figura 12. Flavonoides totales extraídos en agua a diferentes tiempos de decocción de fruto de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de rutina/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n=2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control:** fruto sin estresar.

Finalmente, se observó un aumento del 134% en el contenido de proantocianidinas extraíbles para el tratamiento de 40 mM, a los 30 min de ebullición (Figura 13), por lo cual se eligió dicho tiempo para la elaboración de las decocciones.

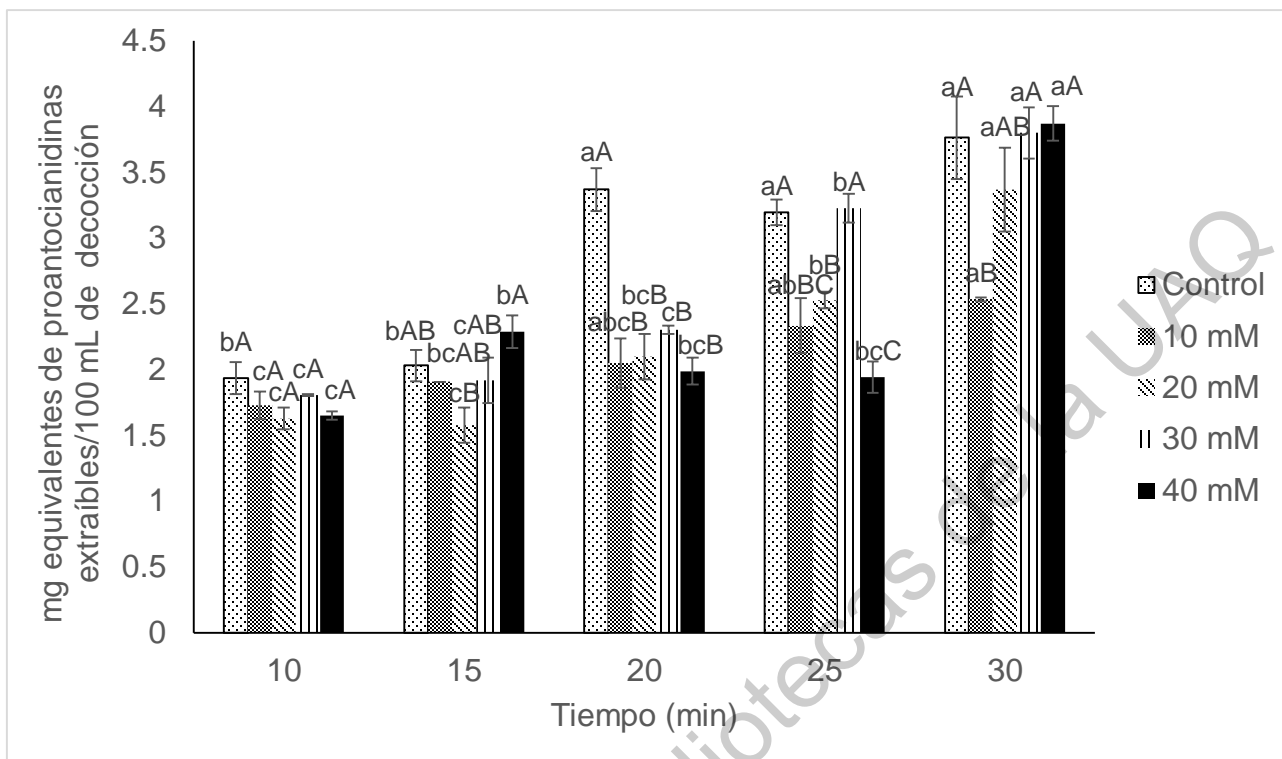


Figura 13. Proantocianidinas extraíbles extraídas en agua a diferentes tiempos de decocción de fruto de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de proantocianidinas extraíbles/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n=2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control:** fruto sin estresar.

La capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH (Figura 14) no se afectó por el tiempo de ebullición, mientras que, la capacidad antioxidante mediante ABTS \bullet se igualó para todos los tratamientos a los 30 min (Figura 15). El calor por un lado provoca la degradación de compuestos fenólicos y por otro su extracción del tejido vegetal, mediante la interrupción de los enlaces entre los compuestos fenólicos y componentes de la matriz alimentaria, como proteínas y polisacáridos (Roseiro *et al.*, 2013). Por lo tanto, se podría sugerir que la cantidad y tipo de compuestos con capacidad de reducción del radical cambia de tal forma que no se afecta la capacidad antioxidante.

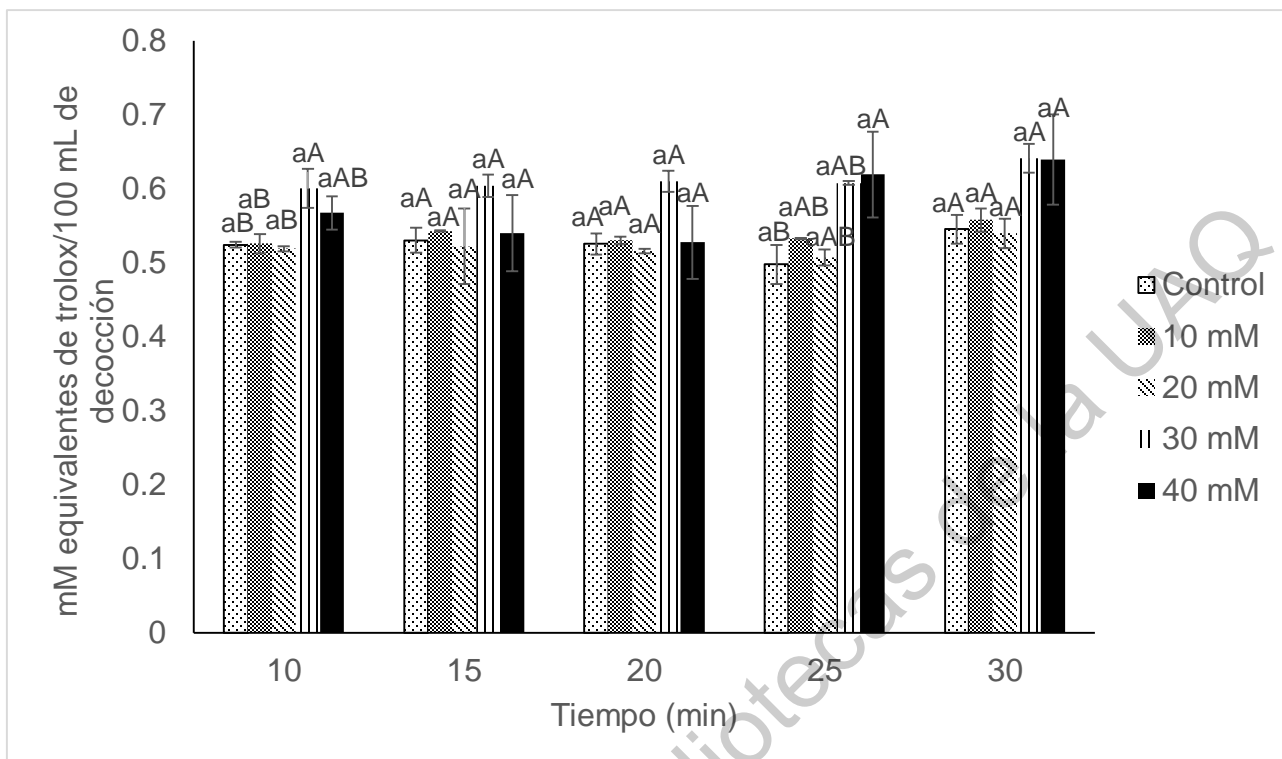


Figura 14. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical DPPH en las aguas de la decocción de fruto de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mM equivalentes de trolox/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n = 2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. **Control:** fruto sin estresar.

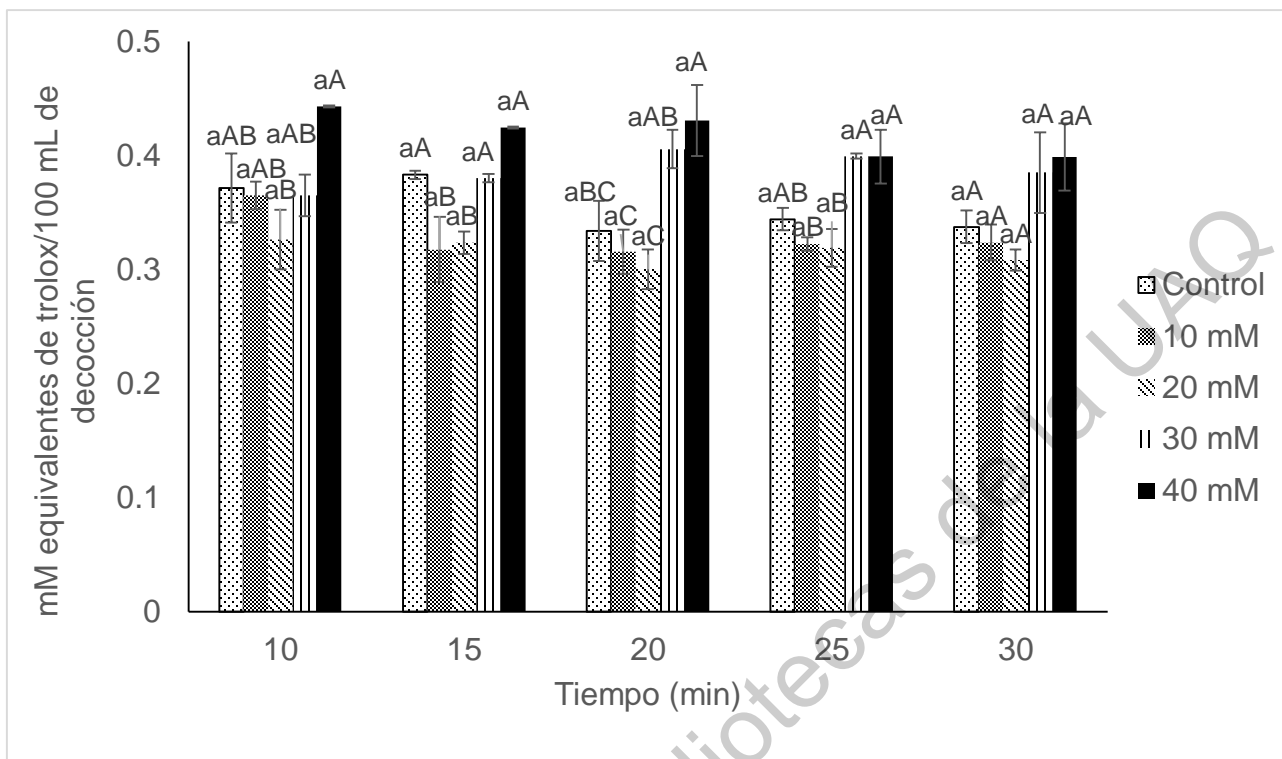


Figura 15. Capacidad antioxidante determinada por el método del radical ABTS en las aguas de la decocción de fruto de *Physalis peruviana*, cultivada a distintos niveles de estrés salino. Los valores representan la media (mM equivalentes de trolox/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n = 2$. Letras minúsculas diferentes entre un mismo tratamiento representan diferencias significativas entre las medias a distintos tiempos de cocción, letras mayúsculas diferentes entre un mismo tiempo de cocción representan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey **ABTS**: ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotazolín-6-sulfónico). **Control**: fruto sin estresar.

