



**Universidad del Azuay**

**Facultad de Ciencia y Tecnología**

**Escuela de Ingeniería en Alimentos**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE LAS ENZIMAS  
 $\alpha$  Y  $\beta$  GLUCOSIDASA EN ALGUNOS FRUTOS NATIVOS DEL  
ECUADOR**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de  
Ingeniero en Alimentos**

**Autor:**

**Andrés Santiago Moncayo Loor**

**Directora:**

**María Elena Cazar Ramírez**

**Cuenca, Ecuador**

**2014**

## DEDICATORIA

Ante todo, quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios por haber estado a mi lado durante los momentos más difíciles de mi vida, por ser mi guía en el camino del éxito y bendecirme en cada una de mis actividades. A mis padres y hermana por creer en mí, por toda su confianza y el gran apoyo incondicional brindado durante todos estos años de estudio, que me llevaron a ser un profesional con ética.

A mi directora de tesis, Dra. María Elena Cazar Ramírez, quien merece todo mi cariño, admiración y gratitud; pues fue la persona que mostró todo su apoyo incondicional para que este trabajo de investigación finalizara con éxito.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología.  
Escuela de Ingeniería en Alimentos por darme la oportunidad  
de formarme profesionalmente.

Además un agradecimiento especial a la Dra. María Elena  
Cazar Ramírez por la confianza  
depositada sobre mí, por darme todo su apoyo  
como directora y en especial como amiga, esforzándome y  
mejorando cada día más como persona y como profesional, y por haberme  
guiado en el camino correcto.

De igual manera mis más sinceros agradecimientos al  
Dr. Piercósimo Tripaldi por aportar con  
sus conocimientos para la elaboración  
de éste trabajo de investigación y por su colaboración con algunos  
materiales y equipos de laboratorio.

Finalmente agradezco a Dios; el ser supremo que nunca me  
abandona, por darme la fuerza, sabiduría  
y paciencia para la realización de este trabajo, quien me ha permitido lograr metas  
maravillosas en mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de Contenidos.....	iv
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Acrónimos.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
 INTRODUCCIÓN.....	 1
 <b>CAPÍTULO I: DIABETES MELLITUS</b>	
Introducción.....	5
1.1 Diabetes Mellitus.....	5
1.1.1 Tratamiento.....	7
1.1.2 La diabetes tipo 1.....	10
1.1.3 La diabetes tipo 2.....	11
1.2 Enzimas involucradas en el mecanismo de la diabetes.....	13
1.2.1 Enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	14
1.2.2 Enzima $\beta$ -glucosidasa.....	15
 <b>CAPÍTULO II: DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO</b>	
Introducción.....	17
2.1 <i>Macleania rupestris</i> .....	17
2.1.1 Taxonomía.....	17
2.1.2 Características.....	18
2.1.3 Aplicaciones.....	19
2.2 <i>Vaccinium floribundum</i> .....	20
2.2.1 Taxonomía.....	20

2.2.2	Características.....	20
2.2.3	Aplicaciones.....	22
2.3	<i>Physalis peruviana</i> L.....	23
2.3.1	Taxonomía.....	23
2.3.2	Características.....	23
2.3.3	Aplicaciones.....	25
2.4	<i>Spondias purpúrea</i> L.....	25
2.4.1	Taxonomía.....	25
2.4.2	Características.....	26
2.4.3	Aplicaciones.....	27

### CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

Introducción.....	28	
3.1	Recolección de frutas incluidas en el estudio.....	28
3.1.1	Área de recolección.....	29
3.1.2	Ubicación geográfica de los frutos recolectados.....	29
3.2	Selección y preparación de las muestras.....	30
3.3	Obtención de extractos acuosos.....	31
3.3.1	Materiales, reactivos y equipos.....	31
3.3.2	Procedimiento.....	32
3.4	Obtención de extractos alcohólicos.....	34
3.4.1	Materiales, reactivos y equipos.....	34
3.4.2	Procedimiento.....	35
3.5	Ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas $\alpha$ y $\beta$ glucosidasa...	37
3.5.1	Ensayos de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa.....	37
3.5.1.1	Principio.....	37
3.5.1.2	Condiciones.....	37
3.5.1.3	Materiales, reactivos y equipos.....	37
3.5.1.4	Procedimiento.....	38
3.5.1.4.1	Preparación de reactivos.....	40
3.5.1.4.2	Preparación de diluciones.....	40
3.5.1.5	Cálculo del % inhibición para los ensayos espectrofotométricos de $\alpha$ -glucosidasa.....	41

3.5.2	Ensayo de inhibición de $\beta$ -glucosidasa.....	41
3.5.2.1	Principio.....	41
3.5.2.2	Condiciones.....	42
3.5.2.3	Materiales, reactivos y equipos.....	42
3.5.2.4	Procedimiento.....	43
3.5.2.4.1	Preparación de reactivos.....	44
3.5.2.5	Cálculo del % inhibición para los ensayos espectrofotométricos de $\beta$ -glucosidasa.....	44
3.6	Evaluación del potencial de los frutos en estudio.....	45
3.7	Elaboración y evaluación del producto alimenticio.....	45
3.7.1	Procedimiento para elaboración del producto alimenticio..	46
3.7.2	Procedimiento para evaluación inhibitoria del producto alimenticio.....	47
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>		
	Introducción.....	49
4.1	Rendimiento de los frutos en extractos alcohólicos (etanol).....	49
4.2	Ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas $\alpha$ y $\beta$ glucosidasa..	50
4.2.1	Ensayos de $\alpha$ -glucosidasa.....	50
4.2.2	Ensayos de $\beta$ -glucosidasa.....	50
4.3	Evaluación del potencial de los frutos en estudio.....	51
4.4	Evaluación del producto alimenticio.....	51
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>		
	Introducción.....	52
5.1	Discusión.....	52
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	55
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	56
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.....	6
Tabla 2:	Uso de hipoglicemiantes o antidiabéticos orales.....	10
Tabla 3:	Clasificación taxonómica de <i>M. rupestris</i> .....	18
Tabla 4:	Clasificación taxonómica de <i>V. floribundum</i> .....	20
Tabla 5:	Clasificación taxonómica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	23
Tabla 6:	Clasificación taxonómica de <i>Spondias purpúrea</i> L.....	26
Tabla 7:	Lugares de recolección de los frutos en estudio.....	29
Tabla 8:	Materiales, reactivos y equipos utilizados en la obtención de los extractos acuosos.....	32
Tabla 9:	Materiales, reactivos y equipos utilizados en la obtención de los extractos alcohólicos.....	34
Tabla 10:	Materiales, reactivos y equipos utilizados en los ensayos de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....	38
Tabla 11:	Esquema para la determinación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa.....	39
Tabla 12:	Materiales, reactivos y equipos utilizados en los ensayos de inhibición de $\beta$ -glucosidasa .....	42
Tabla 13:	Temperaturas y tiempos de tratamiento térmico.....	45
Tabla 14:	Rendimiento de los frutos en extractos alcohólicos.....	49
Tabla 15:	Inhibición $\alpha$ -glucosidasa.....	50
Tabla 16:	Inhibición $\beta$ -glucosidasa.....	50
Tabla 17:	Inhibición $\beta$ -glucosidasa del producto alimenticio.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Macleania rupestris</i> (flor).....	17
Figura 2:	<i>Macleania rupestris</i> (fruto).....	17
Figura 3:	<i>Vaccinium floribundum</i> (flor).....	20
Figura 4:	<i>Vaccinium floribundum</i> (fruto).....	20
Figura 5:	<i>Physalis peruviana</i> L. (flor).....	23
Figura 6:	<i>Physalis peruviana</i> L. (fruto).....	23
Figura 7:	<i>Spondias purpúrea</i> L. (flor).....	25
Figura 8:	<i>Spondias purpúrea</i> L. (fruto).....	25
Figura 9:	Mapa ecológico de los frutos recolectados.....	30
Figura 10:	Frutos de joyapa.....	30
Figura 11:	Frutos de mortiño.....	30
Figura 12:	Frutos de uvilla.....	31
Figura 13:	Frutos de ciruelo.....	31
Figura 14:	Procedimiento de los ensayos de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa.....	39
Figura 15:	Procedimiento de los ensayos de inhibición de $\beta$ -glucosidasa.....	43

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

! Abreviatura	Término
OMS	Organización Mundial de la Salud
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CTEV	Cambios terapéuticos en el estilo de vida
GDM	Diabetes mellitus gestacional
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
kD	kiloDalton
PP	Polipéptido pancreático
U/kg	Unidades por kilogramo
g	gramos
$\mu$ l	microlitros
mg/día	miligramo por día
$\mu$ g/ml	microgramo por mililitro
mg/ml	miligramo por mililitro
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria máxima media o la concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática total
$\mu$ M	microMolar
GAA	Enzima codificada genéticamente
HCN	Ácido cianhídrico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y fármacos)
USDA	El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
PNP-G	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucosidasa, Sigma Prod. No. N1377
PBS	Solución buffer de Fosfato de Potasio
NaOH	Hidróxido de Sodio
HCl	Ácido Clorhídrico
TRIS	Hidroximetil amino metano

<b>! Abreviatura</b>	<b>Término</b>
DMSO	dimetilsulfóxido
Tween 20	Polisorbato
SDS	dodecilsulfato sódico
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na	Acetato de Sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio
UV-Vis	Ultravioleta visible
M	Molar
mM	miliMolar
H <sub>2</sub> O	Agua
U.I.	Unidad Internacional de medida
rpm	revoluciones por minuto
CEE	Comunidad Económica Europea
V <sub>1</sub> y V <sub>2</sub>	Volumen 1 y 2
C <sub>1</sub> y C <sub>2</sub>	Concentración 1 y 2
% Inh	Porcentaje de inhibición de la enzima
Conc.	Concentración del extracto
ppm	partes por millón
m.s.n.m	metros sobre el nivel del mar
°C	Grados centígrados
nm	nanómetros
λ	lambda; se utiliza para expresar el nivel de absorbancia requerida.
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una solución (Potencial de hidrógeno); es decir la cantidad de hidrógeno que existe en una solución

Moncayo L  
07/01/14

## Evaluación del potencial inhibidor de las enzimas $\alpha$ y $\beta$ glucosidasa en algunos frutos nativos del Ecuador

### RESUMEN

La tendencia actual sobre el consumo de productos de origen vegetal y el papel que toman los alimentos como protectores de la diabetes; se ha encaminado a evaluar la actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa en los frutos nativos incluidos en el estudio mediante un ensayo de inhibición enzimática. Se estandarizaron dos técnicas "in vitro" para evaluar el potencial de frutos como inhibidores de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa. Además, se desarrolló un producto alimenticio (jugo de frutas) mediante tratamientos térmicos en base al fruto con mayor inhibición de las enzimas en estudio. Los resultados obtenidos permitieron caracterizar a los frutos de joyapa, mortiño y uvilla como inhibidores de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa. El fruto de mortiño fue evaluado como materia prima para el desarrollo de jugos pasteurizados. El tratamiento térmico a 60°C x 30 min. incrementó la actividad enzimática en comparación al fruto fresco.

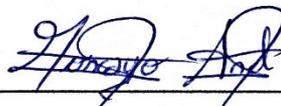
**Palabras clave:**  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, diabetes, joyapa, mortiño, uvilla.



Ing. Fausto Tobías Parra Parra  
Director de Escuela



Dra. María Elena Cazar Ramírez  
Director del Trabajo de Grado



Andrés Santiago Moncayo Loor  
Autor del Trabajo de Grado

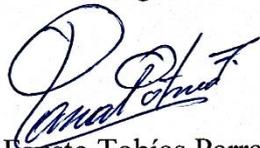
*Moncayo L*  
13/01/14

## ABSTRACT

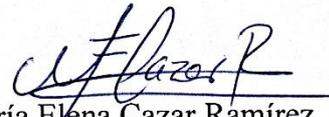
### EVALUATION OF $\alpha$ AND $\beta$ GLUCOSIDASE POTENTIAL ENZYME INHIBITOR IN SOME ECUADORIAN NATIVE FRUITS

The current trend on consumption of products of plant origin and the role that food has as diabetes protectors are the reasons to evaluate the inhibitory activity of the  $\alpha$  and  $\beta$  glucosidase enzymes in the native fruits, included in the study, by testing enzyme inhibition. Two techniques were standardized "in vitro" to assess the potential of fruits as  $\alpha$ - and  $\beta$  glucosidase inhibitors. Moreover, a food product (fruit juice) was developed by heat treatments selecting the fruit under study which has greater enzymes inhibition. The results allowed characterizing *joyapa mortiño* and *uvilla* fruits as  $\alpha$  and  $\beta$  glucosidase inhibitors. *Mortiño* was assessed as raw material for pasteurized juice. The heat treatment at 60 °C x 30 minutes increased enzymatic activity compared to the fresh fruit.

**Keywords:**  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, diabetes, *joyapa*, *mortiño*, *uvilla*



Ing Fausto Tobías Parra Parra  
SCHOOL DIRECTOR



Dra. María Elena Cazar Ramírez  
THESIS DIRECTOR



Andrés Santiago Moncayo Loor  
AUTHOR



*Lourdes Crespo*  
UNIVERSIDAD DEL  
AZUAY  
DPTO. IDIOMAS



Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

Moncayo Loor Andrés Santiago

Trabajo de Grado

Cazar Ramírez María Elena

Enero del 2014

## **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE LAS ENZIMAS $\alpha$ Y $\beta$ GLUCOSIDASA EN ALGUNOS FRUTOS NATIVOS DEL ECUADOR**

### **INTRODUCCIÓN**

La Diabetes mellitus se sitúa entre las diez principales causas de muerte en los países occidentales, y a pesar de los avances en su control clínico, aún no se ha logrado controlar sus consecuencias letales (Negri, 2005). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima la prevalencia de la diabetes, para todos los grupos de edad en todo el mundo, en 2,8% en 2000 y 4,4% en 2030; es decir, el número total de personas con diabetes se incrementará de 171 millones en 2000 a 366 millones en 2030 (Wild *et al.*, 2004).

La prevalencia de la obesidad y las enfermedades crónicas asociadas, es decir, la enfermedad cardiovascular y diabetes de tipo 2, es cada vez mayor en todas las partes del mundo. La obesidad, que se caracteriza por la acumulación excesiva de tejido adiposo, especialmente alrededor de la cintura, aumenta el riesgo de diversos trastornos metabólicos, incluyendo la dislipidemia, resistencia a la insulina, inflamación crónica, disfunción endotelial e hipertensión (Dembinska-Kiec *et al.*, 2008).

La Diabetes es una enfermedad crónica que se caracteriza por la presencia excesiva de glucosa en la sangre, debido a que el cuerpo no produce insulina o no la utiliza adecuadamente. Un 90% de los 171 millones de diabéticos del mundo, según las estimaciones, sufre diabetes tipo 2. Las personas con diabetes tipo 2 controlan el nivel de glucosa en la sangre siguiendo un plan de alimentación saludable, un programa de ejercicios, bajando de peso y tomando medicación oral (medicamentos hipoglicémicos) (OMS, 2008).

