

## ***Cnidoscolus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad\***

### ***Cnidoscolus chayamansa* organic hydroponic and its hypoglycemic capacity, nutraceutical quality and toxicity**

**Ramón Valenzuela Soto<sup>1,2</sup>, María Eufemia Morales Rubio<sup>2</sup>, María Julia Verde Star<sup>2</sup>, Azucena Oranday Cárdenas<sup>2</sup>, Pablo Preciado-Rangel<sup>3</sup>, Jacob Antonio González<sup>4</sup> y Juan Ramón Esparza-Rivera<sup>5§</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Gómez Palacio, Gómez Palacio, Durango, México. (ramonvalz@yahoo.com.mx). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Universidades/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. (mmorales1132000@yahoo.com; jverdestar@gmail.com; azucenaoranday@hotmail.com). <sup>3</sup>Instituto Tecnológico de Torreón, Carretera Torreón-San Pedro, km 7.5, Ejido Ana, Torreón, Coahuila, México. (ppreciador@yahoo.com.mx). <sup>4</sup>Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria (DGETA-BEDR 122). Nezahualcóyotl Núm. 110. Palacio Municipal, Colonia Centro. Texcoco, Estado de México. (mf05@yahoo.com.mx). <sup>5</sup>Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango Avenida Artículo 123 S/N Fraccionamiento Filadelfia C. P. 35010, Gómez Palacio, Durango, México. Tel: 871-7158810, Fax: 871-7152964. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: jresparza02001@yahoo.com.

## **Resumen**

La chaya es una planta con calidad nutricional y posee un alto potencial en la salud pública en el tratamiento de diabetes mellitus. La diabetes *mellitus* es una de las enfermedades crónico-degenerativas con mayor prevalencia en México. Por otra parte, en los últimos años se ha incrementado el interés por la evaluación de los efectos del consumo de extractos de plantas como alternativa inocua para el tratamiento de diabetes. Estudios recientes han demostrado que extractos de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) tienen propiedades antioxidantes. Sin embargo, se desconoce si las infusiones (extractos acuosos) de dicha planta poseen propiedades hipoglicemiantes. La capacidad hipoglicemiante y toxicidad de una infusión de hojas de chaya hidropónica producida orgánicamente fueron evaluadas mediante modelos *in vivo*, usando ratas macho Wistar albinas (evaluación de capacidad hipoglicemiante), y larvas de *Artemia salina* (determinación de toxicidad). Asimismo se determinaron el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de la infusión. El consumo de la infusión evaluada redujo los niveles de glucosa de las ratas diabéticas, teniendo un mayor efecto hipoglicemiante que la aplicación de glibenclamida. La

## **Abstract**

Chaya is a plant nutritional quality and has high potential for public health in the treatment of diabetes *mellitus*. Diabetes *mellitus* is one of the most chronic degenerative diseases prevalent in Mexico. Moreover, in recent years has been increasing interest in assessing the effects of using plant extracts as safe alternative for the treatment of diabetes. Recent studies have shown that extracts of chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) have antioxidant properties. However, it is unknown whether infusions (aqueous extracts) of the plant possess hypoglycemic properties. The hypoglycemic ability and toxicity of an infusion of leaves of hydroponic chaya organically produced were evaluated by *in vivo* models using male Wistar albino rats (evaluation of hypoglycemic capacity), and larvae of *Artemia salina* (determination of toxicity). The phenolic content and antioxidant capacity of infusion were also determined. The consumption of the evaluated infusion reduced glucose levels of diabetic rats, having a higher hypoglycemic effect than the application of glibenclamide. The toxicity assessment showed that infusion of organic hydroponic chaya leaf is not toxic and is safe for consumption as potential hypoglycemic agent.

\* Recibido: octubre de 2014  
Aceptado: marzo de 2015

evaluación de toxicidad mostro que la infusión de hoja de chaya hidropónica orgánica no es toxica y es segura para su consumo como potencial agente hipoglicemiante.

**Palabras clave:** antioxidantes, diabetes, extractos de plantas, hipoglicemiante, inocuidad.

## Introducción

La chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) es un arbusto semiperenne y semileñoso de hasta 5 m de altura perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, el cual es cultivado en climas cálidos subhúmedos ubicados de 0 a 1 000 msnm. Esta planta requiere de suelos bien drenados para su adecuado desarrollo, además que es tolerante a condiciones ambientales adversas incluyendo lluvias fuertes y sequía intraestival (Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002). La parte más aprovechada de la chaya son sus hojas (Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002), cuya calidad nutricional es mayor que la de las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.), destacando el alto contenido de proteína, fibra, minerales como calcio y potasio, y vitamina C en hojas de *C. chayamansa* cocida (Kuti y Torres, 1996). Además, se ha recomendado que las hojas de chaya sean cocidas preferentemente antes de su consumo, debido a su contenido de ácido cianhídrico (Castro- Juárez *et al.*, 2014).

Por otra parte dentro de los principales usos de la chaya en México y entre la población hispana en los Estados Unidos de América se encuentran su consumo como verdura y como agente medicinal naturista para el tratamiento de la diabetes *mellitus* (Kuti y Torres, 1996; Castro- Juárez *et al.*, 2014). La diabetes *mellitus* es una alteración del metabolismo de los carbohidratos caracterizada por niveles elevados de glucosa sanguínea o hiperglicemia (Calderín- Bouza *et al.*, 2007), la cual es asociada con daño y disfunción de varios órganos incluyendo ojos, riñones, nervios, vasos sanguíneos y corazón (OMS, 2012). Además, esta enfermedad es un factor condicionante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como infarto del corazón y accidente vascular cerebral (De Fronzo, 2004; OMS, 2012). La diabetes *mellitus* representa un gran problema de salud pública en México debido a su alta tasa de mortalidad, con 75 defunciones por cada 100 000 habitantes en el año 2012 (INEGI, 2012).