La eficacia del uso de agua como solvente de extracción depende del tipo de compuestos que pueden ser extraídos. El agua favorece la extracción de alcaloides, glucósidos de flavonoides, saponinas, terpenoides, ácidos fenólicos (Samarakoon *et al.*, 2010; Ferreira y Pinho, 2012) y proantocianidinas de bajo peso molecular (Wissam *et al.*, 2012). Los efectos benéficos dependerán del tipo de compuestos extraídos en este solvente, los cuales se evaluaron en el perfil de compuestos fenólicos. El efecto de extractos de distinta polaridad podría ser valuado para así identificar los distintos tipos de compuestos que podrían ser responsables de los efectos benéficos, donde además se estudie el conjunto de parámetros que influyen en la extracción, esto sería de interés en futuros estudios, donde se tengan comprobados los efectos benéficos.

En el presente estudio, se observó una diferencia entre las decocciones de hoja y fruto y esto puede deberse al contenido, estado de unión a la matriz alimentaria y distribución de los distintos tipos de compuestos fenólicos. El contenido de compuestos fenólicos en fruto no se modifica con el tiempo de extracción, mientras que en hoja se disminuyen a mayores tiempos de extracción. La información obtenida es importante ya que la decocción es una de las formas de consumo en la medicina tradicional, por lo tanto es de importancia la selección de los tiempos de decocción adecuados.

7.7 Perfil de compuestos fitoquímicos en el agua de decocción de hoja y fruto de *Physalis peruviana* sometida a 40 mM de estrés salino

El perfil de fitoquímicos se llevó a cabo para identificar cambios en los compuestos fenólicos individuales, y así identificar el tipo de compuestos que pueden ser extraídos en las decocciones y están contribuyendo a la capacidad antioxidante de las mismas.

Las decocciones se elaboraron al 3% p/v con el tratamiento control sin estresar y 40 mM de NaCl, que fue el tratamiento con mayor efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante. El agua de la decocción de fruto no sufrió cambios en el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, debido a esto se eligió el tiempo de 30 min, en donde se presentó un mayor contenido de proantocianidinas extraíbles (Figura 13). La decocción de hoja se elaboró en un tiempo de 10 min, en donde se afectó en menor medida el contenido de compuestos fenólicos (Figura 6) y capacidad antioxidante (Figura 9 y 10).

En el agua de decocciones de hoja se identificaron 5 flavonoides, 14 ácidos fenólicos y 1 ácido orgánico en concentraciones que oscilan entre 0.01 y 3.94 mg/100 mL de decocción (Cuadro 8). Los compuestos mayoritarios fueron: rutina, ácido clorogénico, kaemperol rutinósido y ácido feruloilquínico.

La aplicación de estrés salino aumentó el contenido de compuestos fitoquímicos ($p < 0.05$) en el agua de decocción de hoja, a excepción de los ácidos dihidroxibenzoico hexóxido y cafeíco hexóxido

Por otro lado, en el agua de decocción del fruto se identificó: 1 flavonoide, 9 ácidos fenólicos y 1 ácido orgánico, en concentraciones que oscilaron entre 2.99-0.003 g/100 mL de decocción (Cuadro 8). Los compuestos mayoritarios incluyen los ácidos cítrico, hidroxibenzoico hexósido y vanílico, además, de forma general el estrés salino no afectó su contenido.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Cuadro 8. Identificación de compuestos fitoquímicos mediante UPLC-MS-QTOF en el agua de las decocciones al 3% p/v de hoja y del fruto de *Physalis peruviana* sometida 40 mM de NaCl

Familia	Compuesto	Tiempo de retención (min)	m/z observada	Fragmentos	Concentración (mg/100 mL)			
					Control hoja	Hoja 40 mM	Control fruto	Fruto 40 mM
Flavonas	Apigenina dihexósido	4.62	593.1498	431.09482, 269.05738	0.14 ± 0.01 ^b	0.28 ± 0.00 ^a	ND	ND
Isoflavonas	Genisteina dihexósido (genistina hexósido)	5.11	593.1501	431.18471, 269.11924	0.28 ± 0.05 ^b	0.68 ± 0.13 ^a	ND	ND
Flavonoles	Quercetina rutinósido (rutina)*	4.12	609.1443	300.02685	1.12 ± 0.05 ^b	3.94 ± 0.03 ^a	0.010 ± 0.00 ^c	0.005 ± 0.00 ^c
	Kaempferol hexósido-ramnósido	4.61	593.1498	284.03186	0.24 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.01 ^a	ND	ND
	Kaempferol rutinósido	5.10	593.1501	285.03961	0.56 ± 0.09 ^b	1.36 ± 0.26 ^a	ND	ND
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido dihidroxibenzoico hexósido	1.90	315.0714	153.01021, 137.08658	0.64 ± 0.01 ^a	0.50 ± 0.02 ^b	0.02 ± 0.00 ^c	0.03 ± 0.00 ^c
	Ácido vanílico*	1.94	167.0343	137.02994, 109.02096	ND	ND	0.06 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^b
	Ácido hidroxibenzoico hexósido	2.08	299.0772	137.02353	ND	ND	0.17 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^b
	Ácido hidroxibenzoico*	5.47	137.0238	109.04831	0.04 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	ND	ND
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cinámico*	1.75	147.0446	131.02337	ND	ND	0.003 ± 0.00 ^b	0.005 ± 0.00 ^a
	Ácido cafeoilquínico isómero I (ácido clorogénico)*	2.22	353.0861	191.05446, 179.03341, 135.04380	1.04 ± 0.04 ^b	2.45 ± 0.13 ^a	0.005 ± 0.00 ^c	0.006 ± 0.00 ^c
	Ácido coumaroilquínico isómero I	2.60	337.0916	191.05465, 163.03868	0.26 ± 0.01 ^b	0.42 ± 0.02 ^a	ND	ND
	Ácido cafeico hexósido	2.72	341.0866	179.03361, 135.04272	0.06 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	ND	ND
	Ácido cafeoilquínico isómero II	2.77	353.0864	191.01545, 179.03361, 134.03623	0.63 ± 0.02 ^b	1.65 ± 0.02 ^a	0.004 ± 0.00 ^c	0.004 ± 0.00 ^c
	Ácido coumárico hexósido	2.78	325.0917	164.03889, 119.04923	0.05 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	ND	ND
	Ácido feruloilquínico isómero I	2.83	367.1022	193.0495, 134.03621	0.91 ± 0.02 ^b	1.36 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c

Cuadro 8. Continuación

Familia	Compuesto	Tiempo de retención (min)	m/z observada	Fragmentos	Concentración (mg/100mL)			
					Control hoja	Hoja 40 mM	Control fruto	Fruto 40 mM
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido ferúlico hexósido	3.02	355.1024	193.06591, 134.03934	0.04 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c
	Ácido cafeoilquínico isómero III	3.09	353.0865	191.05485, 179.04429, 134.03934	0.01 ± 0.00 ^b	0.09 ± 0.00 ^a	ND	ND
	Ácido coumaroilquínico isómero II	3.15	337.0920	191.05485, 163.03901	0.14 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.07 ^a	ND	ND
	Ácido sinápico hexósido	3.19	385.1128	223.06001, 208.03635	0.03 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	ND	ND
	Ácido feruloilquínico isómero II	3.42	367.1028	193.04993, 191.05502, 134.03650	0.60 ± 0.02 ^a	0.58 ± 0.02 ^a	ND	ND
	Ácido coumaroilquínico isómero III	3.63	337.0922	191.05512, 163.03848	0.01 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	ND	ND
	Ácido sinápico*	4.14	223.0608	208.01367	ND	ND	0.01 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
Ácidos orgánicos	Ácido cítrico*	1.03	191.0191	111.00796	ND	ND	2.96 ± 0.07 ^a	2.99 ± 0.11 ^a
	Ácido quínico	2.66	191.0552	127.0388	0.11 ± 0.00 ^b	0.50 ± 0.02 ^a	ND	ND

Datos expresados como la media ± desviación estándar (mg compuesto/100 mL de decocción), n=3. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey y la prueba de t-student, para el caso de la comparación contra dos tratamientos.* cuantificado con estándares comerciales. ND: no detectado. Aductos [M-H]- **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

El contenido de ácidos fenólicos en fruto de uchuva está reportado, en un rango de 1.78-4.97 mg/kg peso fresco y el de flavanoles entre 0.68-1.67 mg/kg peso fresco (Muñoz-Jáuregui *et al.*, 2007). El contenido en 100 mL de agua de decocción fue menor al contenido reportado por 100 g de fruto fresco, esto se debe al proceso térmico que sufrió la decocción, donde afectan factores como el solvente, la temperatura y el tiempo de extracción (Zhang *et al.*, 2014). Además, la polaridad del solvente pudo afectar la cantidad y tipo de compuestos extraídos en decocción de hoja y fruto, ya que como se esperaba los compuestos extraídos corresponden al grupo de los ácidos benzoicos, cinámicos y glucósidos de flavonoides (Stalikas, 2007). En la cuantificación realizada por Muñoz-Jáuregui y colaboradores (2007) se realizó una extracción con etanol al 60% el cuál es mejor solvente que el agua. La extracción de compuestos fenólicos se realiza normalmente con combinaciones de solventes como: metanol, acetona, etanol, dietiléter y acetato de etilo, en combinación con el agua para facilitar la extracción de compuestos fenólicos más polares (ácidos benzoicos y cinámicos, o glucósidos de flavonoides) (Stalikas, 2007); sin embargo, la mayoría de este tipo de extractos no son adecuados para su consumo, el agua de decocción es así una de las formas de consumo habituales para los extractos de plantas (Fauron, 1994).

La rutina, el compuesto mayoritario en el agua de decocción de hoja, ha demostrado propiedades antidiabéticas. La rutina disminuye los niveles de glucosa en ratas diabéticas (Kamalakkannan y Price, 2006). Los mecanismos de acción propuestos para la rutina implican la modulación del Ca^{2+} en las células β -pancreáticas, lo que promueve la secreción de insulina (Kappel *et al.*, 2013); así como, la captación de glucosa mediante el incremento de la translocación del transportador de glucosa GLUT 4 (Hsu *et al.*, 2014). Por lo que, la rutina presente en el agua de decocción de hoja de uchuva podría tener un efecto similar a los anteriormente mencionados.