Los fármacos utilizados como hipoglicemiantes orales controlan los valores de glicemia, pero pueden presentar efectos secundarios, como hipoglicemia, intoxicación por ácido láctico, malestar gastrointestinal o aumento de peso. Además muchos pacientes necesitan tomar dos o tres medicamentos para alcanzar valores aceptables de glicemia, lo que conlleva un alto costo económico y una mayor probabilidad de interacciones con otros tratamientos. Una alternativa para pacientes con diabetes tipo 2, es complementar su tratamiento hipoglicemiante con productos de origen vegetal; incluso sustituyendo totalmente la medicación empleado fitoterapia, siempre y cuando la glicemia se encuentre estabilizada, se mantengan unos hábitos higiénico-dietéticos adecuados y el médico considere oportuna esta terapia (Castillo y Solís, 2007).

La diabetes tipo 2 afecta al 13.4% de los hombres y al 33% de mujeres, circunstancia que contribuye al aumento de la mortalidad en el Ecuador y el mundo. En el Ecuador la diabetes tipo 2 en mujeres y hombres de 30 a 45 años es del 42%. Existe una alta prevalencia de diabetes tipo 2 en mujeres y hombres a los que se les diagnostica retinopatías, pie diabético e insuficiencia renal. Sin embargo, en algunos casos los síntomas de la diabetes son la primera advertencia de dichas patologías (Sulca, 2011).

Los datos estimados de diabetes en la población adulta en centro América oscilan entre 3% y 6% siendo Nicaragua y Honduras los países de menor prevalencia de diabetes tipo 2. En Ecuador, la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 es de 4,1 a 5%. La incidencia/año es de 115.19 casos/100.000 habitantes (Barceló, 2001).

La diabetes es una enfermedad crónica no trasmisible y el 90% de los casos mundiales corresponden a la diabetes tipo 2, lo cual se explica en gran medida por el exceso de peso corporal y a la inactividad física. Una alimentación saludable y la práctica regular de actividad física contribuyen a prevenir los factores de riesgos asociados. Por esta razón, los consumidores cada vez más informados y conscientes de la vinculación entre alimentación y salud, están demandando en forma creciente alimentos y/o productos naturales con beneficiosos demostrados para prevenir estas enfermedades de la vida moderna.

Actualmente nos encontramos inmersos en un cambio en el concepto de alimento y en nuestra forma de alimentarnos. Además de las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos se está reconociendo el papel que toman los alimentos

como protectores de la salud. En este sentido, recientes estudios epidemiológicos han indicado que un alto consumo de frutas y hortalizas ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas. La protección que las frutas y hortalizas brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, ha sido atribuido a su alto contenido de antioxidantes (Schieber *et al.*, 2001).

La dieta juega un papel importante en la etiología y la prevención de varias enfermedades asociadas a la obesidad crónica, especialmente de diabetes y enfermedades cardiovasculares. Un patrón dietético caracterizado por un mayor consumo de verduras, frutas y los cereales integrales se asocia con un menor riesgo de diabetes tipo 2. Las pruebas para los distintos componentes de la dieta es limitada, no obstante, un gran grupo de metabolitos secundarios en las plantas podrían desempeñar un papel importante en los efectos en la salud de las dietas basadas en vegetales. Los efectos antioxidantes de los compuestos que proporcionan color y sabor de las frutas frescas o procesadas y verduras, han sido estudiado extensamente, pero se sabe menos de los otros posibles mecanismos biológicos que vinculan a los fitoquímicos con la prevención de la diabetes tipo 2 (Dembinska-Kiec *et al.*, 2008).

Las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa son las responsables de la hidrólisis de oligosacáridos en monómeros, y también de la hidrólisis de heterósidos de  $\alpha$ -glucosa, generando una unidad de aglicona y glucosa. Los inhibidores de estas enzimas son de interés terapéutico para el tratamiento de diabetes tipo 2, ya que son capaces de disminuir la liberación de glucosa de oligosacáridos, disminuyendo los niveles postprandiales de glucosa en pacientes diabéticos (Simões-Pires *et al.*, 2009).

Los recientes avances en esta área de investigación muestran que la exploración de fuentes naturales de inhibidores de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa se muestra como un campo de investigación promisorio. El estudio de algunos frutos nativos del Ecuador podría señalar nuevas fuentes de alimentos con propiedades beneficiosas para los pacientes que sufren diabetes tipo 2.

En este sentido, más de 1200 especies vegetales han sido descritas con propiedad antidiabética; estas representan más de 725 géneros en 183 familias. Las familias que abarcan un mayor número de éstas especies son *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae* y *Euphorbiaceae* (Negri, 2005). Entre las especies que se utilizan en medicina tradicional como antidiabéticos sólo cerca del 50% han sido estudiadas experimentalmente. En este sentido, la OMS promueve este tipo de estudios buscando contribuir al desarrollo de un tratamiento económico y efectivo de la diabetes (Castillo y Solís, 2007).

Dada la amplia disponibilidad de frutos nativos que ofrece el país, existe un importante potencial de desarrollo de productos botánicos únicos y diferenciados relacionados con el mortiño, joyapa, uvilla, ciruelo, entre otros. Además de estar asociado a una región con características únicas, estos frutos nativos poseen un alto valor nutricional, compuesto por antioxidantes y/o compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud humana.

La presente investigación plantea establecer la capacidad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa en los frutos de las especies *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum*, *Physalis peruviana* y *Spondias purpúrea* L. a través de un ensayo de inhibición enzimática “in vitro”. Se estandarizaron los métodos “in vitro” para evaluar la actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa en los frutos nativos incluidos en el estudio.

Se desarrolló un producto alimenticio (jugo de frutas) en base al fruto con mejores resultados en el ensayo de inhibición enzimática. Además se evaluó el producto final mediante tratamientos térmicos.

## CAPÍTULO I

### DIABETES MELLITUS

#### Introducción

En este capítulo se abordarán las características generales de la diabetes mellitus, su definición general, el tratamiento que se utiliza para esta enfermedad y la diabetes tipo 1 y 2. Además, se presentan las enzimas que están involucradas en el mecanismo de la diabetes.

#### 1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia e intolerancia a la glucosa, ya sea debido a la deficiencia de insulina o deterioro de la eficacia de la acción de la insulina, o una combinación de ambos. La hiperglicemia crónica de la diabetes está asociada a la disfunción y el fallo de varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Algunos procesos patológicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Estos incluyen la destrucción autoinmune de células  $\beta$  del páncreas con la consecuente deficiencia de la acción de la insulina. La acción deficiente de esta hormona resulta de la secreción inadecuada de insulina y/o la disminución de respuesta de los tejidos a esta hormona en uno o varios puntos en el complejo mecanismo de acción hormonal (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

La OMS reconoce tres tipos de diabetes: la diabetes de tipo 1, que se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina; la diabetes de tipo 2, que tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, generalmente como consecuencia del exceso de peso o la inactividad física, y la diabetes gestacional que corresponde a una hiperglicemia que se detecta por primera vez durante el embarazo (OMS, 2008).

La gran mayoría de los casos de diabetes se dividen en dos categorías amplias etiopatogénicas. En una categoría, la diabetes tipo 1, la causa es una deficiencia

absoluta de la secreción de insulina. Los individuos con mayor riesgo de desarrollar este tipo de diabetes a menudo pueden ser identificados por pruebas serológicas de un proceso patológico autoinmune se produce en los islotes pancreáticos y por los marcadores genéticos. En la otra categoría, mucho más frecuente, la diabetes de tipo 2, la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una respuesta secretora de insulina compensatoria inadecuada. En esta última categoría, un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en diferentes tejidos diana, pero sin síntomas clínicos, pueden estar presentes durante un largo periodo de tiempo antes de que se detecte la diabetes (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

Durante este período asintomático, es posible demostrar una anomalía en el metabolismo de hidratos de carbono mediante la medición de la glucosa en plasma en el estado de ayuno o después de un desafío con una carga oral de glucosa (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

Tabla 1 - Clasificación etiológica de la diabetes mellitus

<p>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de las células <math>\beta</math>, por lo general conduce a una deficiencia absoluta de insulina)</p> <p>A. Inmunológica mediadora</p> <p>B. Idiopática</p>
<p>II. Diabetes tipo 2 (puede variar desde predominantemente resistencia a la insulina con deficiencia de insulina relativa a un defecto predominante de secreción con resistencia a la insulina)</p>
<p>III. Otros tipos específicos</p> <p>A. Los defectos genéticos de la función célula <math>\beta</math></p> <p>B. Los defectos genéticos en la acción de la insulina</p> <p>C. Enfermedades del páncreas exocrino</p> <p>D. Endocrinopatías</p> <p>E. Drogas o químicos inducidos</p> <p>F. Infecciones</p> <p>G. Formas poco frecuentes de diabetes inmunomediada</p> <p>H. Otros síndromes genéticos a veces asociados con la diabetes</p>
<p>IV. Diabetes mellitus gestacional (GDM)</p>

Fuente: Sociedad Americana de Diabetes, 2006.

### 1.1.1 Tratamiento

La terapéutica de la diabetes se centra en dos objetivos íntimamente relacionados: *a)* mejorar la utilización de la glucosa y otros nutrientes en los tejidos (aminoácidos, glicerol, ácidos grasos y cuerpos cetónicos) y *b)* normalizar al máximo posible los niveles de glicemia sin perturbar de manera notable el estilo de vida del paciente (Flórez, 1997).

El tratamiento actual del enfermo diabético exige un abordaje múltiple, el cual se basa en la dieta ajustada a las necesidades vitales de cada persona y en el empleo de insulina o de diversos fármacos orales que, por uno u otro mecanismo, consiguen reducir los niveles de glicemia (Flórez, 1997; Gerich, 2001).

- Insulina

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos (5,8 kD) sintetizado por las células  $\beta$  del páncreas. Hasta hace pocos años, la insulina utilizada clínicamente procedía de la extracción de páncreas bovinos y porcinos. En la mayoría de los países actualmente se utiliza insulina humana (pureza del 100 %), obtenida por tecnología recombinante a partir de ADN plasmídico inyectado en *Escherichia coli* (Flórez, 1997).

La insulina es secretada por las células  $\beta$  del páncreas; esta glándula pesa cerca de 200g, está situada abajo y detrás del estómago, produce además, otras dos hormonas importantes en el organismo, la somatostatina (células  $\delta$ ) y el glucagón (células  $\alpha$ ) entre las cuales existe una relación, en parte de tipo paracrino (Negri, 2005; Flórez, 1997; Gerich, 2001). El glucagón estimula la secreción de insulina y de somatostatina, mientras que la somatostatina inhibe la secreción de insulina y glucagón. El flujo sanguíneo circula en el islote desde las células  $\beta$  hacia las  $\alpha$  y  $\delta$ , de este modo la somatostatina ha de pasar por la circulación general para poder llegar a las células  $\alpha$  y  $\beta$ ; en cambio, la insulina puede desempeñar cierto papel paracrino y estimular la secreción de glucagón y polipéptido pancreático (células PP) (Flórez, 1997).

El tratamiento con insulina suele ser usado en pacientes con diabetes tipo 1, sin embargo, también se usa en pacientes con diabetes tipo 2 en los que las terapias tales como la modificación de la dieta, ejercicio y antidiabéticos orales no han

logrado mantener el control glucémico. Algunos pacientes con diabetes tipo 2 requieren tratamiento con insulina en dosis de 0,4 a 0,6 U/kg por día, como en pacientes con diabetes tipo 1 (Gerich, 2001).

- Hipoglicemiantes orales

Según la Asociación Latinoamericana de Diabetes (2006), el tratamiento con antidiabéticos orales debe iniciarse en toda persona con diabetes tipo 2 que no haya logrado alcanzar las metas de control glicémico después de un período de tres a seis meses con cambios terapéuticos en el estilo de vida (CTEV). Para considerar que los CTEV han sido efectivos la persona debe haber logrado modificaciones en el régimen alimentario, reducción del 5 a 7% del peso corporal (si éste estaba excedido) e incremento de la actividad física programada.

Si no se observa una reducción gradual de las glicemias que permita predecir que la persona va a alcanzar la meta en el plazo de tres a seis meses, puede ser necesario adelantar el inicio del tratamiento farmacológico. Sin embargo, también puede iniciarse el tratamiento con antidiabéticos orales desde el momento del diagnóstico cuando el grado de descontrol de la diabetes permite anticipar que los CTEV no van a bastar para reducir gradualmente las glicemias y alcanzar las metas de control glicémico al cabo de 3 a 6 meses (Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2006).

Los agentes antidiabéticos orales incluyen las sulfonilureas, meglitinidas y análogos de la meglitinida, inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, y tiazolidinedionas; los cuales pueden ser utilizados como monoterapia o en combinación para lograr el control glicémico (Gerich, 2001). En la Tabla 2 se encuentran los hipoglicemiantes más utilizados, en la dosis requerida, de acuerdo con la dolencia que acompaña a la diabetes; así mismo las contraindicaciones y efectos secundarios causados por cada fármaco.

- Sulfonilureas

Son derivados de las sulfamidas, en los cuales la estructura sulfonilurea constituye el grupo esencial de la actividad hipoglicemiante. Dentro de las más comunes se encuentran gliburida, glipizida y glimepirida. Este tipo de antidiabéticos actúan estimulando la secreción de insulina cuando se unen a receptores en las células  $\beta$

pancreáticas. Para ello, las sulfonilureas actúan con gran afinidad sobre receptores asociados a los canales de potasio sensibles a ATP; como consecuencia de esta acción, el canal se cierra y la despolarización causada facilita la secreción de insulina (Flórez, 1997; Gerich, 2001).

- Meglitinidas y análogos de meglitinida

Las meglitinidas tales como repaglinida y análogos de meglitinida como nateglinida, al igual que las sulfonilureas, estimulan la liberación de insulina al cerrar los canales de potasio dependientes de ATP en las células  $\beta$  del páncreas. Comparadas con las sulfonilureas, éstas inician la acción con mayor rapidez, pero son de corta duración (Gerich, 2001).

- Biguanidas

Los derivados de compuestos biguanídicos, entre los cuales el único aceptado actualmente es la metformina, no provocan liberación de insulina (Flórez, 1997). Su acción principal es la disminución de la producción hepática de glucosa, aunque también pueden mejorar la eficacia de la captación de glucosa por los tejidos periféricos (Gerich, 2001).

- Inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa

Para que los carbohidratos de la dieta se absorban, deben ser hidrolizados en monohidratos en el tubo intestinal. Los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos son transformados en monosacáridos mediante la hidrólisis producida por las  $\alpha$ -glucosidasas (glucoamilasa, sacarasa, maltasa y dextrinasa), que se encuentran en la superficie luminal de las microvellosidades intestinales, estando su máxima concentración en el tercio superior del duodeno desde donde desciende progresivamente hasta el íleon. Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa tales como acarbosa y el miglitol, reducen la formación de monosacáridos y, consiguientemente, la disponibilidad de la glucosa y otras hexosas para ser absorbidas en el intestino (Flórez, 1997).