Asimismo, en años recientes se han reportado aumentos en las tasas de incidencia y mortalidad en México relacionadas con la diabetes, teniendo un incremento de 80% en la tasa de

**Keywords:** antioxidants, diabetes, hypoglycemic, plant extracts, safety.

## Introduction

Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) is a semi-evergreen and somewhat hairy shrub to 5 m tall pertaining to *Euphorbiaceae* family, which is grown in warm climates subhumid located from 0 to 1000 m. This plant requires well-drained soil for proper development, and it is tolerant to adverse environmental conditions including heavy rains and drought intraestival (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002). The harvested part of the chaya are the leaves (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002), which has higher nutritional quality than spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.), emphasizing the high protein content, fibre, minerals like calcium and potassium, and vitamin C in cooked leaves of *C. chayamansa* (Kuti and Torres, 1996). Furthermore, it has been recommended that chaya leaves are preferably cooked before consumption, due to hydrogen cyanide (Castro-Juárez *et al.*, 2014).

Moreover, within the main uses of chaya in Mexico and among Hispanics in the United States are consumed as vegetables and a naturist medicinal agent for the treatment of diabetes, *mellitus* (Kuti and Torres, 1996; Castro- Juárez *et al.*, 2014). Diabetes *mellitus* is a disorder of carbohydrate metabolism characterized by elevated blood glucose levels or hyperglycemia (Calderín- Bouza *et al.*, 2007), which is associated with damage and dysfunction of multiple organs including the eyes, kidneys, nerves, blood vessels and heart (OMS, 2012). In addition, this disease is a condition for the development of cardiovascular diseases such as heart attack and stroke (De Fronzo, 2004; OMS, 2012) factor. Diabetes *mellitus* represents a major public health problem in Mexico because of its high mortality rate, with 75 deaths per 100 000 inhabitants in 2012 (INEGI, 2012).

Also, in recent years have reported increases in incidence and mortality related to diabetes Mexico, having a 80% increase in the mortality rate attributable to this disease during the period 1998 to 2013 (INEGI, 2012). Some drugs have been developed to control blood glucose levels, including drugs such as glyburide and metformin (Olmedo *et al.*, 2013; Pavlovic and Carvajal, 2013), which are regularly prescribed to diabetic patients. However, these drugs produce side effects in the patient, including intrahepatic cholestasis,

mortalidad atribuible a esta enfermedad durante el periodo 1998-2013 (INEGI, 2012). Algunos medicamentos han sido desarrollados para controlar los niveles de glucosa en sangre, incluyendo fármacos como la glibenclamida y la metformina (Olmedo *et al.*, 2013; Pavlovic y Carvajal, 2013), los cuales son regularmente prescritos a pacientes diabéticos. Sin embargo, estos medicamentos producen efectos secundarios en el paciente que incluyen colestasis intrahepática, ampollas cutáneas, anoxia tisular y acidosis láctica, además de causar predisposición para el desarrollo de enfermedades renales y pulmonares (Salpeter *et al.*, 2003).

Así pues, es requerida la evaluación de alternativas farmacológicas de origen natural para el control de la hiperglicemia que no representen un riesgo toxicológico para el paciente diabético. En México tradicionalmente se han consumido diversos tejidos vegetales con supuestas propiedades anti diabéticas, entre las que se encuentran frutos frescos de aguaymanto (*Physalis peruviana*) (Rodríguez *et al.*, 2007); hojas de ruda (*Ruta graveolens* L.) (Figueroa-Valverde *et al.*, 2009), y de chaya (*Cnidocolus chayamansa*) (Pillai *et al.*, 2012). Una de las principales ventajas atribuidas a los tratamientos médicos naturistas es que representan un menor riesgo toxicológico para el paciente en comparación con la administración o consumo de fármacos sintéticos (Rates, 2001), además de su aporte nutraceutico debido a su contenido de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes (Drago *et al.*, 2006).

Por otra parte, una de las formas tradicionales de preparación de derivados vegetales en tratamientos naturistas consiste en las infusiones o tés. Sin embargo, se cuenta con limitada información acerca de las propiedades hipoglucemiantes de infusiones de chaya, además de que no se ha evaluado su inocuidad. Así pues, el potencial de la chaya para alimentación y salud humana tiene una implicación significativa para la planta como cultivo hortícola.

Los objetivos del estudio fueron evaluar la capacidad hipoglucemiante y antioxidante, así como el contenido fenólico de una infusión de hojas de chaya hidropónica producida bajo fertilización orgánica; además de determinar la toxicidad de dicha infusión.

skin blisters, tissue anoxia and lactic acidosis, as well as causing predisposition to the development of kidney and lung diseases (Salpeter *et al.*, 2003).

Thus, it is required the evaluation of pharmacological alternatives of natural origin to control hyperglycemia that do not pose a toxicological risk for diabetic patient. In Mexico have been traditionally consumed various plant tissues to alleged anti-diabetic properties, including fresh fruits of aguaymanto (*Physalis peruviana*) (Rodríguez *et al.*, 2007); leaves of rue (*Ruta graveolens* L.) (Figueroa-Valverde *et al.*, 2009) and Chaya (*Cnidocolus chayamansa*) (Pillai *et al.*, 2012). A major attributed to naturopathic medical treatments advantages is that they represent a minor toxicological risk for the patient compared to the administration or consumption of synthetic drugs (Rates, 2001), in addition to its nutraceutical contribution due to its content of phenolic compounds antioxidant (Drago *et al.*, 2006).

Moreover, one of the traditional ways of preparing plant derivatives in naturopathic treatments involves infusions or teas. However, there is limited information about the hypoglycemic properties infusions chaya, plus it has not been evaluated for their safety. Thus, the potential of chaya for human food and health has a significant implication for the plant and horticultural crop.

The study objectives were to evaluate the hypoglycemic and antioxidant capacity and phenolic content of an infusion of hydroponic chaya leaves produced under organic fertilization; and determination of the toxicity of the infusion.