El extracto de *Pandanus odurus* concentrado en ácido hidroxibenzoico, compuesto mayoritario en el agua de la decocción de fruto, ha demostrado propiedades antidiabética ya que incrementa los niveles de insulina sérica y el contenido de glucógeno en hígado de ratas sanas (Peungvicha *et al.*, 1998). La dosis usada en ese estudio fue de 5 mg/kg peso, la cual es mayor comparada con el contenido por 100 mL de decocción en este estudio. Debido a que el contenido de compuestos fenólicos en este estudio fue menor la liofilización del fruto permitió concentrar el extracto para su aplicación en el modelo *in vitro*.

7.8 Evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* de las decocciones de hoja y fruto sometidas a 40 mM de estrés salino sobre lipasa pancreática

La enzima lipasa pancreática es un blanco de acción importante para la disminución de ácidos grasos libres en sangre que se aumentan bajo una condición de resistencia a la insulina (De Fronzo, 2004), debido a que es responsable de la hidrólisis del 50-70% de los lípidos provenientes de la dieta (Figuroa-Pérez *et al.*, 2014).

El tratamiento de 40 mM de NaCl, con mayor efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante en el agua de las decocciones de hoja y fruto, se eligió para la evaluación del efecto de inhibición de lipasa pancreática. Las decocciones de hoja y fruto deshidratados se elaboraron en una concentración del 1-5% p/v, para evaluar el efecto de las distintas concentraciones utilizadas para la preparación de este tipo de extractos (Fauron, 1994). La decocción de fruto se elaboró en un tiempo de 30 min, mientras que, la decocción de hoja se elaboró en un tiempo de 10 min, en ambos casos donde se afectó en menor medida el contenido de compuestos fenólicos.

En el presente estudio se observó que las decocciones de fruto y hoja de uchuva, elaboradas a distintas concentraciones de peso/volumen, tienen la capacidad de inhibición de la lipasa pancreática. La aplicación de NaCl a 40 mM en hoja incrementó la capacidad de inhibición de lipasa pancreática del agua de las decocciones, elaboradas a una concentración del 3-5% p/v ($p < 0.05$) (Figura 16).

Por otro lado, el tratamiento a 40 mM de NaCl en fruto disminuyó la capacidad de inhibición de lipasa pancreática del agua de las decocciones elaboradas en concentraciones del 1-3% p/v ($p < 0.05$) (Figura 16).

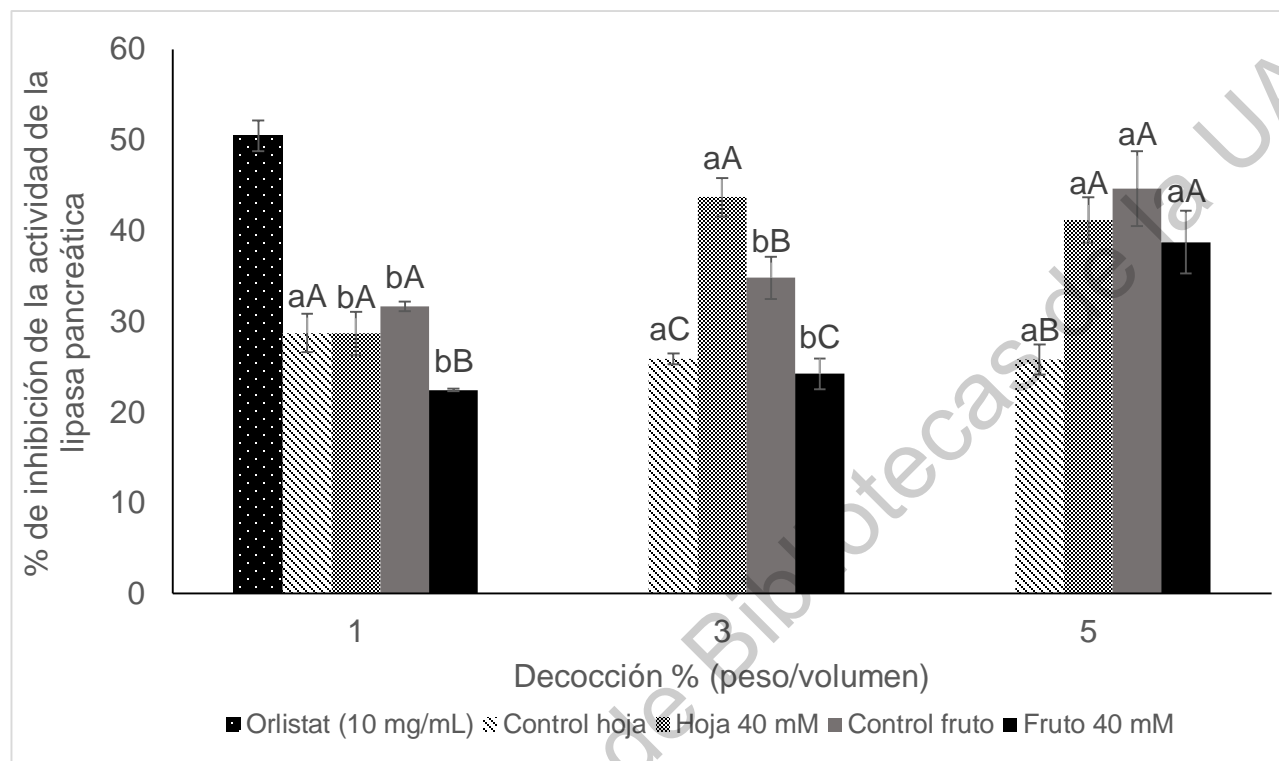


Figura 16. Efecto inhibitorio *in vitro* del agua de las decocciones de hoja y fruto de *Physalis peruviana* sometidas a 40 mM de estrés salino sobre lipasa pancreática. Los valores representan la media (% de inhibición de lipasa pancreática) \pm desviación estándar, $n=3$. Letras minúsculas diferentes arriba de las barras representan diferencias significativas entre las medias de un mismo tratamiento a diferentes porcentajes de elaboración (peso/volumen) ($\alpha=0.05$), letras mayúsculas arriba de las barras representan diferencias significativas entre las medias de un mismo porcentaje de elaboración, mediante la prueba de Tukey. **Orlistat:** control positivo, fármaco inhibidor de la actividad de lipasa pancreática. **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

El mayor porcentaje de inhibición de lipasa pancreática fue del 44.6% (Figura 16) para la decocción elaborada al 5% p/v, del fruto sin estresar, porcentaje similar al fármaco inhibidor de lipasa pancreática Orlistat (50.5 %); además, este porcentaje es comparable con el de bebidas herbales usadas para disminuir la digestión de lípidos como la infusión de té negro (45.5 %), anís verde (46.3 %) y hierbabuena (45.6 %) (Figuroa-Pérez *et al.*, 2014, Herrera *et al.*, 2018).

El fruto de uchuva tiene capacidad de inhibición de enzimas digestivas. Rey y colaboradores (2015) reportaron que el extracto etanólico del fruto de *P. peruviana* inhibió de forma competitiva a la α -amilasa de *Saccharomyces cerevisiae*, y de forma no competitiva a la α -glucosidasa y maltasa de polvo intestinal de rata. Por otra parte, Bernal y colaboradores (2018) mostraron que el extracto de diclorometano del exudado que cubre el fruto contiene ésteres de sacarosa, responsables de la inhibición de la α -amilasa, siendo el peruviosido D el compuesto que mostró mayor actividad de inhibición (84.8%).

Respecto a las decocciones de hoja y fruto de *P. peruviana* no se encontraron reportes sobre inhibición de enzimas digestivas; sin embargo, se sabe que ésta es la forma en la que se suelen consumir en la medicina tradicional para el tratamiento contra la diabetes (Maobe *et al.*, 2013).

La inhibición de lipasa pancreática *in vitro* podría no estar relacionada al contenido total de compuestos fenólicos. El agua de las decocciones de hoja tratadas con 40 mM de NaCl mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos comparado a las decocciones de fruto (Figura 17) , sin embargo, los porcentajes de inhibición de lipasa pancreática de ambas decocciones fueron similares. El efecto de inhibición estaría más relacionado a la presencia de compuestos similares y específicos en ambos tipos de muestras. Dentro de los compuestos fenólicos la rutina ha mostrado ser un buen inhibidor de la actividad de la enzima lipasa pancreática, mientras que, los ácidos fenólicos tienen menor capacidad de inhibición (Martínez-González *et al.*, 2017); la rutina fue un compuesto común en el agua de la decocción de hoja y fruto (Cuadro 8), por lo tanto, podría ser el compuesto responsable de los efectos presentados.

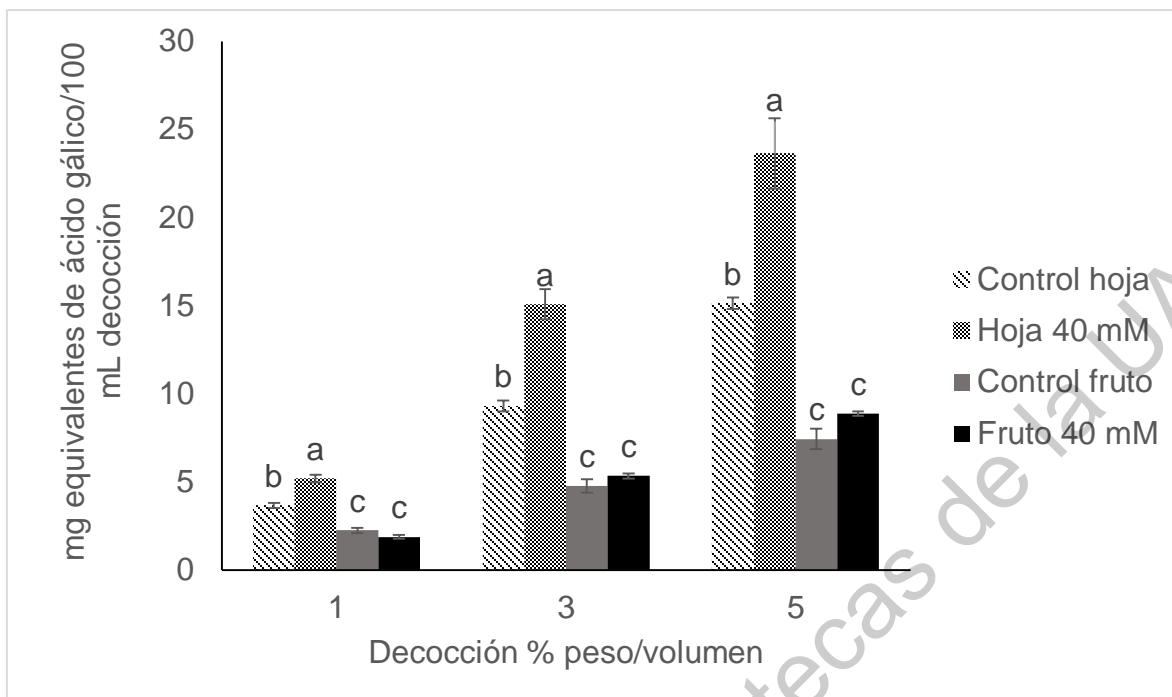


Figura 17. Fenoles totales en el agua de las decocciones de hoja y fruto de *Physalis peruviana* sometida a 40 mM de estrés salino. Los valores representan la media (mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, n = 3. Letras diferentes arriba de las barras representan diferencias significativas entre las medias de distintos tratamientos, a un mismo porcentaje de elaboración (peso/volumen) ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

El contenido de compuestos fenólicos en las decocciones aumenta a un mayor porcentaje de hoja y fruto utilizado para su elaboración (Figura 17), no observándose la misma tendencia en la capacidad de inhibición de lipasa pancreática (Figura 16). Lo anterior se puede deber a que existen distintos tipos de inhibición enzimática: competitiva (inhibidor y sustrato compiten por el sitio activo, reduciendo la afinidad de la enzima por el sustrato), no competitiva (unión del inhibidor a sitio alostérico reduce la velocidad de reacción) y acompetitiva (unión del inhibidor al complejo enzima-sustrato reduce la afinidad de la enzima por el sustrato y la velocidad de reacción); donde un mayor porcentaje de inhibidor respecto al sustrato solo funcionaría si se trata de un tipo de inhibición competitiva (Najafpour, 2007).