- Tiazolidinedionas

Se caracterizan por sensibilizar o incrementar la acción de la insulina sin que aumente su secreción, por lo que son útiles en situaciones en que se desarrolla resistencia a la insulina. Entre las más estudiadas de encuentran troglitazona, seguido de pioglitazona y ciglitazona (Flórez, 1997).

Tabla 2: Uso de hipoglucemiantes o antidiabéticos orales

Grupo/Medicamento	Dosis inicial (máxima)	Indicación	Contraindicación	Efectos secundarios
Biguanidas • Metformina	500 mg [2,500 mg]	Obesidad Dislipidemia Resistencia a la insulina	Edad > 80 años Insuficiencia cardíaca Embarazo	Acidosis Láctica Hipoxia Trastornos gastrointestinales Anorexia
Sulfonilureas • Clorpropamida • Glibenclamida • Gliburida • Microgliburida • Glipizida • Glimepirida	5.0 mg/día [15 mg] 2.5 mg/día [20 mg] 1.5 mg/día [12 mg] 5.0 mg/día [40 mg] 5.0 mg /día [20 mg] 1.0 mg/día [8 mg]	Deficiencia insulínica Glucosa en ayunas >250 mg/dl Glucosa postprandial >300 mg/dl	Embarazo Enfermedad renal	Hipoglicemias Aumento de peso Alergia a las sulfas
Inhibidores de alfa glucosidasa • Acarbosa • Miglitol	25 mg antes de la comida principal [100 mg]	Obesidad Resistencia a la insulina Hiperglicemia postprandial	Embarazo Enfermedad renal Enfermedad intestinal crónica Cirrosis hepática Cetoacidosis	Trastornos gastrointestinales
Tiazolidinedionas • Pioglitazona • Rosiglitazona	15 mg [45 mg] 4 mg [8 mg]	Obesidad Resistencia a la insulina Hiperglicemia postprandial	Enfermedad cardiovascular Hepatopatías Uso de contraceptivos orales Embarazo	Aumento de peso
Meglitinidas • Repaglinida • Nateglinida	0.5 mg [4.0 mg] 60 mg [120 mg]	Deficiencia de insulina Horas de comida variables Insuficiencia renal	Embarazo y lactancia Maternal Diabetes tipo 1 Hipersensibilidad	Hipoglicemia Aumento de peso

Fuente: Barceló *et al.*, 2009

### 1.1.2 La Diabetes tipo 1

En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de las células  $\beta$  es muy variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente a los bebés y niños) y lentos en otros (principalmente adultos). Algunos pacientes, especialmente los niños y los adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad. Otros presentan modesta hiperglucemia en ayunas que puede cambiar rápidamente a la hiperglucemia severa y / o cetoacidosis en presencia de infección o de otros tipos de estrés. Los adultos pueden retener residuos en función

de las células suficientes para prevenir la cetoacidosis durante muchos años, estas personas finalmente se vuelven dependientes de insulina para sobrevivir y están en riesgo de cetoacidosis. En esta última etapa de la enfermedad hay poca o ninguna secreción de insulina, tal como se manifiesta por niveles bajos o indetectables de plasma de C-péptido. La diabetes inmunomediada ocurre comúnmente en la infancia y la adolescencia, pero puede manifestarse a cualquier edad, incluso en la octava y novena década de la vida (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

La destrucción autoinmune de las células tiene múltiples predisposiciones genéticas, y también está relacionada con factores ambientales que todavía no están bien definidos. Aunque los pacientes rara vez son obesos cuando se presentan con este tipo de diabetes, la presencia de la obesidad no es incompatible con este diagnóstico (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

- Causas de Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 puede ocurrir a cualquier edad, pero se diagnostica con mayor frecuencia en niños, adolescentes o adultos jóvenes. La insulina es una hormona producida por células especiales, llamadas beta, en el páncreas, un órgano localizado en el área por detrás del estómago. La insulina se necesita para movilizar el azúcar de la sangre (glucosa) hasta las células, donde se almacena y se utiliza después para obtener energía. En la diabetes tipo 1, estas células producen poca o ninguna insulina (MedlinePlus, 2011a).

Sin la insulina suficiente, la glucosa se acumula en el torrente sanguíneo en lugar de entrar en las células y el cuerpo es incapaz de usarla para obtener energía. Esto lleva a los síntomas de diabetes tipo 1. La causa exacta de este tipo de diabetes se desconoce, pero la más probable es un trastorno autoinmunitario. Una infección o algún otro desencadenante provoca que el cuerpo ataque por error las células productoras de insulina del páncreas. Este tipo de trastorno se puede transmitir de padres a hijos (MedlinePlus, 2011a).

### **1.1.3 La Diabetes tipo 2**

Esta forma de diabetes, presente en el 90-95% de las personas con diabetes, se había referido como diabetes no insulino dependiente. La diabetes tipo 2, o diabetes del adulto, incluye a las personas que tienen resistencia a la insulina. Al menos al

principio, y muchas veces durante toda su vida, estas personas no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Probablemente hay muchas causas diferentes de esta forma de diabetes. Aunque no se conocen las causas específicas, la destrucción autoinmune de las células beta no se produce en este tipo de diabetes (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

La mayoría de los pacientes afectados por Diabetes tipo 2 son obesos, y la obesidad en sí provoca un cierto grado de resistencia a la insulina. Los pacientes que no son obesos según los criterios de peso tradicionales pueden tener un mayor porcentaje de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal. La cetoacidosis rara vez se produce espontáneamente en este tipo de diabetes; cuando se ve, se presenta en asociación con el estrés de otra enfermedad tal como una infección. Esta forma de diabetes va con frecuencia sin diagnosticar durante muchos años debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en etapas más tempranas a menudo no es lo suficientemente grave como para que el paciente observe cualquiera de los síntomas clásicos de la diabetes (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

Sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares. Considerando que los pacientes con este tipo de diabetes pueden tener niveles de insulina que parecen normales o elevados, se esperaría niveles de glucosa en la sangre más altos en estos pacientes diabéticos para dar lugar a valores de insulina aún mayores había sido su función célula  $\beta$  normal. Por lo tanto, la secreción de insulina es defectuosa en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y / o el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez restaurado a su estado normal (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres con Diabetes Mellitus Gestacional previa y en individuos con hipertensión o dislipidemia, y su frecuencia varía en diferentes subgrupos raciales / étnicos. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, más de lo que es la forma autoinmune de la diabetes tipo 1. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es complejo y no está claramente definido (Sociedad Americana de Diabetes, 2006).

- Causas de Diabetes tipo 2

La diabetes es causada por un problema en la forma como el cuerpo produce o utiliza la insulina. La insulina es necesaria para mover el azúcar en la sangre (glucosa) hasta las células, donde ésta se almacena y se usa posteriormente como fuente de energía. Cuando se tiene diabetes tipo 2, la grasa, el hígado y las células musculares normalmente no responden a dicha insulina. Esto se denomina resistencia a la insulina. Como resultado, el azúcar de la sangre no entra en las células con el fin de ser almacenado para obtener energía. Cuando el azúcar no puede entrar en las células, se acumulan niveles anormalmente altos de éste en la sangre, lo cual se denomina hiperglucemia (MedlinePlus, 2011b).

Por lo general, la diabetes tipo 2 se desarrolla lentamente con el tiempo. La mayoría de las personas con esta enfermedad tienen sobrepeso en el momento del diagnóstico. El aumento de la grasa le dificulta al cuerpo el uso de la insulina de la manera correcta. La diabetes tipo 2 puede presentarse también en personas delgadas y es más común en los ancianos. Los antecedentes familiares y los genes juegan un papel importante en la diabetes tipo 2. Un bajo nivel de actividad, una dieta deficiente y el peso corporal excesivo (especialmente alrededor de la cintura) aumentan el riesgo (MedlinePlus, 2011b).

## 1.2 Enzimas involucradas en el mecanismo de la diabetes

Las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa son las responsables de la hidrólisis de oligosacáridos en monómeros, y también de la hidrólisis de heterósidos de  $\alpha$ -glucosa, generando una unidad de aglicona y glucosa. Los inhibidores de estas enzimas son de interés terapéutico para el tratamiento de diabetes tipo 2, ya que son capaces de disminuir la liberación de glucosa de oligosacáridos, disminuyendo los niveles postprandiales de glucosa en pacientes diabéticos (Simões-Pires *et al.*, 2009).

Estudios recientes reportan la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por flavonoides (Kumar *et al.*, 2011). Seis grupos de flavonoides fueron evaluados ante esta enzima, en levaduras e intestino delgado de ratas. La enzima  $\alpha$ -glucosidasa fue potentemente inhibida por antocianidinas, isoflavonas y flavonoles, exhibiendo valores de  $IC_{50}$  menores a 15  $\mu$ M. Extractos metanólicos de la fruta *Terminalia*

*chebula* (*Combretaceae*) fueron investigados como inhibidores de la mencionada enzima. El aislamiento bioguiado permitió caracterizar a tres nuevos compuestos pertenecientes a la familia de los taninos, como inhibidores de maltasa intestinal. (Gao *et al.*, 2007).

Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas actúan inhibiendo las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) presentes en las vellosidades intestinales, que son las enzimas que actúan en el desdoblamiento de la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa). El resultado es una demora en la digestión de los hidratos de carbono con reducción de los picos glucémicos postprandiales. Actúan indirectamente, enlenteciendo y disminuyendo la absorción de hidratos de carbono. También actúan disminuyendo la secreción de polipéptidos intestinales (Fernández, 2001).

Pero la diabetes es una enfermedad progresiva, con el tiempo la monoterapia con fármacos se conoce que deja de ser efectiva, por lo que hay que ir adaptando un tratamiento de forma continuada y paralela al deterioro del control (Fernández, 2001).

### 1.2.1 Enzima $\alpha$ - glucosidasa

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida, también conocida como  $\alpha$ -1,4-glucosidasa, es una enzima codificada por el gen GAA esencial para el catabolismo de glucógeno a glucosa en los lisosomas. Este proceso de degradación evita la sobreacumulación de glucógeno en diferentes células del cuerpo (Fukuda *et al.*, 2007).

Se han encontrado más de 200 mutaciones importantes del gen GAA, las cuales alteran el funcionamiento adecuado de la  $\alpha$ - glucosidasa ácida, reduciendo su actividad y generando una acumulación en exceso de glucógeno en los lisosomas. Esta acumulación conlleva a la enfermedad de Pompe, o enfermedad de almacenamiento de glucógeno II. La enfermedad de Pompe es una enfermedad autosómica recesiva con un margen grande de síntomas clínicos, dependiendo de la reducción enzimática causada por la mutación en el gen. Afecta mayoritariamente las células cardíacas, respiratorias y musculares, lo cual suele causar la muerte antes de los dos años (McVie-Wylie *et al.*, 2008).

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa (acarbosa, miglitol, voglibosa) son ampliamente utilizados en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2. Los inhibidores de esta enzima retardan la absorción de carbohidratos desde el intestino delgado, produciendo la disminución de los niveles posprandiales de glucosa sanguínea e insulina (Van der Laar *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Enzima $\beta$ - glucosidasa

Las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4) de oligosacáridos, originando como producto final monómeros de glucosa. La afinidad de esta enzima disminuye al aumentar el grado de polimerización de los oligosacáridos, siendo inactivos sobre los polímeros. Las  $\beta$ -glucosidasas también disponen de actividad transferasa o transglucosidasas por lo que pueden generar productos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, lo cual determina su utilización en la biosíntesis de los mismos. También participan en la hidrólisis de compuestos glicosilados por lo que se utiliza en las industrias de zumos de frutas y derivados, siendo la más importante la industria vinera (hidrólisis de terpenoles glicosilados) potenciando el aroma (Palmeri *et al.*, 2007). Otra aplicación es la producción de etanol a partir de residuos agrícolas (Sue *et al.*, 2006). Las grandes posibilidades de aplicación de esta enzima promueven la investigación, el mejoramiento en la producción de las mismas y la contribución a la disminución de la contaminación.

Esta enzima generalmente es sintetizada por variedades de bacterias aerobias como *Phanerochaete chrysosporium* (Li *et al.*, 1998), *Streptomyces sp.* y hongos como *Aspergillus oryzae* (Riou *et al.*, 1998), *Achatina áulica*, *Periconia sp.*, *Botryodiplodia theobromae*. En los últimos años se realizaron esfuerzos por buscar nuevas alternativas de fuentes de esta enzima que tengan estabilidad extrema y es así que se han descrito bacterias cuyo metabolismo es anaerobio termófilo como: *Clostridium thermocellum* (Gräbnitz *et al.*, 1989), *Thermoanaerobacter brockii* (Breves *et al.*, 1997), *Thermophilic ethanologensis* (Taylor *et al.*, 2009).

Las  $\beta$ -glucosidasas se encuentran extensamente distribuidas en la naturaleza y presentan una gran heterogeneidad tanto en su localización como en su función. En bacterias y hongos, estas enzimas se encuentran formando parte de celulasas (sistemas multienzimáticos encargados de la degradación de la celulosa). El

complejo es responsable de la hidrólisis y degradación de celulosa a cadenas pequeñas de oligosacáridos y celobiosa, siendo estos hidrolizados por la  $\beta$ -glucosidasa a glucosa (De la Mata *et al.*, 1992).

En plantas e insectos tienen un papel importante en los mecanismos de defensa, ya que permiten la liberación de saponinas, tiocianatos y HCN a partir de los respectivos precursores glicosídicos. Además, en plantas, juegan un papel muy importante ya que catalizan la hidrólisis de precursores de fitohormonas, están implicados en procesos relacionados con la germinación de la semilla, la conversión de biomasa y la liberación de las agliconas responsables del aroma y sabor en frutas (Bhatia *et al.*, 2002). En humanos, esta enzima se encuentra en la membrana de los lisosomas. La deficiencia en  $\beta$ -glucosidasa-ácida lisosomal causa la enfermedad de Gaucher en la que se produce la acumulación de glicosilceramidas en las células endoteliales lo que ocasiona hipertrofia de bazo, hígado y ganglios linfáticos (Frederickson & Sloan, 1972).

Existen diferentes maneras de clasificación para este grupo de enzimas: en función de la especificidad de sustrato, tal especificidad viene dada por el resto aglicona, en aril- $\beta$ -glucosidasas, celobiasas y  $\beta$ -glucosidasas con amplia especificidad de sustrato (Bhatia *et al.*, 2002), en función de su mecanismo de acción, en endohidrolasas o exohidrolasas, etc. Actualmente se ha establecido un criterio de clasificación que agrupa las enzimas en función de su secuencia aminoacídica y estructura tridimensional (Henrissat, 1991). Según esta clasificación existen cerca de 100 familias de glicósido hidrolasas (Henrissat & Davies, 1997).

Las  $\beta$ -glucosidasas, excepto la glucosil ceramidasa, pertenecen a las familias 1 y 3 según esta última clasificación. A la familia 1 pertenecen  $\beta$ -glucosidasas de archeobacteria, plantas y mamíferos. A la familia 3 pertenecen  $\beta$ -glucosidasas de bacterias, levaduras y hongos. Esta clasificación incluye a la  $\beta$ -glucosidasa de almendra dulce (*Prunus dulcis*) dentro de la familia 1 (He & Withers, 1997).