## Materials and methods

Vegetative material. Chaya (*Cnidocolus chayamansa*) produced in the period from March to September 2013 in a greenhouse Institute of Technology of Torreón (Torreón, Coahuila) were used. The city is located at 24° 30' and 27° north latitude, and 102° 00' and 104° 30' west longitude; at an elevation of 1 120 m. The greenhouse is circular type with a layer of polyethylene plastic as cover, and has semi cooling. Chaya plants used in this study were obtained from cuttings of wild plants collected in Teapa, Tabasco. Plants

## Materiales y métodos

**Material vegetativo.** Se utilizaron hojas de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) producida en el periodo de marzo a septiembre del 2013 en un invernadero del Instituto Tecnológico de Torreón (Torreón, Coahuila). La ciudad está localizada a 24° 30' y 27° latitud norte, y 102° 00' y 104° 30' longitud oeste; y a una altitud de 1 120 m. El invernadero es tipo circular con una capa de polietileno plástico como cubierta, y cuenta con enfriamiento semiautomático. Las plantas de chaya utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas a partir de esquejes de plantas silvestres recolectadas en Teapa, Tabasco. Las plantas se desarrollaron en bolsas de polietileno negro de 20 L de capacidad (una planta por bolsa), las cuales contenían como sustrato una mezcla de arena de río y compost (80:20, v:v). La arena de río fue lavada y esterilizada con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. El compost fue preparado mediante compostaje de estiércol de bovino proporcionado por un establo de la localidad (Torreón, Coahuila). Las plantas fueron irrigadas manualmente con agua potable, aplicando un riego al día con un volumen total de 1 L por planta durante todo el periodo del estudio.

**Procesamiento de muestras experimentales.** El material vegetal utilizado en el estudio fueron hojas maduras de chaya, las cuales fueron recolectadas manualmente. Las hojas fueron lavadas con agua potable, dejándose escurrir el exceso de agua para luego ser puestas a secar a temperatura ambiente en un área cerrada y ventilada durante 15 días. Las hojas secas fueron luego molidas de forma manual utilizando mortero con pistilo, almacenando el polvo en frascos de vidrio a temperatura ambiente.

**Preparación de infusiones (extractos acuosos).** La infusión fue preparada mezclando 5 g de muestra seca en 100 ml de agua destilada estéril a 90 °C, manteniendo la solución a 90 °C por 10 min bajo constante agitación. La infusión fue posteriormente filtrada en papel filtro Whatman No. 4 de 110 mm, y el extracto filtrado fue almacenado a 5 °C hasta su administración y evaluación.

**Evaluación de capacidad hipoglucemiante de las infusiones (modelo *in vivo* con ratas Wistar).** Se evaluó la capacidad hipoglucemiante de las infusiones preparadas mediante un modelo *in vivo* usando ratas macho Wistar albinas con peso de 280-300 g. Las ratas utilizadas en el presente estudio se mantuvieron de acuerdo con directrices de la

were grown in black polyethylene bags 20 L capacity (one plant per bag), which contained as substrate a mixture of river sand and compost (80:20, v:v). River sand was washed and sterilized with a solution of sodium hypochlorite 5%. The compost was prepared by composting of cattle manure provided by a stable of the town (Torreón, Coahuila). The plants were irrigated with potable water manually, using a watering daily with a total volume of 1 L per plant throughout the study period.

**Processing of experimental samples.** The plant material used in the study were mature leaves of chaya, which were collected manually. The leaves were rinsed with potable water, left to drain excess water before being hung out to dry at room temperature in a closed and ventilated area for 15 days. The dried leaves were then ground manually using mortar with pistil, storing the powder in glass vials at room temperature.

**Preparing infusions (aqueous extracts).** The infusion was prepared mixing 5 g of dry sample in 100 ml of sterile distilled water at 90 °C, maintaining the solution at 90 °C for 10 min under constant stirring. The infusion was then filtered on Whatman No. 4 filter paper of 110 mm, and the filtered extract was stored at 5 °C until administration and evaluation.

**Hypoglycemic capacity assessment of the infusions (*In vivo* model with Wistar rats).** The hypoglycemic capacity of the infusions prepared by an *in vivo* model using male albino Wistar rats weighing 280-300 g were evaluated. The rats used in this study were maintained in accordance with guidelines of the Faculty of Medicine of the Autonomous University of Coahuila (Torreón, Coahuila, Mexico). The animals were initially submitted to an adaptation period of one week at a temperature of 23-24 °C with cycles of 12 h light-dark (light period from 8:00 am to 8:00 pm) and were fed with standard pellet diet and water ad libitum. After the adaptation period was induced diabetes to the rats using a dose (45 mg kg body weight) of streptozotocin in citrate buffer 0.1 M (pH 4.5) by intraperitoneal route, evaluating daily blood glucose concentration in rats induced with diabetes.

Finally, after 7 days of induction of diabetes were used in the experiment rats with blood glucose concentration 180-240 mg/dl. The rats were divided into 4 groups of 6 animals: nondiabetic (rats induced to diabetes), diabetic untreated (induced diabetes to rats not treated with hypoglycemic

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila (Torreón, Coahuila, México). Los animales fueron sometidos inicialmente a un periodo de adaptación de una semana a una temperatura de 23-24 °C con ciclos de 12 h de luz-oscuridad (periodo de luz de 8:00 am a 8:00 pm), y fueron alimentados con dieta estándar de pellets y agua *ad libitum*. Después del periodo de adaptación se indujo diabetes a las ratas mediante una dosis (45 mg kg de peso corporal) de estreptozotocina en buffer de citrato al 0.1 M (pH 4.5) por vía intra peritoneal, evaluando diariamente la concentración de glucosa en sangre en las ratas inducidas a diabetes.

Finalmente, después de 7 días de la inducción de diabetes fueron utilizadas en el experimento ratas con una concentración de glucosa en sangre de 180-240 mg/dl. Las ratas fueron distribuidas en 4 grupos de 6 animales: no diabéticas (ratas no inducidas a diabetes), diabéticas no tratadas (ratas inducidas a diabetes no tratadas con agentes hipoglicemiantes), diabéticas tratadas con glibenclamida (ratas diabéticas tratadas con glibenclamida a una dosis de 5 mg kg de peso corporal); y diabéticas tratadas con infusión de chaya. La infusión (extracto) y la glibenclamida fueron administradas a los grupos correspondientes diariamente en condiciones de ayuno por medio de una sonda vía intra gástrica por un periodo de 30 días. La concentración de glucosa en sangre fue evaluada los días 1, 8, 15, 23 y 30 de aplicación de tratamientos.