De acuerdo a los datos obtenidos, el agua de las decocciones de hoja y fruto de *Physalis peruviana* podría ser utilizada para inhibir la digestión de lípidos de la dieta, debido a que la inhibición de lipasa pancreática ha mostrado una relación positiva con la disminución de LDL (lipoproteínas de baja densidad) y triglicéridos en sangre (Hamdem *et al.*, 2013). Lo anterior es importante dentro del contexto de la diabetes, debido a que la resistencia a la insulina aumenta la lipólisis y con ello el nivel de ácidos grasos libres (De Fronzo, 2004).

Evaluación del efecto hipoglucémico *in vivo* de las decocciones de hoja y fruto de *Physalis peruviana* sometidas a 40 mM de estrés salino

El almidón es uno de los principales carbohidratos de la dieta y su rápida digestión resulta en incrementos de los niveles de glucosa en sangre, por lo que la disminución en su digestión es un blanco importante para el control de la diabetes. El consumo de extractos herbales son una estrategia para el control de los niveles de glucosa, ya que sus compuestos fenólicos han mostrado actividad inhibitoria de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (Asgar, 2012). La prueba de tolerancia oral al almidón resulta adecuada para demostrar la capacidad inhibitoria *in vivo* contra enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos (Dias *et al.*, 2017).

El pico hiperglucémico no se disminuyó de manera significativa después de administrar las decocciones de hoja y fruto al 5% p/v, sin estresar, en ratas hembra Wistar sanas. La decocción preparada a partir de la hoja estresada a 40 mM mostró una tendencia a disminuir los niveles de glucosa, principalmente a los 30 min, en un 8%, comparado con el grupo sin tratamiento (Figura 18).

El área bajo la curva en ratas tratadas con la el agua de la decocción de hoja a 40 mM disminuyó en un 7%, respecto al grupo sin tratamiento ($p < 0.1$) (Figura 19). Los grupos tratados con las decocciones de fruto presentan un pico hiperglicémico y área bajo la curva similar a los grupos sin tratamiento.

El comportamiento podría explicarse mediante el contenido de azúcares reductores en el agua de la decocción de fruto, el cual fue hasta 5 veces mayor respecto a las decocciones de hoja (Figura 20); debido a ello, el contenido de azúcares en la decocción de fruto no permitió observar los efectos de los compuestos fitoquímicos extraídos en la decocción.

Resultaría de importancia evaluar otro tipo de extractos que disminuyan la extracción de azúcares reductores, y así comprobar los efectos hipoglicémicos que han sido asociados al fruto de uchuva (Rodríguez y Rodríguez, 2007). Por lo tanto, a pesar de que el fruto ha mostrado capacidad de inhibición de α -amilasa *in vitro* este mecanismo en el agua de la decocción de fruto no fue suficiente para disminuir los niveles de glucosa *in vivo*.

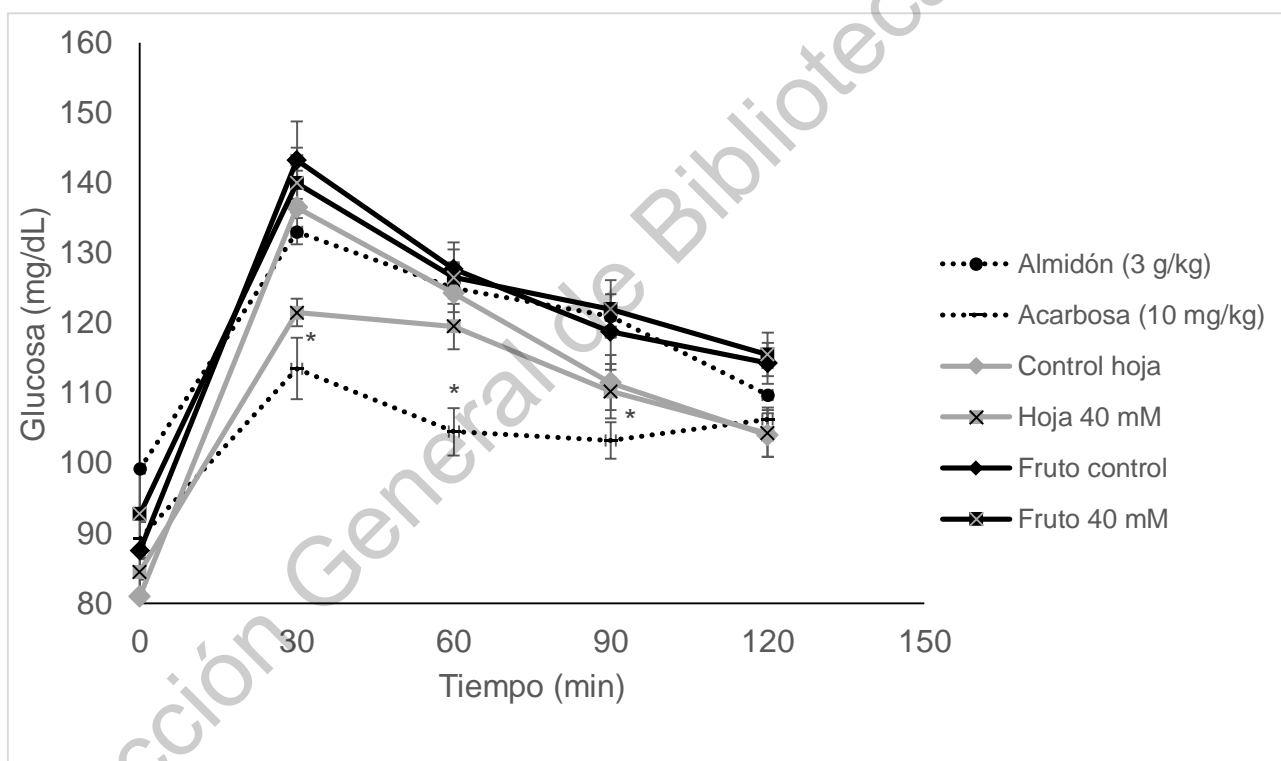


Figura 18. Efecto de la administración del agua de las decocciones de hoja y fruto al 5% p/v de *Physalis peruviana* en la tolerancia oral al almidón en ratas Wistar sanas. Los valores representan la media (mg/dL de glucosa) \pm error estándar, n = 4. * representa diferencias significativas con respecto al control negativo, ($\alpha=0.1$) mediante la prueba de Dunnet. **Almidón:** control negativo, **Acarbosa:** control positivo, **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

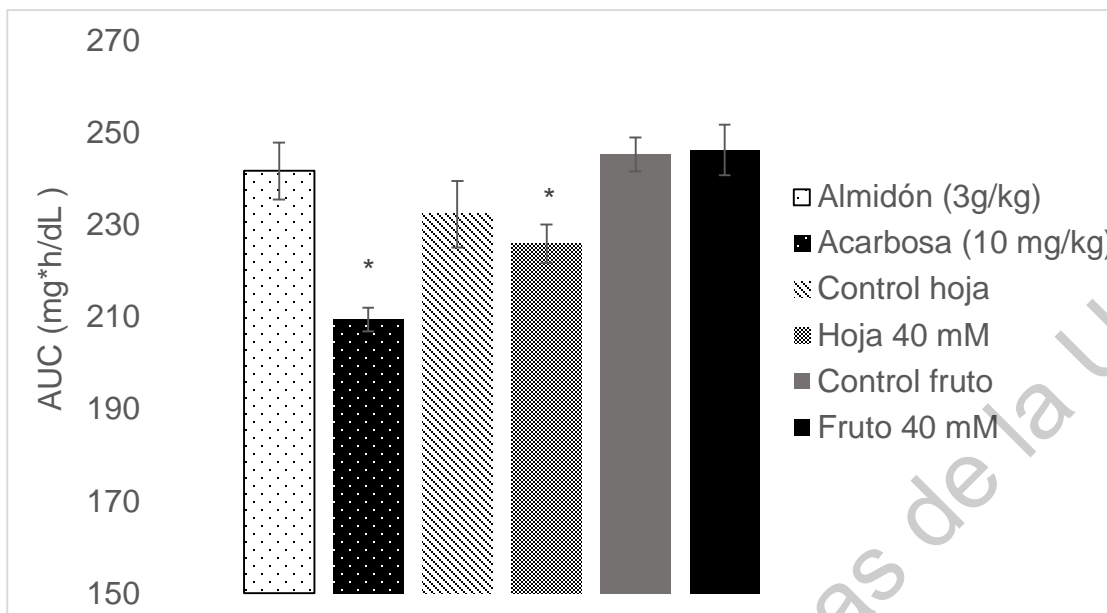


Figura 19. Efecto de la administración del agua de las decocciones de hoja y fruto al 5% p/v de *Physalis peruviana* en la tolerancia oral al almidón en ratas Wistar sanas. Los valores representan la media (mg*h/dL) \pm error estándar, n = 4. * indica diferencia estadística significativa respecto al control negativo, ($\alpha=0.1$) mediante la prueba de Dunnet. **Almidón:** control negativo, **Acarbosa:** control positivo, **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