Las enzimas de las familias 1 y 3 hidrolizan sus sustratos con retención neta de la configuración del carbono anomérico, mediante un mecanismo de doble desplazamiento. Entre los sustratos naturales de las  $\beta$ -glucosidasas se encuentran la celobiosa, el dhurrin, la amigdalina, el linamarin y el glucósido de Dimboa (He & Withers, 1997).

## CAPÍTULO II

### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

#### Introducción

En este capítulo se abordarán todas las características botánicas y morfológicas de las especies *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum*, *Physalis peruviana* L. y *Spondias purpúrea* L. Además, incluye información bromatológica de cada especie, sus aplicaciones y usos en general.

#### 2.1 *Macleania rupestris*



Figura 1: *Macleania rupestris* (flor)



Figura 2: *Macleania rupestris* (fruto)

#### 2.1.1 Taxonomía

Se presenta la sistemática vegetal de *Macleania rupestris*:

Tabla 3: Clasificación taxonómica de *M. rupestris*.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Ericales
Familia:	Ericaceae
Género:	<i>Macleania</i>
Especie:	<i>Rupestris</i>

Fuente: Jorgensen y León, 1999

### 2.1.2 Características

La familia *Ericaceae* es uno de los componentes florísticos más sobresalientes del neotrópico. En el Ecuador crecen generalmente en la Sierra en estado silvestre, son endémicas (De la Torre *et al.*, 2008). La especie *Macleania rupestris*, es llamada joyapa, salapa verde, joyapa chaucha (Van den Eynden *et al.*, 1999), uva camarona (Durán-Casas *et al.*, 2013). Arbusto de 1-3 m de alto; base de la planta truncada con abultaciones; hoja elíptica, 3-6,5 x 1,5-3 cm; se distingue por tener flores con sépalos cortos y frutos morados-negros o rosados de 10-12 mm de diámetro (Van den Eynden *et al.*, 1999); carnosos, de sabor dulce y agradable; con numerosas semillas (98-150), pequeñas. Presenta en el ápice los restos del cáliz persistente con 5 lóbulos triangulares; el pedúnculo que lo sustenta es fuerte y generalmente encorvado, estriado o rugoso (Chaparro & de Carrillo, 1991). Se encuentra entre los 2500 y 3400 msnm en matorral y páramo (Van den Eynden *et al.*, 1999).

Durante el proceso de maduración la forma básica del fruto no se altera, su coloración cambia desde rosa claro, verde pálido, blanquecino, púrpura oscuro, hasta casi negro (en su senescencia). El perianto de las flores es de color rosado intenso inclusive su pedicelo. A medida que transcurre el desarrollo del fruto el color rosa se va perdiendo progresivamente hasta alcanzar el color blanquecino; a partir de éste estadio se evidencia nuevamente la presencia de pigmentos pero de color púrpura, el cual se va acentuando hasta llegar al color púrpura oscuro típico del estado de madurez (Chaparro & de Carrillo, 1991).

Siendo un fruto carnoso y jugoso su consistencia se mantiene en buenas condiciones hasta los procesos finales de maduración. El fruto de *Macleania rupestris* es considerado uno de los frutos de zonas frías con buenas perspectivas comerciales para consumo directo y manufacturado.

La especie de *Macleania rupestris* poseen un alto valor nutricional, compuesto por antioxidantes y/o compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud humana. Contiene una acidez total de 0.49% de ácido cítrico, 12.5 ° Brix de sólidos solubles, 1.8% de fibra cruda, 1.3% de proteína cruda, y 0.08 g de tanino en 100 g de pulpa. El contenido de elementos minerales por 100 g de pulpa fueron 136.9 mg de calcio, 0.97 mg de hierro, 5.24 mg de potasio, 8.69 mg de sodio, y 10.3 mg de fósforo, y los azúcares (por 100 g de pulpa): 15.9 g de fructosa, 1.62 g de sacarosa, 13.5 g de  $\alpha$ -glucosa, y 16.1 g de la  $\beta$ -glucosa (Durán-Casas *et al.*, 2013).

### 2.1.3 Aplicaciones

La *Macleania rupestris* es utilizada como:

- Alimento.- A partir de sus frutos para elaboración de jugos o mermeladas, conservas y caramelos.
- Medicinal.- Macerando los frutos o consumiéndolos como fruta fresca; son astringentes y se emplean para el control de diarreas crónicas; sirven para aliviar afecciones al pulmón y en decocción para los nervios. Las hojas en decocción son utilizadas también como antidiarreicos y en las fiebres tifoideas.
- Maderable.- Del bosque montano ecuatoriano. Esta especie es utilizada por los Saraguros, un grupo indígena de la provincia de Loja (Lagos-Burbano *et al.*, 2010).

## 2.2 *Vaccinium floribundum*



Figura 3: *Vaccinium floribundum* (flor)



Figura 4: *Vaccinium floribundum* (fruto)

### 2.2.1 Taxonomía

Se presenta la sistemática vegetal de *Vaccinium floribundum*:

Tabla 4: Clasificación taxonómica de *V. floribundum*.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Ericales
Familia:	Ericaceae
Género:	<i>Vaccinium</i>
Especie:	<i>floribundum</i>

Fuente: Pérez & Valdivieso, 2007

### 2.2.2 Características

La especie *Vaccinium floribundum* es también llamada manzana, tira, shímpiship (Shuar), mortíño. Arbusto erecto de 30 cm; hojas pequeñas con bordes aserrados; flor rosada en forma de campana de 5-8 mm de largo; fruto azul-morado de 6 mm de diámetro (Van den Eynden *et al.*, 1999). Se desarrolla en climas templados y fríos, con temperaturas de 8 a 16°C (Lagos-Burbano *et al.*, 2010); se encuentra en matorral, páramo y en el talud de senderos entre los 2900 y 3500 msnm (Van den

Eynden *et al.*, 1999). Crecen en suelos ácidos, arenosos, con turba o con materia orgánica. Producen frutas comestibles insípidas o de sabor dulce o agrio (Trujillo, 2008).

Se encontró que el motiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), de la familia Ericaceae, llamado también uva de monte, es una fruta nativa de los páramos ecuatorianos. Crece en el norte de Sudamérica y es similar en su forma al *V. ovatum* de Norteamérica, *V. corfertum* Kunth de México y *V. consanguineum* Klotzch del sur de México y América centra (Loján, 2003, citado por Muñoz, 2004, p.1). Esta fruta se desarrolla de forma silvestre en los campos y montañas; pero no se ha establecido como cultivo comercial. Se lo puede encontrar en las partes altas de la Cordillera, es decir en los páramos que van desde El Ángel en la provincia del Carchi hasta El Tambo en la provincia del Cañar (Muñoz, 2004).

*Vaccinium floribundum* se encuentra en la Región Sierra en las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (Pérez & Valdivieso, 2007). De esta fruta se logra una sola cosecha al año que va de octubre a noviembre; se lo consume fresco y cabe señalar que su mayor demanda es por el Día de los Difuntos (Noviembre 2) para preparar la colada morada (Loján, 2003).

La especie de *Vaccinium floribundum* en una porción de 142 g., se puede encontrar un aporte nutricional de 1% de grasas, 9% de carbohidratos, 14 % de fibra y 15 % de vitamina C (Muñoz, 2004). Este fruto contiene cantidades altas de vitaminas C, pectina, celulosa y antocianinas. Estas últimas son compuestos que han mostrado tener propiedades antioxidantes, antitumorales, antiulcerales y antiinflamatorias (Trujillo, 2008).

Debido a su gran sabor, propiedades y cualidades nutricionales, estas bayas son un producto que cada vez es más consumido el mundo. Al tener un bajo contenido de calorías es favorable para su uso en dietas y además, por la presencia de compuestos fenólicos y fibra reduce el azúcar en la sangre. Por su alto contenido en vitamina C, es un excelente antioxidante celular y purificador, mientras que la vitamina A fortalece a la vista (Vasco *et al.*, 2009).

La *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos, según sus estándares, considera a estas bayas como frutos con bajo contenido de grasa y sodio, rico en fibras, vitaminas y libre de colesterol (USDA, 2010).

Se reportan, además, la presencia de otros componentes orgánicos como la glucosa, fructosa, ácido cítrico y málico responsables de su sabor así como compuestos considerados nutraceuticos con propiedades antioxidantes (Vasco et al., 2009; USDA, 2010). Las partes aéreas de la planta de mortiño (hojas) contienen flavonoides derivados de la quercetina (rutósido y avicularina), taninos catéquicos (6-10%), ácidos triterpénicos (ursólico, oleanólico), iridoides, ácidos fenólicos, leucoantocianidinas y cromo (9,0 ppm) (Vasco et al., 2009).

### 2.2.3 Aplicaciones

La especie de *Vaccinium floribundum* es utilizado como:

- Alimento.- Es considerada endémica y utilizada principalmente en el día de los difuntos para la elaboración de la tradicional colada morada; también se lo emplea en jugos, mermeladas, dulces, flanes, tortas, helados y vinos (Pérez & Valdivieso, 2007). Se encuentra en la lista de colorantes permitidos en la industria de alimentos normados e identificados como colorantes naturales E163 (CEE, 2009).
- Medicinal.- Sirve para tratar irritaciones en la boca, garganta o encías (Muñoz, 2004). Se recomienda a personas con desarreglos en el nivel de azúcar en la sangre, pues ayuda a restablecer los niveles normales y para problemas digestivos, diarrea y estreñimiento (Pérez & Valdivieso, 2007).
- Maderable.- Es utilizada como fuente de leña para la cocción.
- Otros usos.- El follaje para uso en floristería; aunque no se ha encontrado ningún reporte en literatura o experimental, se podría utilizar como tinte natural (Pérez & Valdivieso, 2007).

### 2.3 *Physalis peruviana* L.



Figura 5: *Physalis peruviana* L.  
(flor)



Figura 6: *Physalis peruviana* L.  
(fruto)

#### 2.3.1 Taxonomía

Se presenta la sistemática vegetal de *Physalis peruviana* L.:

Tabla 5: Clasificación taxonómica de *Physalis peruviana* L.

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Angiospermae
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Physalis</i>
Especie:	<i>Physalis peruviana</i> L.

Fuente: Madriñan, 2010

#### 2.3.2 Características

La especie *Physalis peruviana* L, también llamada uchua, uvilla, tomatillo, aguaymanto, capulí (Madriñan, 2010). Pertenece a la familia de las Solanaceae y al género *Physalis*, cuenta con más de ochenta variedades que se encuentran en estado silvestre y que se caracterizan porque sus frutos están encerrados dentro de

un cáliz o cápsula. Es originaria del Perú, es la especie más conocida de este género. Planta de tipo arbustiva con una raíz fibrosa que se ha encontrado a más de 60 cm de profundidad en el suelo. Posee un tallo algo quebradizo de color verde, con vellosidades de textura muy suave al tacto. Las hojas son enteras, similares a un corazón pubescente y de disposición alterna. Las flores son hermafroditas de cinco sépalos, con una corola amarilla y de forma tubular. El fruto es una baya carnosa en forma de globo, con un diámetro que oscila entre 1,25 y 2,5 cm y con un peso entre 4 y 10 g; está cubierto por un cáliz formado por cinco sépalos que le protege contra insectos, pájaros, patógenos y condiciones climáticas extremas (Calvo, 2009).

Su pulpa presenta un sabor ácido azucarado (semiácido) y contiene de 100 a 300 semillas pequeñas de forma lenticular (Calvo, 2009). Suelos francos, con alto contenido de materia orgánica, pH 7 (Chicaiza, 2008). Se encuentra como planta silvestre en huertas y potreros en zonas húmedas premontanas, entre los 900 y 2600 msnm (Van den Eynden *et al.*, 1999), con temperaturas promedio entre 13° y 15°C (Calvo, 2009).

La familia Solanaceae, está integrada principalmente por herbáceas pero con algunos árboles y arbustos. Económicamente es una de las más importantes para el hombre. La familia se encuentra ampliamente distribuida por las regiones tropicales y templadas de todos los continentes, pero se puede decir que están concentradas especialmente en Australia, América Central y América del Sur (Madríñan, 2010).

El fruto de la especie de *Physalis peruviana* L. posee altos niveles de vitamina A y C, así como calcio, fósforo y hierro, regula el nivel de azúcar en los diabéticos y ayuda a eliminar los parásitos intestinales. El jugo de la uchuva madura tiene altos contenidos de pectinasa (Calvo, 2009). Por cada 100 g. de pulpa, se puede encontrar un aporte nutricional de 13.1 g. de carbohidratos, 54.00 de calorías, 4.8 g. de fibra, 648 U.I. de vitamina A y 26 mg. de ácido ascórbico (Madríñan, 2010).

### 2.3.3 Aplicaciones

La especie de *Physalis peruviana* L. es utilizada como:

- Alimento.- Esta fruta puede consumirse sin procesar, como fruta deshidratada, también se incorpora en jugos y néctares, mermeladas, salsas, conservas, licores, helados, dulces y jaleas.
- Medicinal.- Se le atribuyen propiedades medicinales tales como las de purificar la sangre, disminuir la albúmina de los riñones, aliviar problemas en la garganta, próstata y bronquiales, fortalecer el nervio óptico, limpiar las cataratas y prevenir la osteoporosis (Calvo, 2009).
- Otros usos.- Las hojas y la fruta son usadas también en la industria química y farmacéutica (Briceño, 2007).

### 2.4 *Spondias purpúrea* L.



Figura 7: *Spondias purpúrea* L. (flor)



Figura 8: *Spondias purpúrea* L. (fruto)

#### 2.4.1 Taxonomía

Se presenta la sistemática vegetal de *Spondias purpúrea* L.:

Tabla 6: Clasificación taxonómica de *Spondias purpúrea* L.

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Sapindales
Familia:	Anacardiaceae
Género:	<i>Spondias</i>
Especie:	<i>Spondias purpúrea</i> L.

Fuente: Jorgensen y León, 1999

#### 2.4.2 Características

La familia Anacardiaceae comprende más de 70 géneros con 600 especies (Alia *et al.*, 2012). La especie *Spondias purpúrea* L. llamada también ciruelo. Árbol que llega a 10m. de alto. Hojas compuestas de 5 – 12 pares de hojuelas. Panículas de flores rojas o purpúreas asentadas sobre las ramas gruesas (Valverde, 1998). Los frutos son drupas oblongas, redondas u ovoides; de tamaños y masas diversas que fluctúan entre 2 y 5 cm y entre 4 y 33 g respectivamente, con epicarpio liso a semiliso, delgado y de coloración roja, amarilla, café rojiza, anaranjada o morada al madurar, con endocarpio grueso y fibroso y mesocarpio de sabor y aroma agradables (Alia *et al.*, 2012). La fructificación se inicia en Noviembre. Nativo de América tropical, cultivado en todas las provincias de la costa, de manera preferente en la provincia del Guayas: Guayaquil, cerro Santa Ana Cerecita Las Juntas, Petrillo y muchos lugares xerofíticos (Valverde, 1998).