Evaluación de toxicidad de las infusiones (modelo *in vivo* con larvas de *Artemia salina*). Se evaluó la toxicidad de las infusiones preparadas mediante un modelo *in vivo* usando larvas de *Artemia salina*. Primeramente se colocaron los huevecillos de *A. salina* en agua de mar artificial para su propagación. El agua de mar artificial fue preparada mezclando 40 g de sal de mar (Instant Ocean United Pet Group, Blacksburg, VA, EU) y 0.006 g de levadura de cerveza (Mead Johnson, Coyoacán, Distrito Federal, México) en un litro de agua bidestilada, ajustando el pH a 7.8. Para la prueba fueron colocados 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (San Francisco Bay Brand, Inc., Nearn, CA, EU) en 100 ml de agua de mar artificial en un recipiente de plástico bajo oxigenación y protegido de la luz.

Los nauplios (larvas) que eclosionaron después de 48 horas fueron transferidos a una micro placa de 96 celdas, mezclando 100 µL de la suspensión de nauplios en cada celda con 100 µL de las diluciones de las infusiones a evaluar en un rango de 10 a 1 000 µg de muestra seca/mL de infusión. Las diluciones de las infusiones se hicieron usando agua

agents), diabetic treated with glibenclamide (diabetic rats treated with glibenclamide at a dose of 5 mg kg body weight); and diabetic treated with infusion of chaya. Infusion (extract) and glibenclamide were given to the respective groups under fasting daily by gavage intragastric route for a period of 30 days. The blood glucose concentration was evaluated on days 1, 8, 15, 23 and 30 of treatment application.

Toxicity evaluation of the infusions (*in vivo* model with larvae *Artemia salina*). Infusions' toxicity prepared by using an *in vivo* model with larvae *Artemia salina* was evaluated. A. First the eggs were placed salt in artificial seawater for propagation. The artificial seawater was prepared by mixing 40 g of sea salt (Instant Ocean United Pet Group, Blacksburg, VA, USA) and 0.006 g of yeast (Mead Johnson, Coyoacán, Mexico City, Mexico) in one liter of bidistilled water, adjusting the pH to 7.8. For the test were placed 0.1 g of eggs of *A. salina* (San Francisco Bay Brand, Inc., Nearn, CA, USA) in 100 ml of artificial seawater in a plastic container under oxygenation and protected from light.

Nauplii (larvae) which hatched after 48 hours were transferred to a microplate 96 cells, mixing 100 mL of the suspension of nauplii in each cell with 100 mL of the dilutions of the infusions to evaluate a range of 10 to 1 000 g of dry matter/mL sample infusion. Infusions dilutions were made using sea water as a solvent were used and a solution of potassium dichromate (400 ppm) as a positive control, and sea water as negative control.

### Laboratory tests

The analytical tests were: hypoglycemic capacity (quantification of blood glucose), nutraceutical quality (total phenolic content and antioxidant capacity), and toxicity (mortality test larvae *Artemia salina*) of the prepared infusions and weight rats.

Total phenolic content. The total phenolic content was measured using a modified Folin-Ciocalteu method (Esparza Rivera *et al.*, 2006). 30 ul of sample with 270 ul of distilled water were mixed in a test tube and to this solution were added 1.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted (1:15), vortexing for 10 s. After 5 minutes 1.2 ml of sodium carbonate (7.5% w/v) and stirred for 10 seconds were added. The solution was placed in water bath at 45 °C for 15 min, and then allowed to cool to room temperature. The absorbance of the solution was read at 765

de mar como solvente, y fueron utilizados una solución de dicromato de potasio (400 ppm) como control positivo, y agua de mar como control negativo.

### Pruebas analíticas

Las pruebas analíticas realizadas fueron: capacidad hipoglicémica (cuantificación de glucosa en sangre), calidad nutracéutica (contenido fenólico total y capacidad antioxidante), y toxicidad (prueba de mortandad de larvas de *Artemia salina*) de las infusiones preparadas, así como peso de las ratas.

**Contenido fenólico total.** El contenido fenólico total se midió usando una modificación del método Folin-Ciocalteu (Esparza Rivera *et al.*, 2006). Se mezclaron 30  $\mu$ l de muestra con 270  $\mu$ l de agua destilada en un tubo de ensayo, y a esta solución se le agregaron 1.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU) diluido (1:15), agitando en vórtex durante 10 s. Después de 5 minutos se añadieron 1.2 ml de carbonato de sodio (7.5% p/v) agitándose durante 10 segundos. La solución fue colocada en baño maría a 45 °C por 15 min, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución fue leída a 765 nm. El contenido fenólico se calculó mediante una curva patrón usando ácido gálico (Sigma, St. Louis, MO, EU) como estándar, y los resultados se reportaron en mg de ácido gálico equivalente por g de muestra base seca (mg equiv AG/g BS). Los análisis se realizaron por triplicado.

**Capacidad antioxidante.** La capacidad antioxidante fue determinada por los métodos de ABTS<sup>+</sup> y DPPH<sup>+</sup>, los resultados se reportaron en mM equivalente de Trolox por g de muestra BS.

**Capacidad antioxidante equivalente en Trolox (método DPPH<sup>+</sup>).** La capacidad antioxidante se evaluó de acuerdo al método *in vitro* DPPH<sup>+</sup> usando una modificación del método publicado por Brand-Williams (1995). Se preparó una solución de DPPH<sup>+</sup> (Aldrich, St. Louis, MO, EU) en metanol, ajustando la absorbancia de la solución a  $1\ 100 \pm 0.01$  a una longitud de onda de 515 nm. Para la determinación de capacidad antioxidante se mezclaron 50  $\mu$ l de muestra y 950  $\mu$ l de solución DPPH<sup>+</sup>, y después de 3 min de reacción se leyó la absorbancia de la mezcla a 515 nm. Se preparó una curva estándar con Trolox (Aldrich, St. Louis, MO, EU), y los resultados se reportaron como capacidad antioxidante equivalente en mM equivalente en Trolox por g base seca (mM equiv Trolox/gm BS). Los análisis se realizaron por triplicado.

nm. Phenolic content was calculated by a standard curve using gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) as standard, and the results were reported in mg of gallic acid equivalent per g dry basis sample (mg equiv AG/g BS). Analyses were performed in triplicate.