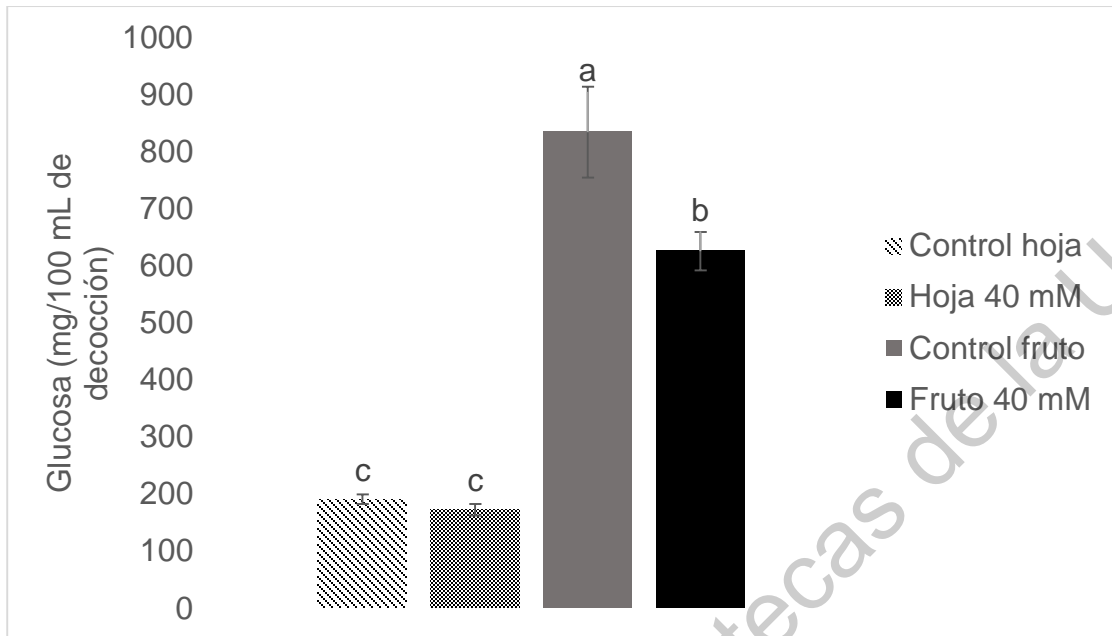


Figura 20. Contenido de azúcares reductores en el agua de las decocciones al 5% p/v de la hoja y el fruto de *Physalis peruviana* sometida a 40 mM de estrés salino. Los valores representan la media (mg de glucosa/100 mL de decocción) \pm desviación estándar, $n = 3$. Letras diferentes arriba de las barras representan diferencias significativas entre los tratamientos, ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

Los resultados muestran la aplicación de NaCl a 40 mM tuvo un efecto importante sobre el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en las decocciones de hoja y fruto de uchuva; lo cual mejoró los niveles de glucosa en ratas sanas después de una prueba de tolerancia oral al almidón (Figura 18). Sin embargo, el porcentaje de disminución del área bajo la curva (Figura 19) no resultó importante y esto puede ser debido al proceso térmico que sufrió la decocción, así como, la polaridad del solvente que afectó la cantidad y tipo de compuestos extraídos.

El estrés salino a 40 mM en hoja incrementó el contenido de compuestos fenólicos extraíbles, particularmente de glucósidos de flavonoides y ácidos fenólicos como: rutina, ácido clorogénico, kaemperol rutinósido y ácido feruloilquinico (Cuadro 8). La presencia de un azúcar en los flavonoides reduce su capacidad de inhibición de α -amilasa (Proença *et al.*, 2019). El ácido 5-cafeoil-quinico (ácido clorogénico) mostró una débil inhibición (máxima del 20%) de la enzima α -amilasa, lo que no sería suficiente para ejercer un efecto *in vivo* importante (Nyambe-Silwe y Williamson, 2018). Debido a que el tipo de compuestos fenólicos extraídos en las decocciones han demostrado tener una baja capacidad de inhibición de α -amilasa, los efectos de disminución de los niveles de glucosa observados para la hoja estresada a 40 mM podrían estar relacionados a otros mecanismos de acción, como: absorción de glucosa, secreción de insulina, transcripción de genes relacionados al metabolismo de carbohidratos y captación de glucosa en tejidos periféricos (Dias *et al.*, 2017).

7.9 Prueba de viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1, cultivados en medio suplementado con las decocciones de la hoja y el fruto de *Physalis peruviana*, sometida a 40 mM de estrés salino

Otro mecanismo a evaluar es la inducción del transporte de glucosa por efecto del tratamiento con las decocciones. Para esta etapa se liofilizaron y caracterizaron las decocciones al 3% p/v de hoja y fruto.

Los estudios de citotoxicidad son un paso inicial en la determinación de los efectos benéficos de una sustancia *in vitro*. La citotoxicidad *in vitro* permite estudiar los efectos locales o en tejidos cuando se conoce la biodisponibilidad de los compuestos responsables. Además, el proceso permite la identificación de sustancias útiles para estudios de actividad biológica. (Eisenbrand *et al.*, 2002). El ensayo de viabilidad mediante la determinación del porcentaje de proteína, considera que el contenido de proteína en el precipitado celular (masa celular) es proporcional al número de células viables. La disminución en el contenido de proteína después de aplicar un tratamiento sugiere que la sustancia está ejerciendo un efecto citotóxico (McGaw *et al.*, 2014).

El tratamiento de 40 mM aumentó en un 110% el contenido de compuestos fenólicos en el agua de la decocción de hoja liofilizada, respecto al control ($p < 0.05$); en el agua de la decocción de fruto liofilizada el tratamiento de 40 mM aumentó en un 36% el contenido de compuestos fenólicos, respecto al del control ($p < 0.05$) (Cuadro 9).

Respecto a los estudios de viabilidad, las decocciones con menor contenido de compuestos fenólicos muestran una tendencia a aumentar la viabilidad conforme se incrementa la concentración del liofilizado en el medio de cultivo. Por el contrario, las decocciones con mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides mostraron una tendencia a disminuir la viabilidad celular conforme se aumenta la concentración del liofilizado (Figura 21). El comportamiento puede deberse a un efecto de concentración de compuestos fenólicos extraíbles con potencial citóxico, particularmente en el fruto, ya que presenta mayor citotoxicidad que el extracto acuoso liofilizado de hoja.

Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante en las decocciones al 3% p/v liofilizadas de la hoja y el fruto de *Physalis peruviana*, sometida a 40 mM de NaCl.

Compuesto	Tratamiento			
	Control hoja	40 mM hoja	Control fruto	40 mM fruto
Fenoles totales ¹	17.45 ± 0.83 ^b	36.72 ± 0.84 ^a	4.23 ± 0.01 ^d	5.78 ± 0.39 ^c
Flavonoides totales ²	11.05 ± 0.20 ^b	30.86 ± 0.83 ^a	0.3 ± 0.03 ^c	0.51 ± 0.05 ^c
Proantocianidinas extraíbles ³	21.08 ± 0.36 ^b	28.03 ± 0.18 ^a	12.25 ± 0.59 ^c	12.63 ± 0.52 ^c
Método del radical DPPH ⁴	18.03 ± 1.47 ^b	30.47 ± 1.47 ^a	13.54 ± 0.41 ^c	14.18 ± 0.71 ^{bc}
Método del radical ABTS ⁴	62.06 ± 0.85 ^b	132.64 ± 6.74 ^a	18.67 ± 1.25 ^c	21.33 ± 2.05 ^c

Datos expresados como la media ± desviación estándar, n=3. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) mediante la prueba de Tukey. ¹ Fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g muestra liofilizada), ² flavonoides totales (mg equivalentes de rutina/g de muestra liofilizada), ³ proantocianidinas extraíbles (mg equivalentes de proantocianidinas extraíbles/g de muestra liofilizada) ⁴ capacidad antioxidante (mM equivalentes de trolox/100 g de decocción liofilizada). **DPPH**: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, **ABTS**: ácido 2,2'-Azino-bis (3- etilbenzotazolín-6-sulfónico). **Control hoja**: decocción de hoja sin estresar, **Control fruto**: decocción de fruto sin estresar.

Los resultados muestran que en el intervalo de concentraciones utilizadas se disminuyó la viabilidad mediante la determinación del porcentaje de proteína a partir de: 0.50 mg/mL para el fruto control, en las dosis empleadas en el fruto 40 mM y a partir de 0.75 mg/mL en la hoja 40 mM (Figura 22) ($p<0.05$), en consecuencia, se seleccionaron las dosis de 0.25 y 0.50 mg/mL para el estudio de captación de glucosa.

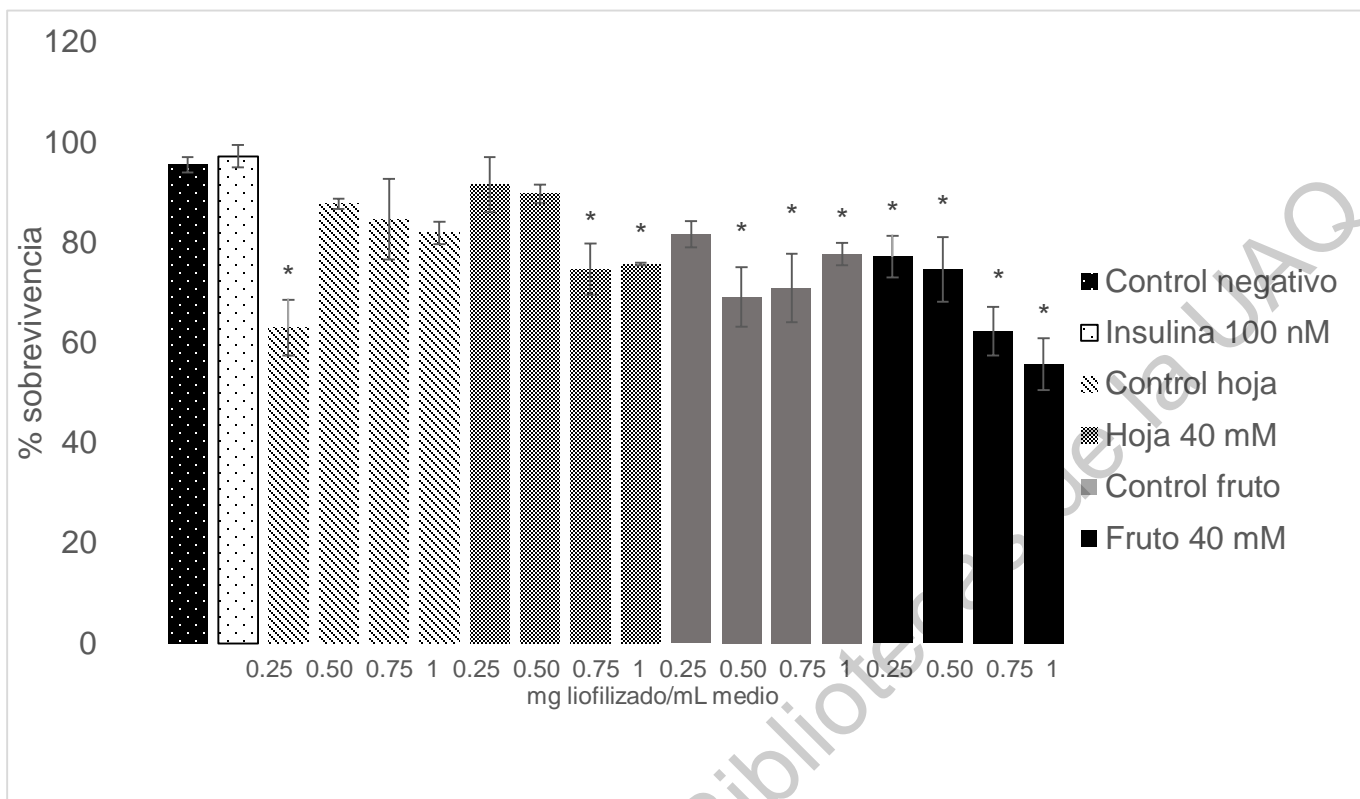


Figura 21. Porcentaje de proteína mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), en células de adipocitos 3T3-L1 cultivadas en medio suplementado con los liofilizados de las decocciones al 3% p/v de la hoja y el fruto de *Physalis peruviana*, sometida a 40 mM de estrés salino. Los valores representan la media (% de proteína respecto al control) \pm error estándar, $n = 3$. * arriba de las barras representa diferencias significativas con respecto al control negativo, ($\alpha=0.1$) mediante la prueba de Dunnet. **Control negativo:** medio sin tratamiento, **Insulina:** control positivo, **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