El fruto maduro de la especie de *Spondias purpúrea* L. proporciona alta densidad calórica, vitamina C y moderada proporción de minerales como potasio y calcio, así como compuestos antioxidantes como fenoles y carotenoides (Alia *et al.*, 2012).

### 2.4.3 Aplicaciones

La especie de *Spondias purpúrea* L. es utilizada como:

- Alimento.- Sus frutos se comen crudos o en jaleas o mermeladas.
- Medicinal.- El fruto y las hojas empleados en infusión como astringente.
- Maderable.- Empleados para cercas vivientes (Valverde, 1998).

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### Introducción

En este capítulo se describirá la metodología experimental utilizada en el desarrollo del presente trabajo de investigación. Los métodos incluyen: recolección de frutas incluidas en el estudio, selección y preparación de las muestras, obtención de extractos acuosos y alcohólicos, desarrollo de los ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasas para determinar la capacidad antidiabética, evaluación del potencial de las frutas en estudio, y finalmente la elaboración y evaluación del producto alimenticio mediante la aplicación de tratamientos térmicos (bajo, medio, alto) de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en los ensayos.

#### 3.1 Recolección de frutas incluidas en el estudio

El material vegetal que se utilizó para este trabajo de investigación fueron los frutos de las especies *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum*, *Physalis peruviana* L. y *Spondias purpúrea* L.

### 3.1.1 Área de recolección

Tabla 7: Lugares de recolección de los frutos en estudio

Fruto	Lugar de recolección	Mes de recolección (Disponibilidad)	Altitud
joyapa ( <i>Macleania rupestris</i> )	Sector de Güel, en el cantón Sigsig (Azuay)	Octubre	2700 a 2940 m.s.n.m
mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> )	Parroquia de Guanujo, en el cantón Guaranda (Bolívar)	Octubre	2668 a 2935 m.s.n.m
uvilla ( <i>Physalis peruviana L.</i> )	Cantón Gualaceo (Azuay)	Todo el año	2370 a 2610 m.s.n.m
ciruelo ( <i>Spondias purpúrea L.</i> )	Parroquia de Ambuquí, en el cantón Ibarra (Imbabura)	Marzo	1500 a 2228 m.s.n.m

### 3.1.2 Ubicación geográfica de los frutos recolectados

La ubicación exacta del lugar donde se encuentran cada uno de los frutos de joyapa, mortiño, uvilla y ciruelo fue determinada por medio del programa ArcView GIS 3.2a facilitado por el Ing. Javier Valdiviezo O., docente de la Universidad del Azuay.

A continuación se muestra el mapa ecológico donde fueron recolectadas cada especie:

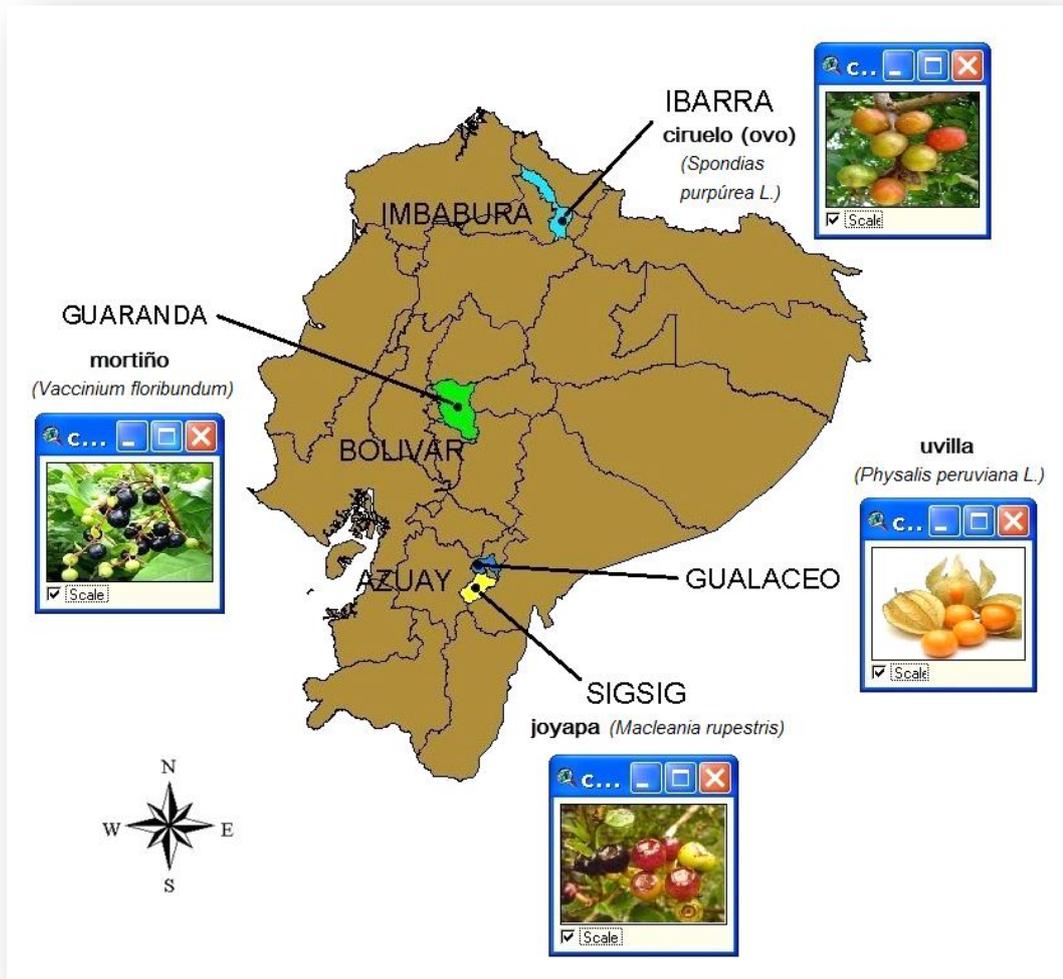


Figura 9: Mapa ecológico de los frutos recolectados

### 3.2 Selección y preparación de las muestras



Figura 10: Frutos de joyapa



Figura 11: Frutos de mortino



Figura 12: Frutos de uvilla



Figura 13: Frutos de ciruelo

Los frutos de joyapa, mortiño, uvilla y ciruelo fueron lavados y secados. Posteriormente los frutos de cada especie fueron seleccionados y clasificados de acuerdo a las mejores características físicas para su uso y conservación durante todo el tiempo que se necesita para el desarrollo de los ensayos.

Con respecto a los frutos que no se utilizaron en la preparación de los extractos acuosos y alcohólicos fueron conservados en congelación (-18°C) para su posterior utilización en la elaboración del producto alimenticio.

### **3.3 Obtención de extractos acuosos**

Para la obtención de los extractos acuosos, los frutos fueron macerados en agua y centrifugados a 5000 rpm para descartar residuos de pulpa y preservados en congelación hasta su procesamiento.

#### **3.3.1 Materiales, reactivos y equipos**

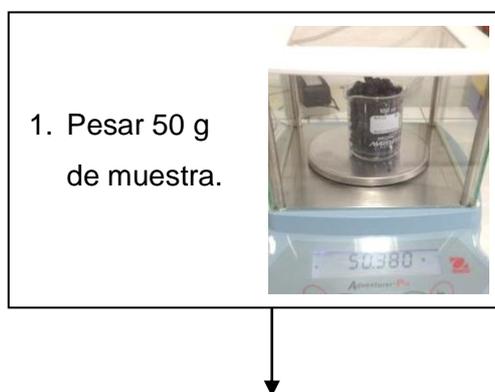
A continuación se describen (Tabla 8) los materiales, reactivos y equipos que se utilizaron para la obtención de los extractos acuosos:

Tabla 8: Materiales, reactivos y equipos utilizados en la obtención de los extractos acuosos.

Materiales	Reactivos	Equipos
Vasos de precipitación de 100 ml	Agua desionizada	Balanza analítica OHAUS
Probetas de 100 ml		Licadora Osterizer
Tubos falcon de 15 ml		Centrífuga 5804 eppendorf
Tubos eppendorf de 1,5 ml		
Varillas de vidrio		
Espátulas		
Gradillas		
Pipeta automática de 1000 $\mu$ l		
Puntas desechables		

### 3.3.2 Procedimiento

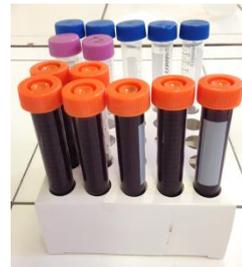
Mediante un diagrama se describe el procedimiento de preparación de los extractos acuosos para los frutos de joyapa, mortiño, uvilla y ciruelo que fueron seleccionados en el estudio:



2. Licuar la muestra con 100 ml de agua desionizada.



3. Recoger el licuado de la muestra o fruto y colocar en tubos falcon de 15 ml.



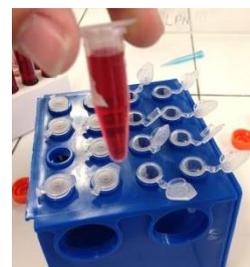
4. Centrifugar la muestra a 5000 rpm x 5 min.



5. Recoger la muestra del sobrenadante y colocar en los tubos eppendorf de 1,5 ml.



6. Tomar varias muestras del extracto acuoso, etiquetar y conservar en congelación para las pruebas de ensayo.



### 3.4 Obtención de extractos alcohólicos

Los frutos fueron macerados en etanol en condiciones de oscuridad y por un tiempo estimado de 96 horas. Los extractos alcohólicos fueron filtrados y concentrados al vacío donde se obtuvo las muestras de cada fruto que fueron utilizados en el desarrollo de los ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa.

#### 3.4.1 Materiales, reactivos y equipos

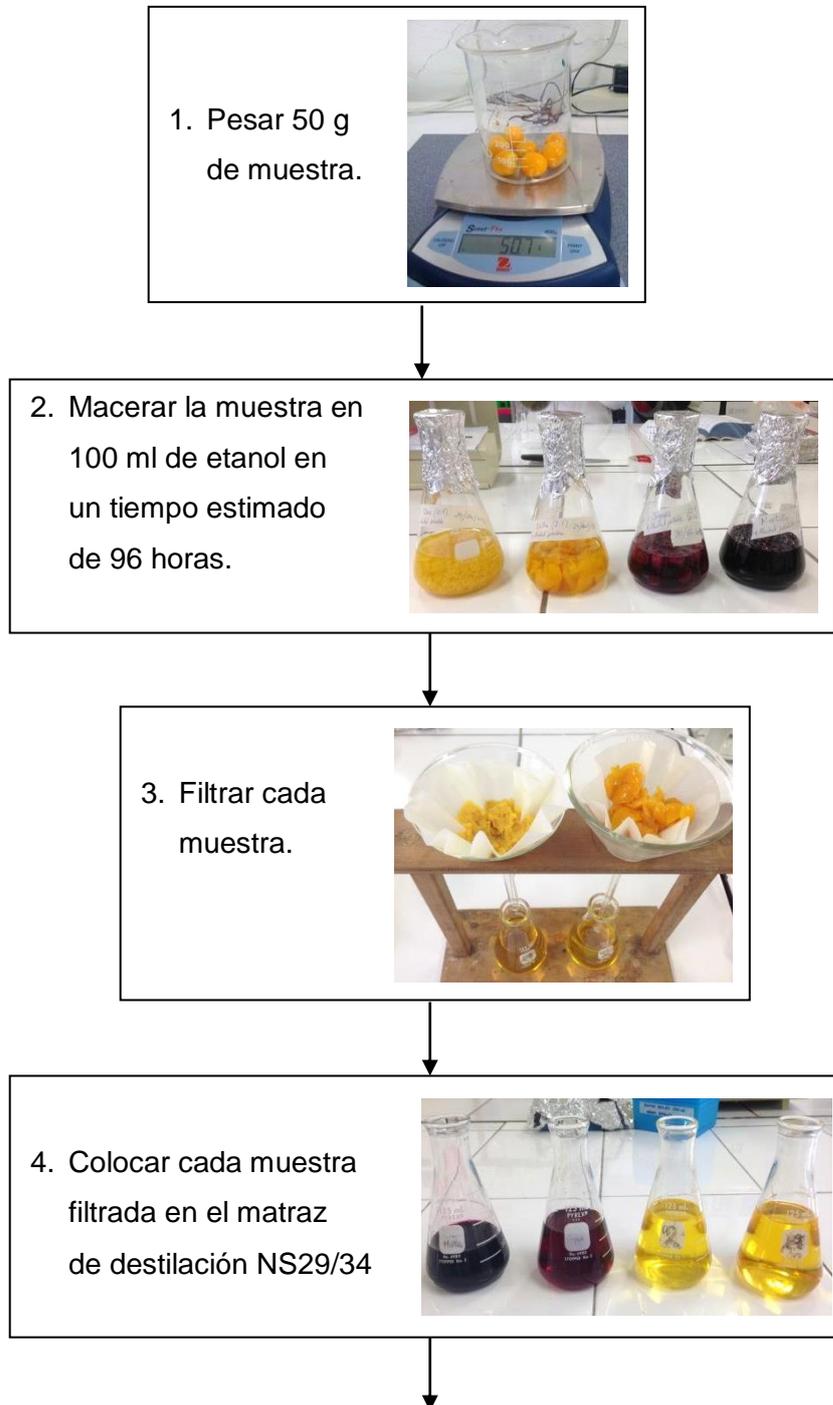
A continuación se describen (Tabla 9) los materiales, reactivos y equipos que se utilizaron para la obtención de los extractos alcohólicos:

Tabla 9: Materiales, reactivos y equipos utilizados en la obtención de los extractos alcohólicos.

Materiales	Reactivos	Equipos
Vasos de precipitación de 100 ml	Alcohol potable (Etanol)	Balanza analítica OHAUS
Probetas de 100 ml	Agua desionizada	Rotavapor R-215 BÜCHI
Matraces de destilación de 500 ml NS 29/34		
Erlenmeyers de 250 ml		
4 embudos de vidrio		
2 soportes de madera para filtración		
Varillas de vidrio		
Frascos microsampling		
Pipetas Pasteur		
Piseta		
Papel filtro		
Papel absorbente		
Papel aluminio		
Cuchillo esterilizado		

### 3.4.2 Procedimiento

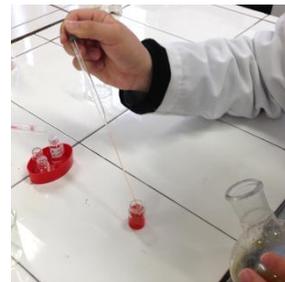
Mediante un diagrama se describe el procedimiento de preparación de los extractos alcohólicos para los frutos de joyapa, mortiño, uvilla y ciruelo que fueron seleccionados en el estudio:



5. Concentrar al vacío cada muestra filtrada en el rotavapor hasta evaporar todo el alcohol.



6. Con el uso de varias pipetas pasteur colocar cada muestra en los frascos microsampling.



7. Sellar con papel aluminio los frascos y hacer unos pequeños agujeros para dejar evaporar el alcohol que no ha sido eliminado en el rotavapor, durante 48 horas.