**Antioxidant.** The antioxidant capacity was determined by the methods of ABTS<sup>+</sup> and DPPH<sup>+</sup> the results were reported in mM equivalent of Trolox per g sample BS.

**Trolox equivalent antioxidant capacity (DPPH<sup>+</sup> method).** The antioxidant capacity was assessed according to *in vitro* DPPH<sup>+</sup> method using a modification of the method published by Brand-Williams (1995). DPPH<sup>+</sup> solution (Aldrich, St. Louis, MO, USA) in methanol was prepared by adjusting the absorbance of the solution to  $1\ 100 \pm 0.01$  to a wavelength of 515 nm. For the determination of antioxidant capacity of 50  $\mu$ l sample and 950  $\mu$ l of DPPH<sup>+</sup> mixed solution, and after 3 min of the reaction mixture absorbance was read at 515 nm. A standard curve with Trolox (Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared, and the results are reported as equivalent antioxidant capacity mM Trolox equivalent per g dry basis (mM Trolox eq/gm BS). Analyses were performed in triplicate.

**Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS<sup>+</sup> method).** The Trolox equivalent antioxidant capacity was evaluated *in vitro* according to the method published by ABTS<sup>+</sup> Esparza Rivera *et al.* (2006). ABTS<sup>+</sup> solution with 40 mg of ABTS<sup>+</sup> (Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and 1.5 g of manganese dioxide Fermont, Nuevo León, Mexico) was prepared in 15 ml of distilled water. The mixture was shaken vigorously and allowed to stand covered for 20 min. Then, the solution was filtered on Whatman 40 paper (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and the absorbance was adjusted to  $0.7 \pm 0.01$  at a wavelength of 734 nm using phosphate buffer solution of 5 mM. For the determination of antioxidant capacity and 100  $\mu$ l sample 1 ml of ABTS<sup>+</sup> solution were mixed, and after 60 and 90 seconds of reaction the sample absorbance at 734 nm was read. A standard curve with Trolox (Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared, and the results are reported as equivalent antioxidant capacity mM Trolox equivalent per g fresh base (mM Trolox eq gm<sup>-1</sup> BF). Analyses were performed in triplicate.

**Quantification of blood glucose.** Blood samples evaluated during the experiment (days 1, 8, 15 and 23 treatments application) were obtained from the tail of the rat tail after an

Capacidad antioxidante equivalente en Trolox (método ABTS<sup>+</sup>). La capacidad antioxidante equivalente en Trolox se evaluó de acuerdo al método *in vitro* ABTS<sup>+</sup> publicado por Esparza Rivera *et al.* (2006). Se preparó una solución de ABTS<sup>+</sup> con 40 mg de ABTS (Aldrich, St. Louis, Missouri, EU) y 1.5 g de dióxido de manganeso (Fermont, Nuevo León, México) en 15 ml de agua destilada. La mezcla fue agitada vigorosamente y se dejó reposar cubierta durante 20 min. Luego, la solución se filtró en papel Whatman 40 (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), y la absorbancia se ajustó a  $0.7 \pm 0.01$  a una longitud de onda de 734 nm utilizando solución buffer de fosfato 5 mM. Para la determinación de capacidad antioxidante se mezclaron 100  $\mu$ l de muestra y 1 ml de solución ABTS<sup>+</sup>, y después de 60 y 90 segundos de reacción se leyó la absorbancia de la muestra a 734 nm. Se preparó una curva estándar con Trolox (Aldrich, St. Louis, MO, EU), y los resultados se reportaron como capacidad antioxidante equivalente en mM equivalente en Trolox por g base fresca (mM equiv Trolox  $\cdot$  gm<sup>-1</sup> BF). Los análisis se realizaron por triplicado.

Cuantificación de glucosa en sangre. Las muestras sanguíneas evaluadas durante el experimento (días 1, 8, 15 y 23 de aplicación de tratamientos) fueron obtenidas de la vena caudal de la cola de la rata después de un previo ayuno de 8 horas. Asimismo, la obtención de las muestras finales (día 30) se realizó mediante una punción cardiaca. Se obtuvo el suero de las muestras, y se determinó la concentración de glucosa mediante el kit Accu Check (Roche Diagnostics, Indianapolis, IND, EU), reportándose en mg de glucosa/dl de sangre.

Peso de las ratas. El peso de las ratas fue determinado antes de la aplicación de tratamientos así como los días 1, 8, 15, 23 y 30 de aplicación de tratamientos.

Prueba de mortandad de larvas de *Artemia salina*. La evaluación de toxicidad del extracto se realizó mediante el conteo de nauplios vivos y muertos por dosis después de 24 h con ayuda de un microscopio estereoscópico. La determinación de DL<sub>50</sub> de la infusión evaluada fue realizada usando el método citado por Lagarto *et al.* (2001).

Análisis estadístico de datos. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza con el programa SAS (2005) y las comparaciones de medias fueron determinadas mediante una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

8-hour fast prior vein. Furthermore, obtaining final samples (day 30) was performed by cardiac puncture. Serum samples was obtained, and glucose concentration was determined by Accu Check kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IND, EU), reporting in mg glucose/dl of blood.

Rat weight. The weight of rats was determined before application of treatment and on days 1, 8, 15, 23 and 30 of treatment application.

Test larval mortality *Artemia salina*. Evaluation of toxicity of the extract was performed by counting living and dead nauplii per dose after 24 h using a stereoscopic microscope. Determining the LD<sub>50</sub> was evaluated infusion made using the method cited by Lagarto *et al.* (2001).