En la literatura se reporta que el extracto etanólico de fruto de *P. peruviana* no representa efectos citotóxicos sobre la línea celular de preadipocitos 3T3-L1 hasta dosis de 2 mg/mL (Codevilla *et al.*, 2018). En el presente estudio se encontró una disminución en la viabilidad celular, por lo cual fue importante elegir las dosis para el diseño del estudio *in vitro*, ya que, las concentraciones utilizadas del compuesto a probar deben evitar en lo posible el daño en las funciones metabólicas básicas como: la integridad de la membrana celular, la función mitocondrial y la síntesis de proteínas.

7.10 Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1, cultivados en medio suplementado con las decocciones de la hoja y el fruto de *Physalis peruviana*, sometida a 40 mM de estrés salino

La resistencia a la insulina es la característica clínica de la diabetes tipo 2, teniendo como consecuencias principales la disminución de la captación de glucosa en tejidos periféricos, aumento en la glicogenólisis y lipólisis, así como una disminución en glucogénesis. (Evans *et al.*, 2002; Defronzo, 2004). El aumento en la captación de glucosa en tejidos periféricos es un enfoque para el tratamiento de la diabetes. Los adipocitos 3T3-L1 son un modelo adecuado para estudiar la señalización de insulina, uno de los mecanismos moleculares de la enfermedad, ya que con su diferenciación se induce el fenotipo de adipocito que presenta dos de las principales señalizaciones de la insulina: transporte de glucosa y lipogénesis (Petersen y Shulman, 2018).

El agua de la decocción de hoja de *P. peruviana* sometida a 40 mM de estrés salino disminuyó la glucosa extracelular ($p < 0.1$) en un 16%, para las células suplementadas con 0.50 mg/mL (Figura 22) del agua de la decocción liofilizada, comparada con la del control sin tratamiento. El incremento en la captación de glucosa puede deberse a la activación de los receptores de insulina o la modulación en la expresión de genes de la cascada de señalización de la insulina (Sun *et al.*, 2020). Además, el efecto observado de disminución de glucosa en la curva de tolerancia al almidón (Figura 18) puede estar relacionado a esta mejora en la captación de glucosa.

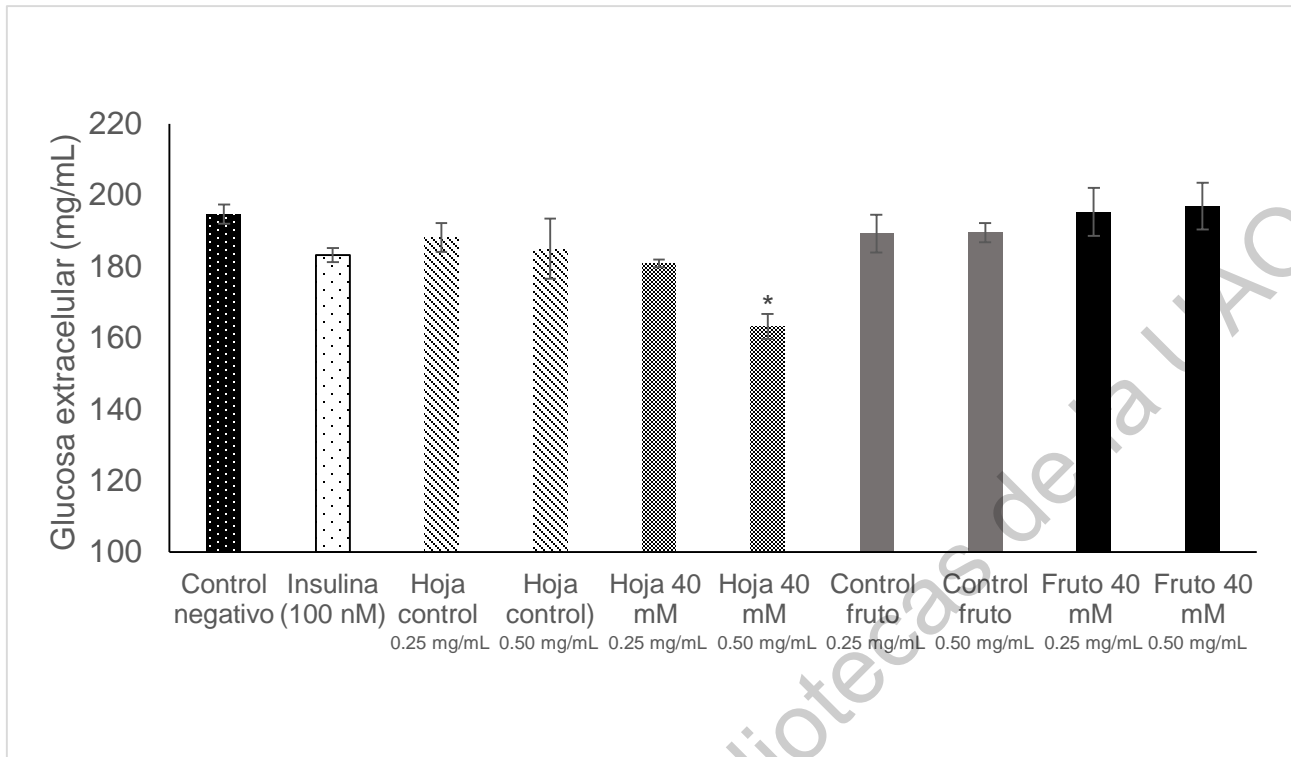


Figura 22. Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1, cultivados en medio suplementado con las decocciones de la hoja y el fruto al 3% p/v de *Physalis peruviana*, sometida a 40 mM de estrés salino. Los valores representan la media (mg de glucosa extracelular/dL de medio) \pm error estándar, n = 6. * arriba de las barras representa diferencias significativas con respecto al control negativo, ($\alpha=0.1$) mediante la prueba de Dunnet. **Control negativo:** medio sin tratamiento, **Insulina:** control positivo, **Control hoja:** decocción de hoja sin estresar, **Control fruto:** decocción de fruto sin estresar.

El estrés salino a 40 mM de NaCl incrementa el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en hoja de *P. peruviana*; el aumento en el contenido de flavonoides podría estar relacionado a una disminución en el contenido de proantocianidinas extraíbles. En fruto se presentaron efectos diferenciales respecto a la hoja, ya que altas concentraciones de estrés salino disminuyen la síntesis de carotenoides, mientras que, a 10 mM se induce su síntesis. Las diferencias entre fruto y hoja podrían estar relacionadas a la función de cada tipo de órgano, uno con función fotosintética y el otro con función de almacenamiento de fotosintatos. El incremento en la capacidad antioxidante en hoja cultivada a 40 mM de NaCl indica que la planta presenta tolerancia al estrés por salinidad y que éste induce una respuesta en el metabolismo, manifestada por un incremento en la producción de compuestos fenólicos.

El tiempo de decocción afecta de manera diferencial al contenido de compuestos fenólicos en el agua de las decocciones de hoja y fruto de uchuva, afectando en mayor medida a la de hoja; las diferencias pudieran estar relacionadas al tipo de unión y compuestos en la matriz alimentaria.

Las decocciones con mayor contenido de compuestos fenólicos mostraron una tendencia a disminuir la viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1, por lo tanto, el estrés salino a 40 mM podría estar incrementando el contenido de compuestos con potencial citotóxico. El estudio de los mecanismos de citotoxicidad sería importante en futuros estudios *in vitro* para estudiar los efectos locales o en tejidos cuando se conoce la biodisponibilidad de los compuestos responsables; además, el proceso permitiría la identificación de sustancias útiles para estudios de actividad biológica.

El incremento en el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en decocción de hoja, cultivada a 40 mM de estrés salino, potenció su capacidad hipoglucemiante *in vivo* y de transporte de glucosa en adipocitos 3T3-L1. El estrés salino en uchuva se podría usar como estrategia para prevenir y disminuir los efectos de la resistencia a la insulina en diabetes.

8 CONCLUSIONES

- El estrés salino en hojas de uchuva incrementa el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides, lo cual podría estar relacionado a la disminución de las proantocianidinas extraíbles y no extraíbles, dicho efecto mejora las capacidades antioxidantes, sugiriendo que la planta presenta tolerancia al estrés por salinidad. En fruto se presentan efectos diferenciales, ya que el estrés salino a bajas concentraciones favorece la producción de carotenoides.
- El tratamiento térmico disminuye los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en el agua de la decocción de hoja, mientras que, en el agua de la decocción de fruto incrementa el contenido de flavonoides. Las diferencias pueden estar relacionadas al tipo y distribución de compuestos fenólicos en la matriz alimentaria.
- En el agua de decocción de hoja se lograron identificar 19 compuestos fenólicos, cuyo contenido aumentó en el tratamiento de 40 Mm de estrés salino. La rutina fue un compuesto fenólico común entre el agua de decocción de hoja y fruto, y podría ser el responsable de los efectos de inhibición de lipasa pancreática e hipoglucémicos observados.
- El agua de las decocciones de la hoja y el fruto presentan capacidad de inhibición de lipasa pancreática *in vitro*, lo que podría hacerlas adecuadas para disminuir los niveles de ácidos grasos libres que presentan bajo una condición de resistencia a la insulina.
- Las aguas de las decocciones con mayor contenido de compuestos fenólicos mostraron una tendencia a disminuir la viabilidad celular conforme se aumenta su concentración en el medio de cultivo para células de adipocitos 3T3-L1. El estrés salino a 40 mM pudo aumentar el contenido de compuestos fenólicos extraíbles con potencial citotóxico, particularmente en el fruto, por lo que en futuros estudios es de importancia la identificación de los mecanismos y compuestos responsables de éste efecto.