8. Pesar la muestra de cada frasco y obtener el rendimiento total de cada fruto.



### 3.5 Ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas $\alpha$ y $\beta$ glucosidasa

#### 3.5.1 Ensayos de inhibición de $\alpha$ - glucosidasa

La determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico, que cuantificó la liberación de p-nitrofenol del sustrato p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucósido en presencia de  $\alpha$ -glucosidasa. Se realizaron lecturas de absorbancia de varias muestras a distintas concentraciones conocidas de inhibidor ( $\lambda = 400 \text{ nm}$ ).

##### 3.5.1.1 Principio

p-Nitrofenil  $\alpha$ -D-Glucósido  $\xrightarrow{\alpha\text{-Glucosidasa}}$   $\alpha$ -D-Glucosa + p-Nitrofenol

##### 3.5.1.2 Condiciones

$T = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6.8$ ,  $A_{400\text{nm}}$

##### 3.5.1.3 Materiales, reactivos y equipos

A continuación se describen (Tabla 10) los materiales, reactivos y equipos que se utilizaron para los ensayos de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa:

Tabla 10: Materiales, reactivos y equipos utilizados en los ensayos de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa.

Materiales	Reactivos	Equipos
Celdas de cuarzo para espectrofotómetro	Sustrato: PNP-G (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucosidasa, Sigma Prod. No. N1377)	Balanza analítica OHAUS
Vasos de precipitación	PBS (Solución Buffer de Fosfato de Potasio, pH 6.8 a 37°C)	Incubadora Memmert
Varillas de vidrio	1M NaOH	Espectrofotómetro UV-Vis Thermo
Matríz de aforo de: 25 ml, 50 ml, 100 ml	1M HCl	
Tubos falcon de 15 ml	Enzima: $\alpha$ -glucosidasa, Sigma Chemical Co.	
Tubos eppendorf de 100 $\mu$ l y 1000 $\mu$ l	Inhibidor: Extractos alcohólicos	
Puntas desechables	Solución tampón: TRIS	
Espátulas	Agua desionizada	
Gradillas		

#### 3.5.1.4 Procedimiento

La detección de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, se realizó mediante la técnica propuesta por Matsui *et al.* 1996. La solución enzimática fue preparada con 5.7U (1 mg) por ensayo en un volumen de 3.22 ml de agua desionizada fría. Una unidad de  $\alpha$ -glucosidasa libera 1  $\mu$ mol de D-glucosa o p-nitrofenil (PNP) a partir de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucosidasa (PNP-G) por minuto a pH 6.8 a 37 °C (Matsui *et al.*, 1996). En éste ensayo se utilizaron tubos de 10 ml para realizar la reacción: 35  $\mu$ l de solución enzimática fueron adicionados a 35  $\mu$ l de inhibidor preparado a varias concentraciones (10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ g/ml) y se mantuvo a 37 °C por 5 minutos para alcanzar el equilibrio. La reacción se inició al agregar 930  $\mu$ l de PNP-

G (0.914 mM en 2500  $\mu$ l de PBS 67mM) y toda la mezcla fue incubada a 37 °C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada tubo 1 ml de solución TRIS (0.5 M) para detener completamente la reacción, obteniendo como volumen final 2 ml. Luego se mezcló por inversión y se transfirió a una celda espectrofotométrica para iniciar la lectura de absorbancia a 400 nm (Alejandro-Espinoza *et al.*, 2013).

Tabla 11: Esquema para la determinación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

<b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE <math>\alpha</math>- GLUCOSIDASA</b>				
<b>Soluciones</b>	<b>Muestra (B)</b>	<b>Blanco (D)</b>	<b>Control 1 (A)</b>	<b>Control 2 (C)</b>
INHIBIDOR	35 $\mu$ l	35 $\mu$ l	-	-
ENZIMA	35 $\mu$ l	-	35 $\mu$ l	-
H <sub>2</sub> O	-	35 $\mu$ l	35 $\mu$ l	70 $\mu$ l
Mezclar por inversión e incubar a 37°C por 5 min				
SUSTRATO	930 $\mu$ l	930 $\mu$ l	930 $\mu$ l	930 $\mu$ l
Mezclar por inversión e incubar a 37°C por 15 min				
TRIS	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Mezclar por inversión y leer en espectrofotómetro a 400 nm				

Fuente: Sarango, 2008



**Figura 14:** Procedimiento de los ensayos de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa

#### 3.5.1.4.1 Preparación de reactivos

Para el desarrollo de la técnica se preparó:

A. Solución tampón 50 mM TRIS, pH 8.0

Se prepararon 100 ml de solución madre de tris de concentración 50 mM. Se pesaron 6,06 g de TRIS y se agrega poco a poco a 100 ml con agua destilada, previamente colocados en un vaso de precipitación limpio. Se coloca la solución en el pHmetro y se ajusta el pH a 8.0 con 1M HCl. Se conserva a 4°C.

B. 67 mM Solución buffer de Fosfato de Potasio (PBS), pH 6.8 at 37°C

Se prepararon 100 ml en agua destilada usando 67 mM de Fosfato de Potasio. Se pesaron 0,912 g de fosfato de potasio y se afora a 100 ml con agua destilada. Se coloca la solución en el pHmetro y se ajusta el pH a 6.8 con 1M NaOH.

C. 0,914 mM de solución p-nitrofenil- $\alpha$ -D-Glucosidasa (PNP-G)

Se pesaron 0,028 g de PNP-G y se afora en 100 ml de PBS Buffer pH 6.8.

D. Solución enzimática  $\alpha$ -glucosidasa, 5,7 U

Por cada ensayo se preparó una solución enzimática de 5,7 U (1mg). Se pesaron 1mg de enzima  $\alpha$ -glucosidasa en un volumen de 3,22 ml de agua destilada fría. Después de cada ensayo, la enzima se mantiene en congelación (-18°C).

#### 3.5.1.4.2 Preparación de diluciones

Se prepararon 20 mg/ml de solución madre de cada extracto alcohólico. Las diluciones fueron realizadas mediante la siguiente formula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}$$

Donde,

$V_1$  = volumen del extracto

$C_1$  = Concentración de la solución madre (20 mg/ml)

$V_2$  = volumen de aforo (500  $\mu$ l )

$C_2$  = Concentración requerida (10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ g/ml)

### 3.5.1.5 Cálculo del % inhibición para los ensayos espectrofotométricos de $\alpha$ -glucosidasa

El porcentaje de inhibición para la enzima fue expresado usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \{1 - [(B - D)/(A - C)]\} \times 100\%$$

donde B fue la absorbancia de la muestra, D fue absorbancia del blanco, A fue la absorbancia del control 1 (sin inhibidor) y C fue la absorbancia del control 2 (sin inhibidor y sin solución enzimática) (Alejandro-Espinoza *et al.*, 2013).

### 3.5.2 Ensayo de inhibición de $\beta$ -glucosidasa

La actividad inhibitoria de la enzima  $\beta$ -glucosidasa se determinó mediante una prueba espectrofotométrica que cuantificó los productos de reacción del sustrato  $\beta$ -D glucósido en presencia de la enzima en estudio ( $\lambda = 410$  nm).

#### 3.5.2.1 Principio



### 3.5.2.2 Condiciones

T = 37°C, pH = 5.0,  $A_{410nm}$

### 3.5.2.3 Materiales, reactivos y equipos

A continuación se describen (Tabla 12) los materiales, reactivos y equipos que se utilizaron para los ensayos de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa:

Tabla 12: Materiales, reactivos y equipos utilizados en los ensayos de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa.

Materiales	Reactivos	Equipos
Celdas de cuarzo para espectrofotómetro	Sustrato: Salicina, Sigma Prod. No. S-0625	Balanza analítica OHAUS
Vasos de precipitación	DMSO	Incubadora Memmert
Varillas de vidrio	Tween 20 o SDS	Espectrofotómetro UV-Vis Thermo
Matríz de aforo de: 25 ml, 50 ml, 100 ml	Agua desionizada	Sonicador (dispositivo de ultrasonido)
Frascos ámbar de 250 ml y 500 ml	Inhibidor: Extractos acuosos y alcohólicos	Vórtex (agitador)
Tubos falcon de 15 ml	Enzima: $\beta$ -glucosidasa, Sigma Chemical Co.	
Tubos eppendorf de 1,5 ml	pH 5 buffer (Acetato de Sodio)	
Pipetas automáticas de: 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l, 5000 $\mu$ l	pH 10 buffer (Amoníaco/cloruro de amonio)	
Puntas desechables	1M HCl	
Espátulas		
Gradillas		

### 3.5.2.4 Procedimiento

**Las muestras se prepararon de la siguiente manera:** 25  $\mu$ l de DMSO, 25  $\mu$ l de la solución de 1% de Tween 20 y 2450  $\mu$ l de agua destilada se añadieron a 50  $\mu$ l de extracto. Después de la adición de cada disolvente, y con el fin de mejorar la disolución del extracto, las muestras se sometieron a ultrasonidos durante 20 min usando un aparato de ultrasonidos. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para el ensayo (Sánchez-Medina *et al.*, 2001).

**El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera:** 0,4 ml de sustrato (*p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, Sigma Chemical Co., 2mg/ml), 0,2 ml de muestra y 0,4 ml de solución tampón pH 5 se colocaron en un tubo y se incubó a 37° C durante 10 minutos; se añadieron 0,2 ml de solución de enzima ( $\beta$ -glucosidase Sigma Chemical Co., 20mg/ml) y la mezcla se incubó durante otros 30 min a 37° C. Después de este tiempo la reacción se terminó mediante la adición de 2,6 ml de solución tampón a pH 10. En el control positivo, se añadió una mezcla de disolventes en lugar del extracto, mientras que en el control negativo, se añadió solución tampón pH 10 en el inicio de la prueba con el fin de bloquear la actividad de la enzima (Sánchez-Medina *et al.*, 2001).



Figura 15: Procedimiento de los ensayos de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa

#### 3.5.2.4.1 Preparación de reactivos

Para el desarrollo de la técnica se preparó:

A. Solución buffer 100 mM Acetato de Sodio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ ), pH 5.0 a 37°C

Se pesaron 8,203 g de acetato de sodio y se aforó en 200ml con agua destilada; el pH se ajustó a 5.0 en 37°C con 1 M HCl.

B. Solución tampón amoníaco pH 10 (20°C)

Se pesaron 6,75 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en 57 ml de Amoniaco concentrado y se afora en 100ml con agua destilada.

C. 1% (p/v) de solución SDS

Para la solución se pesaron 1 g de dodecilsulfato sódico (SDS) en 100 ml de agua destilada.

D. Solución de sustrato Salicina, 2mg/ml

Se preparó en 25 ml de solución; pesando 50 mg de salicina y se aforó con agua destilada. Después de cada prueba de ensayo la solución de salicina es refrigerada a 4°C para evitar la degradación del reactivo.

E. Solución de enzima  $\beta$ -glucosidasa, 20 mg/ml

Por cada ensayo se preparó una solución enzimática de 20 mg/ml. Se pesaron 20 mg de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en agua destilada. Después de cada ensayo, la enzima se mantiene en congelación (-18°C).

#### 3.5.2.5 Cálculo del % inhibición para los ensayos espectrofotométricos de $\beta$ -glucosidasa

La absorbancia de las muestras de ensayo se midió a 410 nm y la actividad se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición enzimática} = 100 - \left[ \frac{(\text{Abs test} - \text{Abs negativa control})}{\text{Abs positiva control}} \times 100 \right]$$

(Sánchez-Medina *et al.*, 2001).

### 3.6 Evaluación del potencial de los frutos en estudio

Para cada fruto en estudio se evaluó el potencial enzimático de los ensayos de inhibición “in vitro” y los resultados permitieron caracterizar a tres de los frutos como inhibidores de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa. La fruta promisoría que obtuvo los mejores resultados en los ensayos fue evaluada como materia prima para el desarrollo del producto alimenticio.

### 3.7 Elaboración y evaluación del producto alimenticio

Se elaboró un jugo de frutas a base de mortíño preparado a la misma concentración agua-fruta (2:1) de los extractos acuosos. El jugo fue elaborado y sometido a tres niveles de temperaturas y tiempos diferentes de acuerdo al grado de pasteurización (baja, media, alta). Posteriormente, se evaluó la actividad inhibitoria de la enzima  $\beta$ -glucosidasa según la técnica estandarizada en esta investigación. Se estableció una comparación entre la actividad de la fruta y del jugo tratado térmicamente para establecer diferencias significativas en la actividad enzimática determinada.

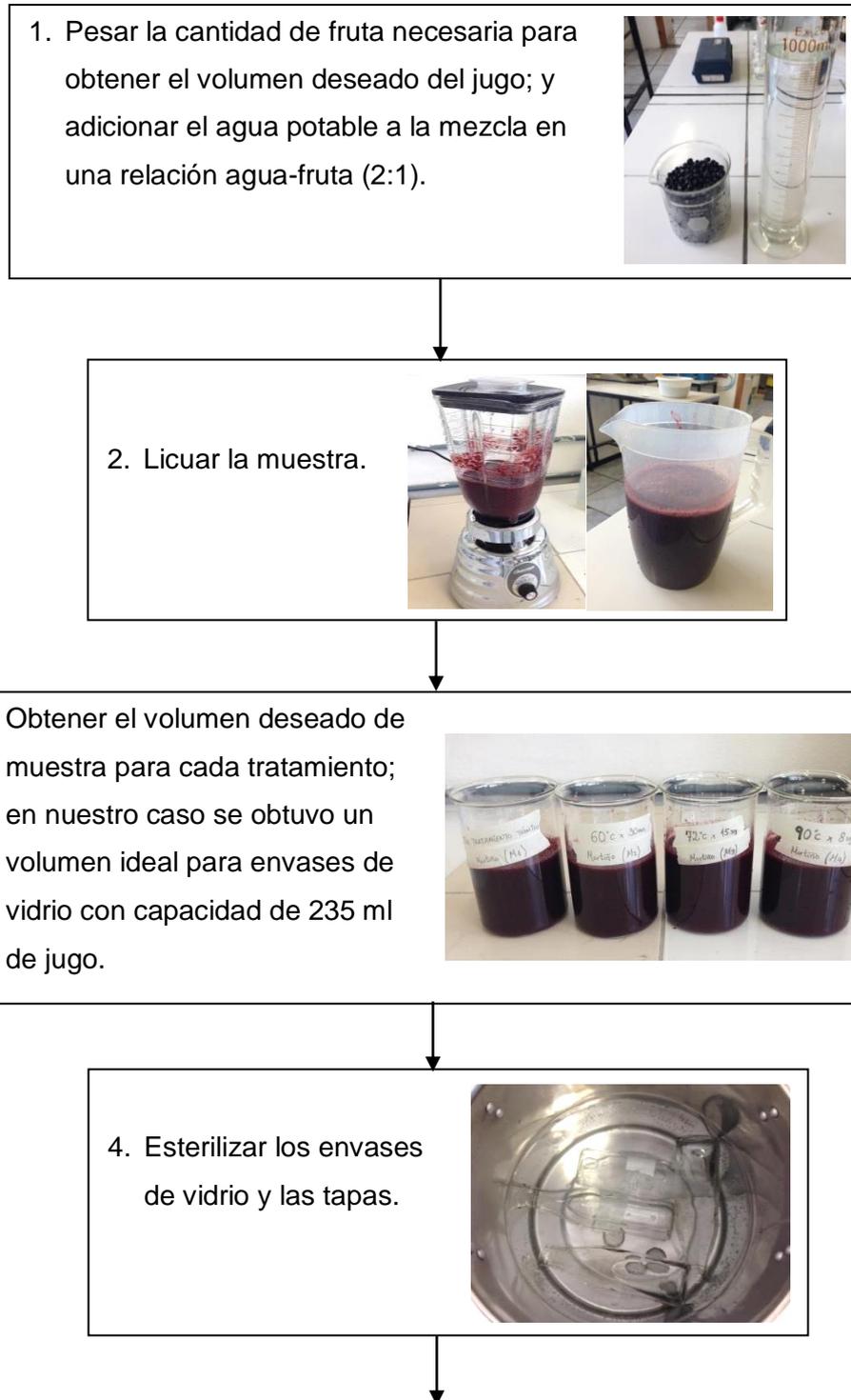
A continuación se describe las muestras de jugos que fueron analizadas a temperaturas y tiempos diferentes de acuerdo al tratamiento térmico:

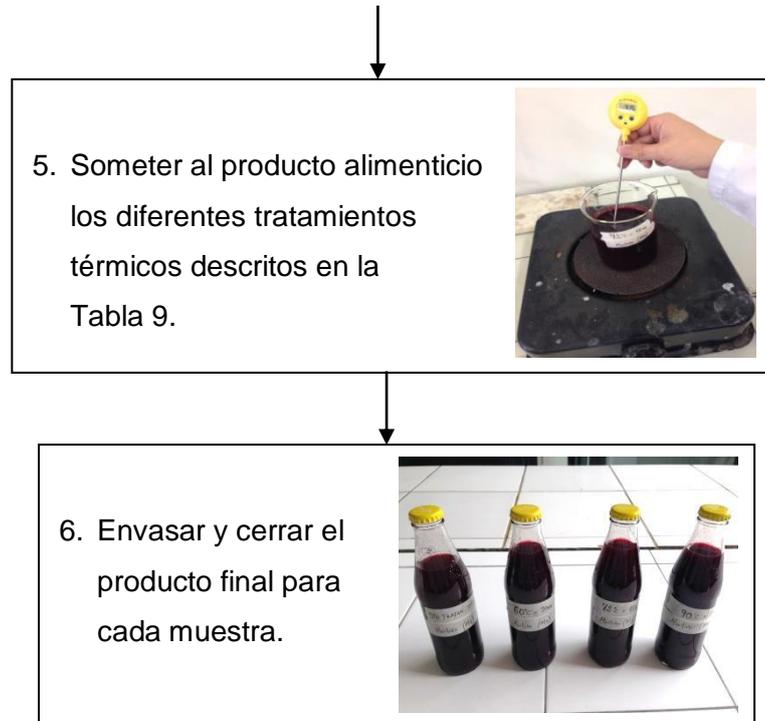
Tabla 13: Temperaturas y tiempos de tratamiento térmico.

Muestra	Tratamiento térmico
M1	Sin pasteurizar (fruto crudo)
M2	60°C x 30 min. (baja)
M3	72°C x 15 seg. (media)
M4	90°C x 5 seg. (alta)

### 3.7.1 Procedimiento para elaboración del producto alimenticio

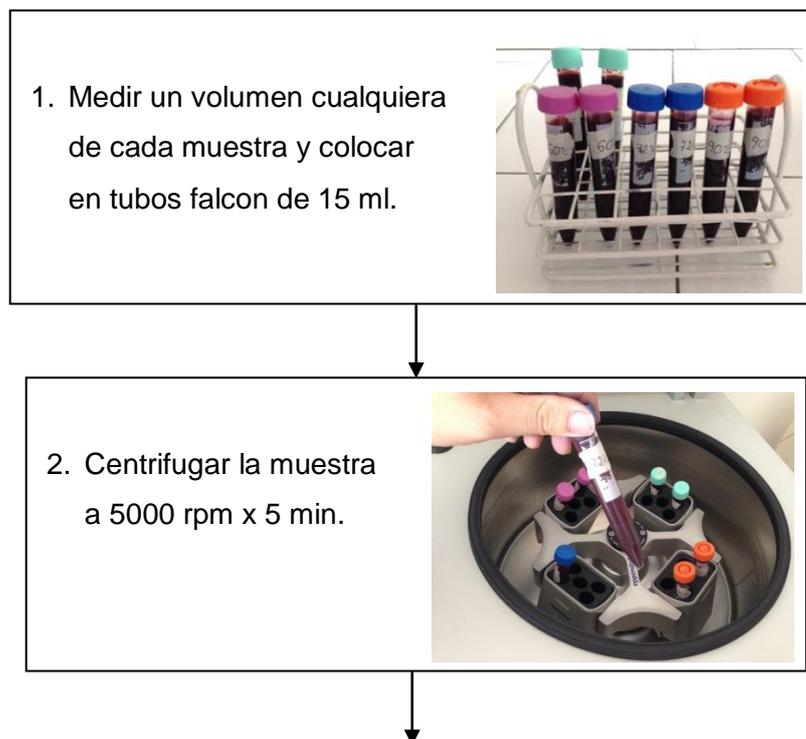
Mediante un diagrama se describe el procedimiento de preparación del jugo de frutas que fue sometido a tres niveles de temperaturas y tiempos diferentes:





### 3.7.2 Procedimiento para evaluación inhibitoria del producto alimenticio

Mediante un diagrama se describe el procedimiento de evaluación de la capacidad inhibitoria de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en el jugo de frutas sometido a diferentes tratamientos térmicos:



↓



3. Recoger la muestra del sobrenadante y colocar en los tubos eppendorf de 1,5 ml.



↓

4. Tomar varias muestras de cada tratamiento, etiquetar y conservar en congelación para las pruebas de ensayo.



↓



5. Desarrollo y evaluación de los ensayos de inhibición enzimática para  $\beta$ -glucosidasa en las diferentes muestras de jugo tratados térmicamente.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### Introducción

En el siguiente capítulo se presentan los rendimientos totales de los extractos alcohólicos obtenidos a partir de los frutos en estudio, los resultados de los extractos acuosos y alcohólicos en los ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa, y los datos obtenidos de la evaluación del producto alimenticio elaborado a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento.

#### 4.1 Rendimiento de los frutos en extractos alcohólicos (etanol)

Después de haber obtenido los extractos alcohólicos (etanol) de las muestras de joyapa, mortiño, uvilla y ciruelo, se procedió a realizar la diferenciación de los pesos iniciales (fruta + etanol) con los finales (después de la filtración y evaporación del alcohol) de cada fruta. En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos de los rendimientos totales de cada muestra.

Tabla 14: Rendimiento de los frutos en extractos alcohólicos

Fruto	% Rendimiento total
joyapa	8.56
mortiño	19.20
uvilla	28.71
ciruelo	19.69

## 4.2 Ensayos de inhibición “in vitro” de las enzimas $\alpha$ y $\beta$ glucosidasa

### 4.2.1 Ensayos de $\alpha$ -glucosidasa

A continuación se presentan (Tabla 15) los resultados obtenidos de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, para los extractos alcohólicos de los frutos en estudio.

Tabla 15  
Inhibición  $\alpha$ -glucosidasa

EXTRACTOS ALCOHÓLICOS							
Joyapa		Mortiño		Uvilla		Ciruelo	
Conc. (ug/ml)	% Inh	Conc. (ug/ml)	% Inh	Conc. (ug/ml)	% Inh	Conc. (ug/ml)	% Inh
10	17.95	10	21.82	10	13.27	10	7.27
50	39.50	50	43.37	50	29.57	50	13.43
100	50.42	100	58.63	100	47.17	100	27.03
500	61.02	500	75.13	500	64.51	500	46.10
1000	76.89	1000	89.18	1000	74.79	1000	53.07

Conc.: Concentración del extracto

% Inh: Porcentaje de inhibición de la enzima

### 4.2.2 Ensayos de $\beta$ -glucosidasa

A continuación se presentan (Tabla 16) los resultados obtenidos de inhibición de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, para los extractos acuosos y alcohólicos de los frutos en estudio.

Tabla 16  
Inhibición  $\beta$ -glucosidasa

Muestra	% inhibición enzimática	
	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ALCOHÓLICO
joyapa	53.43	76.06
mortiño	76.96	87.50
uvilla	62.75	73.33
ciruelo	31.82	57.14

### 4.3 Evaluación del potencial de los frutos en estudio

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición enzimática permitieron caracterizar a tres frutos como inhibidores de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa. Los frutos que tienen una actividad inhibitoria promisorio son: la joyapa, el mortiño y la uvilla.

La fruta promisorio que fue evaluada como materia prima para el desarrollo del producto alimenticio tipo jugo de frutas fue el mortiño (*Vaccinium floribundum*), por obtener los mejores resultados en los ensayos de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa en extractos acuosos y alcohólicos. La fruta de mortiño tiene el potencial de inhibir más del 85% a las enzimas de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa.

### 4.4 Evaluación del producto alimenticio

En la Tabla 17 se muestran los porcentajes de inhibición para la enzima  $\beta$ -glucosidasa de cada muestra de jugo de mortiño tratado térmicamente. La actividad inhibitoria de las diferentes muestras de jugo (Tabla 17) frente a  $\beta$ -glucosidasa, indica que la muestra de jugo a 60°C x 30 min. (pasteurización baja) tiene un valor de 83.95% frente a 73.42% de 90°C x 10 seg. (pasteurización alta) y 68.16% de 72°C x 15 seg. (pasteurización media).

A continuación se presentan (Tabla 17) los resultados obtenidos de inhibición de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, para las muestras de jugo en fruto crudo y tratados térmicamente.

Tabla 17  
Inhibición  $\beta$ -glucosidasa del producto alimenticio

Tratamiento Térmico	% inhibición enzimática
Sin pasteurizar (fruto crudo)	73.42
60°C x 30 min. (baja)	83.95
72°C x 15 seg. (media)	68.16
90°C x 5 seg. (alta)	73.42

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### Introducción

En este capítulo se analizan los resultados obtenidos en la investigación, señalando los frutos más relevantes como inhibidores de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa y su implicación en el área de desarrollo de nutraceúticos.

#### 4.1 Discusión

El objetivo de una terapia antidiabética en pacientes insulino dependientes (Diabetes Tipo 1) e insulino independientes (Diabetes Tipo 2) es alcanzar la normoglicemia y reducir la resistencia a la insulina con la intención de mejorar el control metabólico y prevenir al paciente diabético futuras complicaciones (Onal *et al.*, 2005). Una estrategia efectiva para el manejo de la diabetes Tipo 1 y 2 es la inhibición de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa, a fin de retardar la absorción de los carbohidratos, moderando así la elevación postprandial de azúcar en la sangre y minimizando los efectos de la dieta en la hiperglicemia (Bischoff, 1994).

La actividad inhibitoria de los extractos alcohólicos (Tabla 15) de cada fruto frente a  $\alpha$ -glucosidasa, muestra que el mortiño a una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  tiene un valor de 89.18% frente al 76.89% de joyapa y 74.79% de uvilla, esto sugiere que el extracto alcohólico de mortiño tiene una actividad inhibitoria promisoria relevante frente a  $\alpha$ -glucosidasa. Los datos de los extractos alcohólicos de ciruelo no se presentan ya que no demostraron actividad inhibitoria importante.

Así mismo, se demuestra que a las concentraciones de 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  los porcentajes de inhibición frente a  $\alpha$ -glucosidasa (Tabla 15) de los extractos alcohólicos del mortiño, poseen una actividad inhibitoria relevante en comparación con la joyapa y uvilla. Los extractos alcohólicos del mortiño, joyapa y uvilla

demuestran tener una actividad inhibitoria prometedora frente a  $\alpha$ -glucosidasa siendo el extracto del mortiño el más inhibitorio a una concentración 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

La actividad inhibitoria de los extractos acuosos (Tabla 16) frente a  $\beta$ -glucosidasa, muestra que el fruto de mortiño tiene un valor de 76.96% frente 62.75% de la uvilla, esto sugiere que el extracto de mortiño tiene una actividad inhibitoria promisoriosa relevante frente al control positivo. Los datos de los extractos acuosos de joyapa con 53.43% y ciruelo con 31.82%, demostraron actividad inhibitoria muy baja, por lo que no tienen el suficiente potencial de inhibir a la enzima  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, se demuestra que en los extractos alcohólicos (Tabla 16) los porcentajes de inhibición son mayores en comparación con los extractos acuosos. Así mismo, la actividad inhibitoria de los extractos alcohólicos frente a  $\beta$ -glucosidasa, muestra que el fruto de mortiño tiene un valor de 87.50%, posee una actividad inhibitoria relevante en comparación con la joyapa que tiene el 76.06% y la uvilla con el 73.33%.

Los extractos alcohólicos en etanol demuestran tener una actividad inhibitoria prometedora frente a  $\beta$ -glucosidasa siendo el extracto del mortiño el más inhibitorio. En la Tabla 16 nos muestra que los datos obtenidos en los extractos alcohólicos son mayores a los extractos acuosos, por tanto, para el desarrollo de los ensayos de  $\beta$ -glucosidasa es mejor la obtención de extractos mediante solventes.

Algunos autores evidencian la consideración del fruto de mortiño como medicinal ya que al ser consumido crudo ayuda a restablecer los niveles normales de azúcar en la sangre y al consumir el fruto cocido trata problemas de hipoglicemia, gripe y diabetes. También sirve para problemas digestivos, vasculares, entre otros (Aguilar, 2009), información etnobotánica cita que el fruto cocido es útil para el tratamiento de los diabéticos (Ríos *et al.*, 2007), por tanto, en comparación con las hipótesis de los autores sobre la consideración del fruto de mortiño y los datos obtenidos en esta investigación de las muestras de mortiño en extractos acuosos y alcohólicos y en los jugos tratados térmicamente es correcta.

Hoy en día nos encontramos inmersos en un cambio en el concepto de alimento y en nuestra forma de alimentarnos. Actualmente, al momento de elegir los alimentos que se va a consumir no solo se está considerando las propiedades nutritivas y sensoriales sino también se reconoce el papel que toman los alimentos como

protectores de la salud. Los extractos acuosos y alcohólicos, y las muestras de jugo tratados térmicamente de la especie *Vaccinium floribundum* al poseer una actividad inhibitoria relevante frente a dichas enzimas demuestran ser candidatos prometedores que puedan ser útiles en el tratamiento de la diabetes Tipo 2.