Statistical data analysis. The results were evaluated through an analysis of variance with SAS (2005) program and the comparison of means were determined by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

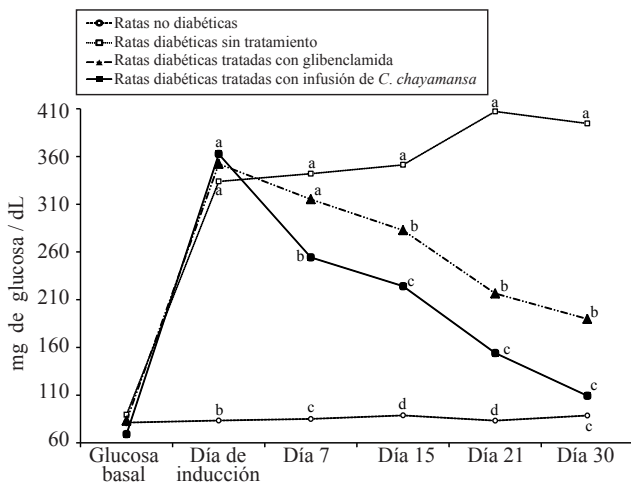
## Results and discussion

Hypoglycemic capacity of the infusions. The consumption of leaf infusion organic chaya reduced glucose levels of diabetic rats (Figure 1), having a higher hypoglycemic effect than the application of glibenclamide (5 mg kg<sup>-1</sup>). These results agree with those reported by García-Cervera *et al.*, (2012) and Figueroa-Valverde *et al.*, (2009), who reported that, the application of ethanol extracts of *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh caused a decrease in the high levels of blood glucose in experimental models *in vivo*. The hypoglycemic effect of the evaluated infusion may be attributed to its content of catechin and rutin (Figure 2), which are compounds reported in other *in vivo* studies (Lima *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Seron and Furlan, 2010; Fuentes *et al.*, 2013) as hypoglycemic agents..

Weight changes in rats. The weight of diabetic rats (treated and untreated) decreased during the experiment, whereas nondiabetic rats presented an increase (Figure 3). However, the weight loss at day 30 compared to start of the experiment was 31.4%, whereas in diabetic rats treated with infusion of chaya or glyburide was 10.7 and 16.8% respectively. These results are similar to those presented by Figueroa-

## Resultados y discusión

Capacidad hipoglucemiante de las infusiones. El consumo de la infusión de hoja de chaya orgánica redujo los niveles de glucosa de las ratas diabéticas (Figura 1), teniendo un mayor efecto hipoglicemiante que la aplicación de glibenclamida ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Estos resultados coinciden con los publicados por García-Cervera *et al.* (2012), y Figueroa-Valverde *et al.* (2009), quienes reportaron que la aplicación de extractos etanólicos de *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh causo una disminución de los niveles elevados de glucosa en sangre en experimentos con modelos *in vivo*. El efecto hipoglicemiante de la infusión evaluada puede ser atribuido a su contenido de catequina y rutina (Figura 2), los cuales son compuestos reportados en otros estudios *in vivo* (Lima *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Seron y Furlan, 2010; Fuentes *et al.*, 2013) como agentes hipoglucemiantes.

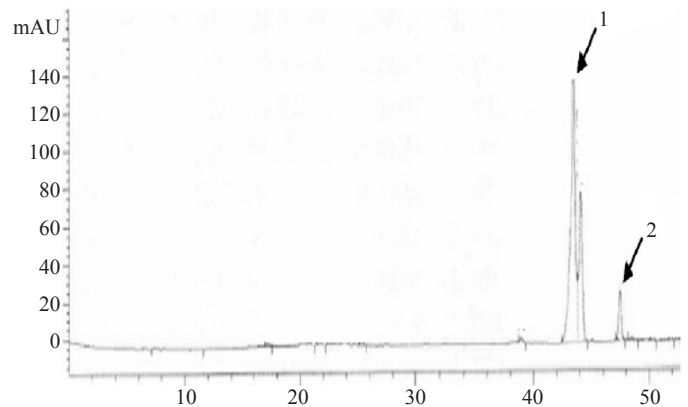


**Figura 1. Resultados de la cuantificación de glucosa en sangre de ratas diabéticas tratadas con infusiones de hojas de *C. chayamansa* hidropónica orgánica; con glibenclamida, y no tratadas. Puntos en el mismo día de evaluación con distinta letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).**

**Figure 1. Quantification of blood glucose of diabetic rats treated with leaf tea *Organic hydroponics C. chayamansa*; glyburide, and untreated. Points on the same day evaluation with different letters are statistically different ( $p < 0.05$ ).**

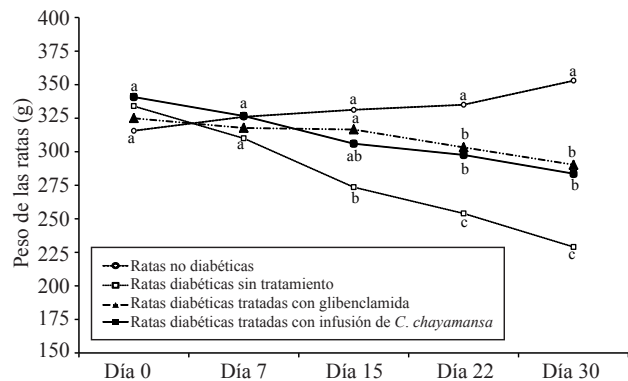
Cambios de peso de las ratas. El peso de las ratas diabéticas (tratadas y no tratadas) disminuyó durante el experimento, mientras que en las ratas no diabéticas presento un aumento (Figura 3). Sin embargo, la pérdida de peso al día 30 en comparación al inicio del experimento fue de 31.4%,

Valverde *et al.* (2009), who reported weight loss in diabetic rats treated with extracts of *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh and *Citrus aurantium* L. some researchers have reported about the properties chaya diuretic (Andrade-Cetto *et al.*, 2006), which could be associated with weight loss was observed in diabetic rats treated with the infusion of leaves of this plant.