- La aplicación de estrés salino a 40 mM en hoja mejora la capacidad hipoglucemiante de su decocción, al disminuir el pico hiperglicémico en ratas sanas después de una prueba de tolerancia oral al almidón, este efecto podría ser explicado por el aumento en la captación de glucosa extracelular demostrada en adipocitos 3T3-L1.
- La aplicación de estrés salino durante el cultivo de *Physalis peruviana*, potencia la capacidad hipoglucemiante *in vivo* e inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro*, del agua de la decocción de hoja. El estrés salino en uchuva se podría usar como estrategia para prevenir y disminuir los efectos de la resistencia a la insulina en diabetes.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

9 REFERENCIAS

Abeynayake, S. W., Panter, S., Chapman, R., Webster, T., Rochfort, S., Mouradov, A., Spangenberg, G. (2012). Biosynthesis of proanthocyanidins in white clover flowers: cross talk within the flavonoid pathway. *Plant Physiology*, 158 (2), 666-678.

Alves, L.S. R., Rodríguez, S. J. D., dos Santos, H. O., Pasqual, M., Braga, R. A., Reis, R. O., Ramos, J. D. (2017). Effects of silicon on antioxidant enzymes, CO₂, proline and biological activity of *in vitro*-grown cape gooseberry under salinity stress. *Australian Journal of Crop Science*, 11(4), 438-446.

Amaya-Cruz, D. M., Pérez-Ramírez, I. F., Delgado-García, J., Mondragón-Jacobo, C., Dector-Espinoza, A., Reynoso-Camacho, R. (2019). An integral profile of bioactive compounds and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.) peel with different tonalities. *Food chemistry*, 278, 568-578.

Asgar, A. M. (2012). Anti-Diabetic Potential of Phenolic Compounds: A Review. *International Journal of Food Properties*, 16 (1), 91–103.

Azuma, R., Ito, N., Nakayama, N., Suwa, R., Nguyen, N. T., Larrinaga-Mayoral, J. Á., Esaka, M., Fujiyama, H., Saneoka, H. (2010). Fruits are more sensitive to salinity than leaves and stems in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 125 (3), 171-178.

Babu, A.M., Singh D., Gothandam, K. M. (2011). Effect of salt stress on expression of carotenoid pathway genes in tomato. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7 (3), 87-94.

Baynest, H. W. (2015). Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Metabolism*, 6 (5), 1-9.

Bernal, C. A., Castellanos, L., Aragón, D. M., Martínez-Matamoros, D., Jiménez, C., Baena, Y., Ramos, F. A. (2018). Peruvioses A to F, sucrose esters from the exudate of *Physalis peruviana* fruit as α -amylase inhibitors. *Carbohydrate Research*, 461, 4-10.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28 (1), 25-30.

Castañeda-Salinas, C., Sandoval-Villa, M., Sánchez-Monteón, A. L., Alejo-Santiago, G., Jiménez-Meza, V. M., Aburto-González, C. A., García-López, M. (2013). Respuesta de plántulas de uchuva (*Physalis peruviana* L.) diferentes concentraciones de nitrato y amonio. *Revista Bio Ciencias*, 2 (3), 148-153.

Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gérardin, C., Paris, C., Charbonnel, C., Chekir, L., Ghoul, M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>.

Chen, X., Han, H., Jiang, P., Nie, L., Bao, H., Fan, P., Sulian, L.V., Feng, J., Li, Y. (2011). Transformation of β -lycopene cyclase genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* conferred salt tolerance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 52 (5), 909-921.

Codevilla, C. F., Tischer, B., Gindri, A. L., Nogueira-Librelotto, D. R., Barin, J. S., Silva, C. D. B. D., Bueno, R.C.M., Queiroz, Z.L., Menezes, C. R. D. (2018). Cytotoxicity and antioxidant activity of goldenberry extracts obtained with high intensity ultrasound. *Ciência Rural*, 48(2), doi:<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170362>

Corrales-Bernal A., Ariza, A. I. V., Celis, M. E. M., Rojano, B. A., & Yahia, E. (2015). Características nutricionales y antioxidantes de la uchuva colombiana (*Physalis peruviana* L.) en tres estadios de su maduración. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 4 (65), 254-262.

DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics*, 88 (4), 787-835.

De Taeye, C., Cibaka, M. L. K., Collin, S. (2017). Occurrence and antioxidant activity of C1 degradation products in cocoa. *Foods*, 6 (3), 18.

Dias, S. J. M., Barbosa P.L.A.E., Cabral, S.J., Almeida, J.R.G.S., Pequeno de Oliveira, H. (2017). Influence of flavonoids on mechanism of modulation of insulin secretion. *Pharmacognosy magazine*, 13 (52), 639-646.

Doganlar, Z. B., Demir, K., Basak, H., Gul, I. (2010). Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (15), 2056-2065.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot J.C., Pieters R., Kleiner, J. (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food and chemical toxicology*, 40 (2-3), 193-236.

El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Safwat, G., Gamal, M., Megahed, B. M. (2019). Chemical Composition and Biological Activity of *Physalis peruviana* L. *Gesunde Pflanzen*, 21, 1-10.

ENSANUT (2018). Recuperado el 27 de Enero del 2020, de: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>

Etzbach, L., Pfeiffer, A., Weber, F., Schieber, A. (2018). Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSn. *Food chemistry*, 245, 508-517.

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23 (5), 599-622.

Fauron, R. (1994). Galénica y fitoterapia: aspectos cualitativos. *Natura Medicatrix* (37), 54-60.

Ferreira, O., Pinho, S. P. (2012). Solubility of flavonoids in pure solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51 (18), 6586-6590.

Figuroa-Pérez, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Pérez-Ramírez, I. F., Mercado-Silva, E., Reynoso-Camacho, R. (2014). Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of peppermint (*Mentha piperita*) grown under drought stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (49), 12027-12033.

Fischer, G. (2000). Crecimiento y desarrollo. En Flores, R.V.J., Fischer, G., De Sora, A.R. (Eds) Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) (pp 9-26). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Fischer, G., Herrera, A., Almanza, P. J. (2011). Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). En Kader, A. (Ed) Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits (pp. 374-397) Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

Fischer, G., Melgarejo, L. M. (2020). The ecophysiology of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.)-an Andean fruit crop. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 14 (1), 76-89.

Foti, M. C. (2015). Use and Abuse of the DPPH• Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (40), 8765-8776.

Frary, A., Göl, D., Keleş, D., Ökmen, B., Pınar, H., Şığva, H. Ö., Yamenicioglu, A. Doğanlar, S. (2010). Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*, 10(1), 58-74.

Garriga, M., Almaraz, M., Marchiaro, A. (2017). Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (Harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method) *Actas de Ingenieria*, 3, 173-179.

Gastelum-Osorio, D. A., Sandoval-Villa, M., Trejo-López, C., Castro-Brindis, R. (2013). Fuerza iónica de la solución nutritiva y densidad de plantación sobre la producción y calidad de frutos de *Physalis peruviana* L. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19 (2), 197-210.

Gholizadeh, A., Kohnehrouz, B. B. (2010). Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22 (4), 217-223.

Guiné, R. P., Barroca, M. J. (2012). Effect of drying treatments on texture and color of vegetables (pumpkin and green pepper). *Food and Bioproducts Processing*, 90 (1), 58-63.

Hamden, K., Mnafgui, K., Amri, Z., Aloulou, A., Elfeki, A. (2013). Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes, hyperlipidemia, and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats. *Scientia Pharmaceutica*, 81 (1), 233-246.

Han, H., Li, Y., Zhou, S. (2008). Overexpression of phytoene synthase gene from *Salicornia europaea* alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology Letters*, 30(8), 1501-1507.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (4), 1365-1402.

Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (6), 2274-2279.

Hassan, F. A., Ismail, A., Abdulhamid, A., Azlan, A. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds in bambangan (*Mangifera pajang* Kort.) peels and their free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (17), 9102-9111.

Hassanién, M. F. R. (2011). *Physalis peruviana*: a rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. *Food Reviews International*, 27 (3), 259-273.

Herrera, T., Aguilera, Y., Rebollo-Hernanz, M., Bravo, E., Benítez, V., Martínez-Sáez, N., Arribas, S. M., Del Castillo, M.D., Martín-Cabrejas, M. A. (2018). Teas and herbal infusions as sources of melatonin and other bioactive non-nutrient components. *LWT Food Science and Technology*, 89, 65-73.

Hichem, H., Mounir, D., El Ayeb, N. (2009). Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Industrial Crops and Products*, 30 (1), 144-151.

Holt, R. I. (2004). Diagnosis, epidemiology and pathogenesis of diabetes mellitus: an update for psychiatrists. *The British Journal of Psychiatry*, 184 (47), 55-63.

Hsu, C. Y., Shih, H. Y., Chia, Y. C., Lee, C. H., Ashida, H., Lai, Y. K., Weng, C. F. (2014). Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58 (6), 1168-1176.

INEGI (2018) Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Recuperado el 14 de marzo del 2017, de: <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodem/DEFUNCIONES2017.pdf>

Julkowska, M. M., Testerink, C. (2015). Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends in Plant Science*, 20 (9), 586-594.

Kamalakkannan, N., Prince, P. S. M. (2006). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98 (1), 97-103.

Kaneria, M. J., Bapodara, M. B., Chanda, S. V. (2012). Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem. *Food Analytical Methods*, 5 (3), 396-404.

Kappel, V. D., Frederico, M. J., Postal, B. G., Mendes, C. P., Cazarolli, L. H., Silva, F. R. (2013). The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. *European Journal of Pharmacology*, 702 (1-3), 264-268.

Kasali, F. M., Kadima, J. N., Mpiana, P. T., Ngbolua, K. T. N., Tshibangu, D. S. T. (2013). Assessment of antidiabetic activity and acute toxicity of leaf extracts from *Physalis peruviana* L. in guinea pig. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3 (11), 841-846.

Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Lernmark, Å., Jacobsen, L.M., Desmond, A.S., Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews*, 3, 1-17.

Konica Minolta (s.f.) Entendiendo el espacio del color CIE-Lab. Recuperado el 30 de abril del 2020, de: <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>

Konica Minolta (s.f.) Entendiendo el espacio del color CIE-LCh. Recuperado el 04 de enero del 2021, de: <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lch/>

Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-Larky, D., Asadi-Samani, M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electronic Physician*, 8 (1), 1832-1842.

Koskimäki, J. J., Hokkanen, J., Jaakola, L., Suorsa, M., Tolonen, A., Mattila, S., Pirttilä, A.M., Hohtola, A. (2009). Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. *European Journal of Plant Pathology*, 125 (4), 629-640.

Li, B., Fan, R., Guo, S., Wang, P., Zhu, X., Fan, Y., Chen, Y., He, K., Kumar, A., Shi, J., Wang, Y., Li, L., Hu, Z., Song, C.P. (2019). The *Arabidopsis* MYB transcription factor, MYB111 modulates salt responses by regulating flavonoid biosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 166, 103807.