**Figura 2. Cromatograma de la determinación de compuestos fitoquímicos en la infusión de hojas de chaya. Pico 1= quercetina; pico; y 2= rutina.**

**Figure 2. Chromatogram of determining phytochemicals in chaya infusion. Peak 1= quercetin; peak; y 2= routine.**



**Figura 3. Peso de ratas diabéticas tratadas con infusiones de hojas de *C. chayamansa* hidropónica orgánica; con glibenclamida, y no tratadas. Puntos en el mismo día de evaluación con distinta letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).**

**Figure 3. Weight of diabetic rats treated with leaf tea of organic hydroponics of *C. chayamansa*; glyburide, and untreated. Points on the same day evaluation with different letters are statistically different ( $p < 0.05$ ).**

Nutraceutical quality of the infusion. The phenolic content obtained in this study was 6.34 mg equiv. ac. gallic/ml in the infusion of leaves of hydroponic organic of chaya. These results were lower than those obtained by Gutiérrez-



mientras que en las ratas diabéticas tratadas con la infusión de hojas de chaya o con glibenclamida fue de 10.7 y 16.8% respectivamente. Estos resultados son similares a los presentados por Figueroa-Valverde *et al.* (2009), quienes reportaron disminución de peso en ratas diabéticas tratadas con extractos de *Cnidocolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. Algunos investigadores han reportado acerca de las propiedades diuréticas de la chaya (Andrade-Cetto *et al.*, 2006), lo cual pudiera ser asociado con la pérdida de peso que se observó en las ratas diabéticas tratadas con la infusión de hojas de esta planta.

Calidad nutraceutica de la infusión. El contenido fenólico obtenido en el presente estudio fue de 6.34 mg equiv. de ácido gálico/ml en la infusión de hojas de chaya orgánica hidropónica. Estos resultados fueron menores a los obtenidos por Gutiérrez-Zavala *et al.* (2007) y Loarca-Piña *et al.* (2010), quienes reportaron un contenido fenólico de  $71.3 \pm 1.7$  mg equiv. ácido gálico/gm BS en extractos hexanoicos y acetónicos de chaya. Con respecto a la evaluación de la capacidad antioxidante de la infusión evaluada, se obtuvo un valor de 5.9 mM equiv. de Trolox/ml de té de hoja de chaya. Estos resultados difieren de los reportados por Gutiérrez-Zavala *et al.* (2007), Loarca-Piña *et al.* (2010) y Mercado-Mercado *et al.* (2013), quienes obtuvieron una mayor capacidad antioxidante (14.5 mM equiv. de Trolox/gr BS) en extractos hexanoicos y acetónicos de chaya.

Las diferencias en estos resultados son atribuidas a la composición específica de los materiales vegetales usados en los estudios y al tipo de solvente utilizado para la obtención de extractos. Asimismo, la capacidad antioxidante de la infusión de hojas de chaya fue asociada con su contenido de fitoquímicos como la catequina y rutina, los cuales han sido reportados como compuestos con propiedades antioxidantes (Fuentes *et al.*, 2013).

Evaluación de toxicidad de la infusión. La evaluación de toxicidad comprobó que la infusión de hojas de chaya orgánica en el presente estudio es segura para ser consumida. Un extracto es considerado como tóxico cuando su dosis letal media (DL<sub>50</sub>) es menor de 200 µg/mL (Lagarto *et al.*, 2001), mientras que extractos con DL<sub>50</sub> entre 200-1 000 µg/mL son reportados como extractos activos no tóxicos. Por otra parte, un extracto cuya DL<sub>50</sub> es mayor de 1 000 µg/mL es reportado como no tóxico y seguro para su consumo. La infusión de hojas de chaya tuvo una DL<sub>50</sub> de 1070.42 µg/mL, por lo cual puede ser considerada como no tóxica y segura para su consumo como potencial agente terapéutico en el tratamiento de la diabetes *mellitus*.

Zavala *et al.* (2007) and Loarca-Piña *et al.* (2010), who reported a phenolic content of  $71.3 \pm 1.7$  mg equiv. ac. gallic/gm BS in hexanoicos from acetone extracts and Chaya. Regarding the evaluation of the antioxidant capacity of the infusions, a value of 5.9 mM obtained equiv. Trolox/ml of chaya leaf tea. These results differ from those reported by Gutiérrez-Zavala *et al.* (2007), Loarca-Piña *et al.* (2010) and Mercado-Mercado *et al.* (2013), who obtained a higher antioxidant capacity (14.5 mM equiv. Of Trolox/gr BS) in hexanoicos from acetone extracts and Chaya.

The differences in these results are attributed to the specific composition of plant materials used in the studies and the type of solvent used for obtaining extracts. Also, the antioxidant capacity of chaya infusion was associated with the content of phytochemicals such as catechin and routine, which have been reported as compounds with antioxidant properties (Fuentes *et al.*, 2013).

Toxicity evaluation of the infusion. Toxicity assessment found that leaf tea of organic chaya in this study is safe for consumption. An extract is considered toxic when its median lethal dose (LD 50) is less than 200 mg/mL (Lagarto *et al.*, 2001), while extracts with DL 50 between 200-1 000 mg/mL are reported as non-active extracts toxic. An extract with LD50 is higher than 1 000 mg/mL is reported as a nontoxic and safe for consumption. The chaya leaf tea had an LD50 of 1070.42 mg/mL, and therefore can be considered as non-toxic and safe for consumption as a potential therapeutic agent in the treatment of diabetes, "mellitus".

## Conclusions

The consumption of tea leaves made with hydroponic organic of chaya had higher hypoglycemic effect in diabetic rats than glibenclamide, which is attributed to the content of phytochemicals hypoglycemic agents in the infusion, including catechin and rutin. Furthermore, infusion of leaves of chaya can be considered as non-toxic and safe for consumption as potential hypoglycemic agent.

*End of the English version*



## Conclusiones

El consumo de la infusión de hojas de chaya orgánica hidropónica tuvo mayor efecto hipoglicemiante en las ratas diabéticas que la glibenclamida, lo cual es atribuido al contenido de agentes fitoquímicos hipoglicemiantes en la infusión, incluyendo catequina y rutina. Además, la infusión de hojas de chaya puede ser considerada como no tóxica y segura para su consumo como potencial agente hipoglicemiante.

## Agradecimientos

Los autores(as) agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), para la realización de los estudios doctorales del autor Valenzuela Soto, y también agradecen al Instituto Tecnológico de Torreón por la aportación de materiales y asistencia técnica.

## Literatura citada

- Andrade-Cetto, A.; Becerra-Jiménez, J.; Martínez-Zurita, E.; Ortega-Larrocea, P. and Heinrich, M. 2006. Disease-consensus index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán. *J. Ethnopharmacol.* 107:199-204.
- Brand-Williams, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenm Wiss Technol.* 28:25-30.
- Calderín Bouza, R. O.; Prieto Valdés, M. y Cabrera Rode, E. 2007. Síndrome de insulinoresistencia en niños y adolescentes. *Rev. Cubana de Endocrinología.* 18(2):1-4
- Castro-Juárez C. J.; Villa-Ruano, N.; Ramírez-García; S. A. y Mosso-González, C. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales.* 19(1):101-120.
- De Fronzo, R. A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. N. Am.* 88(4):787-835.
- Drago, S. M. E.; López, L. M. y Sainz, E. R. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev. Mex. Cienc. Farmac.* 37:58-68.
- Esparza-Rivera, J. R.; Stone, M. B.; Stushnoff, C.; Pilon-Smith, E. y Kendall, P. A. 2006. Effects of Ascorbic acid applied by two hydrocooling methods on physical and chemical properties of green leaf lettuce stored at 5 °C. *J. Food Sci.* 71:S270-S276.
- Fernandes, A. A.; Novelli, E. L.; Okoshi, K.; Okoshi, M. P.; Di Muzio, B. P.; Guimarães, J. F. y Fernandes, A. 2010. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed Pharmacother.* 64:214-219.
- Figuroa-Valverde, L.; Díaz-Cedillo, F.; Camacho-Luis, A. y López, M. R. 2009. Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidocolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacil glicéridos en un modelo de rata diabética. *Braz. J. Pharmacog.* 19(4):898-907.
- Fuentes, O.; Fuentes, M.; Badilla, S. y Troncoso, F. 2013. Maqui (*Aristotelia chilensis*) and rutin (quercetin-3-O-rutinoside) protects against the functional impairment of the endothelium-dependent vasorelaxation caused by a reduction of nitric oxide availability in diabetes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 12(3):220-229.
- García-Cervera, E.; Figuroa-Valverde, L.; Díaz-Cedillo, F.; Pool-Gómez, E.; Torrez-Cutz, R. y Martínez-Camacho, R. 2012. Activity induced by *Jatropha gauerion* on glucose concentration in a rat diabetic model. *Afr. J. Pharmacy Pharmacol.* 6(34):2536-2543.
- Gutiérrez-Zavala, A.; Ledesma-Rivero, L.; García-García, I. y Grajales-Cartillejos, O. 2007. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Rev. Cubana de Salud Pública.* 33(1):1-7.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2012. Base de datos de defunciones 1990-2011. INEGI/Secretaría de Salud. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol\\_diabetes/dm2\\_bol1\\_2013.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_diabetes/dm2_bol1_2013.pdf).
- Kuti, J. O. y Torres, E. S. 1996. Potential nutritional and health benefits of tree spinach. *In: Janick, J. (Ed.). Progress in new crops.* ASHS Press, Arlington, Virginia, EU. 516-520 pp.
- Lagarto, P. A.; Silva, Y. R.; Guerra, S. I. and Iglesias, B. L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* 8(5):395-400.
- Lima, J. D.; Mazzafera, P.; Da Silva Moraes, W. y Da Silva, R. B. 2009. Cha: aspectos relacionados a qualidade e perspectivas. *Cienc. Rural.* 39(4):1258-1266.
- Loarca-Piña, G.; Mendoza, S.; Ramos-Gómez, M. and Reynoso, R. 2010. Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh. *J. Food Sci.* 72(2):H68-H72.
- Mercado-Mercado, G.; De la Rosa, L. C.; Wall-Medrano, A.; López Díaz, J. A. y Álvarez-Parrilla, E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutr. Hosp.* 28(1):36-46.
- Olmedo; V. H.; Olmedo-Canchola, Enters-Altés, J.; Del Ángel-Cruz, R. E. y Rosas-Heredia, M. L. 2013. Ensayo clínico para evaluar la efectividad de una combinación fija de glimepirida y metformina en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Interna de México.* 29:159-163.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2012. Diabetes. Nota descriptiva N° 312. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. <http://www.insp.mx/avisos/2572-prevencion-y-tratamiento-de-diabetes-mellitus-tipo-2-590.html>.
- Pavlovic, M. y Carvajal, C. J. 2013. Hipoglicemiantes orales para el tratamiento de la diabetes mellitus gestacional. *Rev. Chilena de Obstetricia y Ginecología.* 78(3):167-178.

- Pillai, K. K.; Narayanan, N.; Chidambaranathan, N.; Mohamed Halith, M. and Jayaprakash, S. 2012. Antitumor activity of ethanolic extract of *Cnidocolus chayamansa* Mcvaugh against dalton's ascitic lymphoma in mice. *Int. J. Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 4(4):647-652.
- Rates, S. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 39:603-613.
- Rodríguez, U.; Sheila, L. y Erika, M. 2007. Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. *Rev. Médica Vallejana.* 4(1):43-53.
- Ross-Ibarra, J. and Molina-Cruz, A. 2002. The ethnobotany of chaya. *Econ. Bot.* 56(4):350-365.
- SAS. 2005. SAS/STAT User's Guide, version 8, 4ta. Edición Vol. 1 y 2. SAS Institute Inc., Cary, N.C., E.U.
- Salpeter, S.; Greyber, E.; Pasternak, G. and Salpeter, E. 2003. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Arch. Int. Med.* 163:2594-2602.
- Seron, V. D. y Furlan, M. M. D. 2010. Papel do Chá verde e seus componentes no tratamento do Diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Saúde e Pesquisa.* 3(3):379-383.