Licodiedoff, S., Koslowski, L. A. D., Ribani, R. H. (2013). Flavonol rates of goseberry fruits *Physalis peruviana* determined by HPLC through the optimization and validation of the analytic method. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 3 (1), 1-6.

Lock, O., Perez, E., Villar, M., Flores, D., Rojas, R. (2016). Bioactive compounds from plants used in Peruvian traditional medicine. *Natural Product Communication*, 11(3), 315-37.

López, K., Vega-Gálvez, A., Torres, M.J., Lemus-Mondaca, R., Quispe-Fuentes, I., Di Scala, K. (2013). Effect of dehydration temperature on physico-chemical properties and antioxidant capacity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73 (3), 293-300.

McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry*, 115 (1), 193–199.

Maobe, M. A., Gatebe, E., Gitu, L., Rotich, H. (2013). Preliminary phytochemical screening of eight selected medicinal herbs used for the treatment of diabetes, malaria and pneumonia in Kisii region, southwest Kenya. *European Journal of Applied Sciences*, 5 (10), 01-06.

Martínez-González, A. I., Alvarez-Parrilla, E., Díaz-Sánchez, Á. G., de la Rosa, L. A., Núñez-Gastélum, J. A., Vazquez-Flores, A. A., Gonzalez-Aguilar, G. A. (2017). *In vitro* inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food Technology and Biotechnology*, 55(4), 519-530.

McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., Eloff, J. N. (2014). Cytotoxicity of African medicinal plants against normal animal and human cells. En Kuete, V. (Ed) Toxicological survey of African medicinal plants (pp. 181-233). Dschang, Cameroon: Elsevier.

Meenakshi A. (2018) Cell culture media: a review. Recuperado el 20 de abril del 2020, de: <http://www.labome.es/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>

Miranda, D., Fischer, G., Mewis, I., Rohn, S., Ulrichs, C. (2014). Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 67-73.

Miranda, D., Ulrichs, C., Fischer, G. (2010). Dry matter accumulation and foliar K, Ca and Na contents in salt-stressed cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants. *Agronomía Colombiana*, 28 (2), 165-172.

Mohamed, E. A., Ahmad, M., Ang, L. F., Asmawi, M., Yam, M. F. (2015). Evaluation of α -glucosidase inhibitory effect of 50% ethanolic standardized extract of *Orthosiphon stamineus* benth in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-6.

Muñoz-Jáuregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C., Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73 (3), 142-149.

Najafpour, G.D. (2007). Growth kinetics. En Najafpour, G.D. (Ed) *Biochemical Engineering and Bioechnology* (pp 81-141). Oxford, UK: Elsevier Science.

Narváez-Cuenca, C. E., Mateus-Gómez, Á., Restrepo-Sánchez, L. P. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content of air-dried cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) at different ripeness stages. *Agronomía Colombiana*, 32 (2), 232-237.

Nyambe-Silavwe, H., Williamson, G. (2018). Chlorogenic and phenolic acids are only very weak inhibitors of human salivary α -amylase and rat intestinal maltase activities. *Food Research International*, 113, 452–455.

Olivares-Tenorio, M. L., Dekker, M., Verkerk, R., van Boekel, M. A. (2016). Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): review from a supply chain perspective. *Trends in food science & technology*, 57, 83-92.

Olives B. A., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F., De Tejada, M. L. S. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food chemistry*, 95(2), 328-336.

Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 935-942.

Parida, A. K., Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60 (3), 324-349.

Pascale, S. D., Maggio, A., Fogliano, V., Ambrosino, P., Ritieni, A. (2001). Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76 (4), 447-453.

Peng, X., Zhang, G., Liao, Y., Gong, D. (2016). Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase. *Food Chemistry*, 190, 207-215.

Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F. (2014). Non-extractable polyphenols in plant foods: nature, isolation, and analysis. En Ross, W.R. (Ed). *Polyphenols in Plants* (pp. 203-218). Arizona, USA: Academic Press.

Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, 74, 315-323.

Pérez-Ramírez, I. F., González-Dávalos, M. L., Mora, O., Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R. (2017). Effect of *Ocimum sanctum* and *Crataegus pubescens* aqueous extracts on obesity, inflammation, and glucose metabolism. *Journal of Functional Foods*, 35, 24-31.

Petersen, M. C., Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133-2223.

Peungvicha, P., Thirawarapan, S. S., Watanabe, H. (1998). Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid, a constituent of *Pandanus odoros* root. *Japanese Journal of Pharmacology*, 78 (3), 395-398.

Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Tomé, S. M., Oliveira, E. F. T., Viegas, M. F., Araújo, A.N., Ramos, M.J., Silva, A.M.S., Fernandes, P.A., Fernandes, E. (2019). Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic α -amylase towards a structure–activity relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 577–588.

Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44 (7), 1733-1740.

Ramadan, M. F. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*, 44 (7), 1830-1836.

Ramakrishna, A., Gokare, R.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (11), 1720-1731.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.

Rey, D. P., Ospina, L. F., Aragón, D. M. (2015). Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 44 (1), 72-89.

Rodrigo, R., Libuy, M. (2014). Modulation of plant endogenous antioxidant systems by polyphenols. En Ross, W.R. (Ed). *Polyphenols in Plants* (pp. 65-85). Arizona, USA: Academic Press.

Rodríguez U.S. L., Rodríguez U. E. M. (2007). Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. *Revista Médica Vallejania*, 4 (1), 43-53.

Rockenbach, I. I., Rodríguez, E., Cataneo, C., Gonzaga, L. V., Lima, A., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2008). Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. *Alimentos e Nutrição*, 19 (3), 271-276.

Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Valsikova, M. (2012). Bioactive content and antioxidant capacity of Cape gooseberry fruit. *Open Life Sciences*, 7 (4), 672-679.

Roseiro, L. B., Tavares, C. S., Roseiro, J. C., Rauter, A. P. (2013). Antioxidants from aqueous decoction of carob pods biomass (*Ceretonia siliqua* L.): Optimisation using response surface methodology and phenolic profile by capillary electrophoresis. *Industrial Crops and Products*, 44, 119–126.

Sabino-López, J. E., Sandoval-Villa, M., Alcántar-González, G., Ortiz-Solorio, C., Vargas-Hernández, M., Colinas-León, T. (2016). Fenología de *Physalis peruviana* L. cultivada con base en tiempo térmico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17, 3521-3528

Samarakoon, S., Thabrew, I., Galhena, P., De Silva, D., Tennekoon, K. (2010). A comparison of the cytotoxic potential of standardized aqueous and ethanolic extracts of a polyherbal mixture comprised of *Nigella sativa* (seeds), *Hemidesmus indicus* (roots) and *Smilax glabra* (rhizome). *Pharmacognosy Research*, 2 (6), 335-343.

Sathyadevi, M., Suchithra, E. R., Subramanian, S. (2014). *Physalis peruviana* Linn. Fruit extract improves insulin sensitivity and ameliorates hyperglycemia in high-fat diet low dose STZ-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Pharmacy Research*, 8 (4), 625-32.

Schaich, K. M., Tian, X., Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125.

Shahidi, F., Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21 (9), 1216-1238.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24 (13), 2452.

Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A., Ahuja, P. S. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Functional & Integrative Genomics*, 9 (1), 125-134.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela, R. R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-78.

Sirin, S., Aslim, B. (2018). Determination of antioxidant capacity, phenolic acid composition and antiproliferative effect associated with phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in some plants naturally growing under salt stress. *Medicinal Chemistry Research*. 28 (3), 229-238.

Soares, M. B. P., Brustolim, D., Santos, L. A., Bellintani, M. C., Paiva, F. P., Ribeiro, Y. M., Tomassini, T.C.B., Dos Santos, R. R. (2006). Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6 (3), 408-414.

Spiteller, D. (2008). Plant defense strategies. En Erick, S.J., Fath, B.D. (Eds) *Encyclopedia of Ecology* (pp. 2798-2811). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30 (18), 3268-3295.

Sun, C., Zhao, C., Guven, E. C., Paoli, P., Simal-Gandara, J., Ramkumar, K. M., Wang, S., Buleu, F., Pah, A., Turi, V., Damian, G., Dragan, S., Tomas, M., Khan, W., Wang, M., Delmas, D., Portillo, M.P., Dar, P., Chen, L., Xiao, J. (2020). Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities. *Food Frontiers*, 1 (1), 18-44.

Tahrani, A. A., Barnett, A. H., Bailey, C. J. (2016). Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 12 (10), 566-592.

Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104 (4), 1372-1378.

Tesserra-Rimbau T.A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., Salas-Salvado, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Saez, G.T., Ruiz-Gutiérrez, V., Warnberg J., Lamuela-Raventós, R.M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23 (10), 953-959.

Thermo Scientific (2020). Pierce BCA Protein Assay Kit user guide. Recuperado el 20 de abril del 2020, de: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUGllcmNlIEJDQSBQcm90ZWluIEFzc2F5IEtpdA==

Thomas, H. E., McKenzie, M. D., Angstetra, E., Campbell, P. D., Kay, T. W. (2009). Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis*, 14 (12), 1389-1404.

Toscano-González J. Y. (2006). Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San José de Pare-Boyacá: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Acta biológica colombiana*, 11 (2), 137-146.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2 (12), 1231-1246.

Valdenegro, M., Almonacid, S., Henríquez, C., Lutz, M., Fuentes, L., Simpson, R. (2013). The effects of drying processes on organoleptic characteristics and the health quality of food ingredients obtained from goldenberry fruits (*Physalis peruviana*). *Open Access Scientific Reports*, 2 (642), 2-7.

Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Rodríguez, K., Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., López, J., Pérez-Won, M. (2009). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117 (4), 647-653.

Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., Di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 58 (2), 519-526.

Waśkiewicz, A., Muzolf-Panek, M., Goliński, P. (2013). Phenolic content changes in plants under salt stress. En Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V (Eds). *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 283-314). New York, NY: Springer

Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4 (3), 675-682.

Wu, S. J., Chang, S. P., Lin, D. L., Wang, S. S., Hou, F. F., Ng, L. T. (2009). Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (6), 1132-1138.

X-rite (2002) Guía para entender la comunicación del color. Recuperado el 30 de abril del 2020, de: https://www.mcolorcontrol.com/archivos/L10-001_Understand_Color_es.pdf

Xu, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55 (2), 330-335.

Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T., Davies, M. J. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 92 (1084), 63-69.

Zhang, H. X., Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature biotechnology*, 19 (8), 765-768.

Zhang, W. L., Chen, J. P., Lam, K. Y. C., Zhan, J. Y. X., Yao, P., Dong, T. T. X., Tsim, K. W. K. (2014). Hydrolysis of glycosidic flavonoids during the preparation of Danggui Buxue Tang: an outcome of moderate boiling of chinese herbal mixture. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-11.

Zurita, J., Díaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F. (2012). Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63 (8), 936-939.