La muestra de jugo a 60°C x 30 min. tiene una actividad inhibitoria promisorio relevante frente al control positivo de  $\beta$ -glucosidasa. En lo que respecta al resultado obtenido (Tabla 17) de la muestra de jugo sin haber sido sometido a tratamiento térmico (fruta cruda), indica un 73.42% de actividad inhibitoria frente a  $\beta$ -glucosidasa, por tanto, en comparación con las muestras tratadas térmicamente, no existe una pérdida significativa del potencial inhibitorio. Sin embargo, se demuestra que a 60°C x 30 min. el porcentaje de inhibición es mayor en comparación con la muestra sin pasteurizar; a 90°C x 10 seg. el porcentaje de inhibición se mantiene; y a 72°C x 15 seg. la actividad inhibitoria es menor significativamente. Las muestras de jugo de la Tabla 17 demuestran tener una actividad inhibitoria prometedora frente a  $\beta$ -glucosidasa siendo el jugo de mortiño a 60°C x 30 min. el de mayor potencial.

La importancia del desarrollo de investigaciones en frutos nativos no tradicionales como es el caso de la joyapa, el mortiño y la uvilla, ayudará a enfatizar estas nuevas tendencias de alimentarnos mejor cada día, procurando la salud ante todo. Como experiencia de este proceso de investigación se demuestra que los frutos de joyapa, mortiño y uvilla son frutos promisorios para el desarrollo de alimentos funcionales ya que dichos frutos aportarían un valor extra a los alimentos que se puedan manufacturar a base de éstos, presentando altos beneficios en el control de la diabetes, por su actividad inhibitoria frente a las enzimas de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa.

## CONCLUSIONES

El desarrollo de la presente investigación condujo a las siguientes conclusiones:

1. Las especies de *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum* y *Physalis peruviana* L. han demostrado tener actividades antihiper glucemiantes promisorias que muestran la potencialidad de los extractos acuosos y alcohólicos frente a las enzimas de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa como agentes nutracéuticos en el tratamiento de esta enfermedad.
2. El consumo de los frutos de joyapa, mortiño y uvilla son fuente de inhibidores de  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa en la dieta de pacientes diabéticos.
3. Por medio de procesos conocidos y adecuados al medio de fabricación se consiguió elaborar un producto alimenticio (jugo de frutas) a base de mortiño que fue sometido a varios tratamientos térmicos entre éstos 60°C x 30 min. (pasteurización baja), 72°C x 15 seg. (pasteurización normal o media) y 90°C x 5 seg. (pasteurización alta).
4. Realizando los mismos ensayos, utilizados para evaluar la capacidad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa, se determinó que el jugo en su estado natural y tratados térmicamente tienen la capacidad de inhibir las enzimas involucradas en el mecanismo de la diabetes 1 y 2. Sin embargo, cabe indicar que el jugo de mortiño tratado térmicamente a 60°C x 30 min. en comparación con el jugo en su estado natural, es de mayor potencial.
5. Se demuestra que la hipótesis de las propiedades antihiper glucemiantes de los frutos de mortiño fue válida.

## RECOMENDACIONES

Mediante un análisis del trabajo de investigación realizado se llegó a las siguientes recomendaciones:

1. Se recomienda realizar estudios similares ya que existe poca información y trabajos de investigación de este tema. Además sería de gran valor científico lograr identificar otras propiedades beneficiosas de las especies *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum*, *Physalis peruviana L.* y *Spondias purpúrea L.*
2. Se recomienda el consumo de estos frutos como componentes de la dieta de pacientes diabéticos.
3. La fruta más recomendada para el consumo como alimento crudo, cocido o industrializado (jugos, mermeladas, jaleas, enlatados, etc.) es el mortiño ya que dicho fruto son de cosecha estacional. La cosecha se da desde el mes de octubre hasta noviembre, por esta razón se recomienda manufacturar productos de larga vida.
4. En la generación e innovación de nuevos productos de alimentos funcionales se puede considerar la mezcla de algunas frutas entre éstas la joyapa, mortiño y uvilla, como antihiperoglucemiantes en pacientes diabéticos.
5. Una de las dificultades de este proyecto fue la no existencia de grandes cantidades de cultivos de joyapa y mortiño en zonas propicias cercanas a la ciudad de Cuenca, todas las plantas encontradas se encuentran en estado silvestre, por lo que la disponibilidad de estos frutos se da durante una sola vez al año. Se recomienda el cultivo de estas frutas para su posterior industrialización.

## BIBLIOGRAFÍA

### Referencias Bibliográficas

AGUILAR, Z. (2009). *Guía de plantas útiles de los páramos de Zuleta, Ecuador*. EcoCiencia, Proyecto Páramo Andino. Programa de Apoyo a la Gestión Descentralizada de los Recursos Naturales en las Tres Provincias del Norte del Ecuador, pág. 99.

ALEJANDRO-ESPINOSA, M., Jaramillo-Fierro, X., Ojeda-Riascos, S., Malagón-Aviles, O., Ramírez-Robles, J. (2013). Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas*, 12(1): 59 – 68.

ALIA, I., Astudillo, Y.I., Núñez, C.A., Valdez, L.A., Bautista, S., García, E., Ariza, R. & Rivera, F. (2012). Caracterización de frutos de ciruela mexicana (*Spondias purpúrea* L.) del sur de México. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(5): 21-26.

BARCELÓ, A. (2001). *La diabetes en las Américas*. Boletín Epidemiológico / Organización Panamericana de la Salud, 22 (2): 1-3.

BISCHOFF, H. (1994). Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(3): 385-411.

BHATIA, Y., Mishra, S. & Bisaria, V.S. (2002). "Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties and applications". *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (4): 375-407.

BREVES, R., Bronnenmeier, K., Wild, N., Lottspeich, F., Staudenbauer, W.L., Hofemeister, J. (1997). Genes encoding two different beta-glucosidases of *Thermoanaerobacter brockii* are clustered in a common operon. *Applied and environmental microbiology*, 63 (10): 3902-3910.

BRICEÑO, C. (2007). "Proyecto de factibilidad para la producción y exportación de uvilla al mercado alemán, periodo 2008 – 2018". Tesis para optar el Título de Ingeniería de comercio exterior e integración. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito-Ecuador.

CALVO, J.I. (2009). *El cultivo de la uchuva (Physalis peruviana)*. Proyecto Microcuenca Plantón – Pacayas Boletín técnico No.10. San José-Costa Rica.

CASTILLO, E., & Solís, I. (2007). Manual de Fitoterapia. Barcelona, España: Elsevier, p. 380-382.

CHAPARRO, M. L., & de Carrillo, N. M. (1991). Anatomía del fruto de *Macleania rupestris* (H: B: K) AC Smith (Uva camarona). *Agronomía Colombiana*, 8(2), 286-305.

CHICAIZA, G. (2008). Inventario de enfermedades fungosas de la uvilla (*Physalis peruviana*) en las parroquias de Yaruqui y Amaguaña del cantón Quito, provincia de Pichincha. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda-Ecuador.

DE LA MATA, I., Estrada, P., Macarrón, R., Domínguez, J.M., Castillón, M.P. & Acebal, C. (1992). Chemical mechanism of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Biochemical Journal*, 283 (Pt 3): 679-682.

DE LA TORRE, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU.

DEMBINSKA-KIEC, A., Mykkänen, O., Kiec-Wilk, B. & Mykkänen, H. (2008). Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 99: 109-117.

DURÁN-CASAS, S., Veloza Suan, C., Magnitskiy, S., & Lancheros, H. O. (2013). Evaluation of uva camarona (*Macleania rupestris* Kunth AC Smith) propagation with air layering. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 18-26.

FERNÁNDEZ, I. (2001). Actualización en antidiabéticos orales. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 25 (2): 33-45.

FLÓREZ, J. (1997). *Farmacología Humana* (3ª ED.), Barcelona, España: Masson, S.A., p.927

FREDERICKSON, D.S. & Sloan, H.R. (1972). "The metabolic basis of inherited disease". (Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. & Frederickson, D.S., Eds.) McGraw-Hill, New York. pp. 7730.

FUKUDA, T., Roberts, A., Plotz, P., & Raben, N. (2007). Acid alpha-glucosidase deficiency (pompe disease). *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 7(1): 71-77.

GAO, H., Huang, Y.N., Xu, P.Y., & Kawabata, J. (2007). Inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food Chemistry*, 105: 628–34.

GERICH, J. (2001). Matching Treatment to Pathophysiology in Type 2 Diabetes. *Clinical Therapeutics*, 23, 646-659.

GRÄBNITZ, F., Rücknagel, K.P., Seiss, M., Staudenbauer, W.L. (1989). Nucleotide sequence of the *Clostridium thermocellum* bgIB gene encoding thermostable beta-glucosidase B: homology to fungal beta-glucosidases. *Molecular & general genetics*, 217 (1): 70-76.

HE, S. & Withers, S.G. (1997). "Assignment of Sweet Almond  $\beta$ -Glucosidase as a Family 1 Glycosidase and Identification of Its Active Site Nucleophile". *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (40): 24864-24867.

HENRISSAT, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities". *Biochemical Journal*, 293 (Pt 2): 781-784.

HENRISSAT, B. & Davies, G. (1997). "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolase". *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5): 637-644.

JORGENSEN, P.M., León-Yáñez, S. (1999). Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador. *Missouri Botanical Garden*. USA

KUMAR, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5 (9): 19-29.

LAGOS-BURBANO, T. C., Ordóñez-Jurado, H., Criollo-Escobar, H., Burbano, S., & Martínez, Y. (2010). Descripción de frutales nativos de la familia Ericaceae en el altiplano de Pasto, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(1), 9-18.

LI, B., Renganathan, V. (1998). Gene cloning and characterization of a novel cellulose-binding  $\beta$ -glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, 64 (7): 2748-2754.

LOJÁN, L. (2003). *El Verdor de los Andes Ecuatorianos: realidades y promesas*. Ecuador: SOBOC Grafic. 296 pp.

MADRIÑAN, C.E. (2010). "Caracterización morfológica de accesiones de *Physalis Peruviana* L. del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira" (Tesis para optar el Título de Magíster en Ciencias). Universidad Nacional de Colombia, Palmira-Colombia.

MATSUI, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., Osajima, Y. (1996). In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60(12): 2019 - 2022.

MCVIE-WYLIE, A., Lee, K., Qiu, H., Jin, X., Do, H., Gotschall, R., Thurberg, B., Rogers, C., Raben, N., O'Callaghan, M., Canfield, W., Andrews, L., McPherson, J. & Mattaliano, R. (2008). Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid  $\alpha$ -glucosidase preparations evaluated for the treatment of pompe disease. *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*, 94(4): 448-455

MUÑOZ, V.V. (2004). *Determinación de Métodos para producción de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth), con fines de Propagación y Producción Comercial*. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Agroempresas. Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador.

NEGRI, G. (2005). Diabetes melito: plantas e principios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 121-142.

ÖNAL, S., Timmur, S., Okuttucu, B. & Zihnioglu. (2005). Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35:29-36.

PALMERI, R., Spagna, G. (2007).  $\beta$ -glucosidase in celular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 382-9.

PÉREZ, S.J., & Valdivieso, C.D. (2007). Colección y caracterización morfológica in situ del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunt*) en la sierra norte de Ecuador. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agropecuario. Universidad Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí-Ecuador.

RÍOS, M., Koziol, M.J., Pedersen, H.B., y Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: publicaciones, retos y perspectivas*. Quito – Ecuador, Ediciones Abya-Yala, pág. 652.

RIOU, C., Salmon, J., Vallier, M., Gunata, Z., Barrei, P. (1998). Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 3607-3614.

SÁNCHEZ-MEDINA, A., García-Sosa, K., May-Pat, F. and Peña-Rodríguez, L.M. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan traditional medicine. Part I. Antioxidant, antimicrobial and  $\beta$ -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8(2): 144-151

SARANGO, V. (2008). "Determinación de la actividad antidiabética de los extractos totales de nueve especies vegetales nativas del Sur del Ecuador: *Piper crassinervium* (Guabiduca), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Croton wagneri* (Mosquera), *Costus comosus* (Caña agria), *Verbena litoralis* (Verbena) y *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo) mediante ensayos de inhibición de alfa amilasa y alfa glucosidasa". Tesis para optar el Título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja-Ecuador.

SCHIEBER, A., Stintzing, F.C. and Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent development. *Trends in Food Science & Technology*, 12: 401-413.

SIMÕES-PIRES, C., Hmicha, B., Marston, A. & Hostettmann, K. (2009). A TLC bioautographic method for the detection of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitors in plant extracts. *Phytochemical Analysis*, 20 (6): 511-515.

SUE, M., Yamazaki, K., Yajima, S., Nomura, T., Matsukawa, T., Iwamura, H. & Miyamoto, T. (2006). Molecular and Structural Characterization of Hexameric  $\beta$ -D-Glucosidases. *Wheat and Rye Plant Physiology*, 141: 1237-1247.

SULCA, L. (2011). Estudio retrospectivo de las patologías más frecuentes asociadas a diabetes tipo II diagnosticadas en el I.E.S.S periodo 2005 – 2010. Tesis para optar el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico. Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador.

TAYLOR, M.P., Eley, K.L., Martin, S., Tuffin, M.I., Burton, S.G., Cowan, D.A. (2009). Thermophilic ethanologensis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in Biotechnology*, 27 (7): 398-405.

TRUJILLO, D. (2008). *Cultivo in vitro del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)* (Tesis para optar el Título de B.S. en Biotecnología). Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador.

VALVERDE, F.M. (1998). *Diversidad de la Vegetación*. En Fundación Ecuatoriana de Estudios Ecológicos. Editor, Plantas Útiles del Litoral Ecuatoriano (pp. 35). Guayaquil, Ecuador: Ministerio de Medio Ambiente/ECORAE/EcoCiencia.

VAN DE LAAR, F.A., Lucassen, P.L., Akkermans, R.P., Van de Lisdonk, E.H., Rutten, G.E. & Van Weel, C. (2005).  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors for Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 28(1): 166-1754

VAN DEN EYNDEN, V., Cueva, E. & Cabrera, O. (1999). *Plantas Silvestres Comestibles del Sur del Ecuador*. Quito – Ecuador, Ediciones Abya-Yala. 221 pp.

VASCO, C., Rihinen, K., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 8274–8281.

### Referencias Electrónicas

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2006). Información sobre la diabetes [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/), en: American Diabetes Association. <http://www.diabetes.org/espanol/diabetes-tipo-2/medicamentos-via-oral.jsp>. Consultado en Octubre de 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2006). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 20(1): S43 – S48. Consultado en Octubre de 2013. [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/).

BARCELÓ, A., Carrasco, E., Duarte, E., Cañete, F., Gagliardino, J. (2009). Paso a paso en la educación y el control de la diabetes: Pautas de atención integral. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. Consultado en Octubre de 2013. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_joomlabookyltemid=259ytask=display&d=220y lang=es](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_joomlabookyltemid=259ytask=display&d=220y lang=es).

MEDLINEPLUS. (2011a). Diabetes tipo 1. Consultado el 16 de junio de 2013. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000305.htm>.

MEDLINEPLUS. (2011b). Diabetes tipo 2. Consultado el 16 de junio de 2013.  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000313.htm>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Nota descriptiva N°312 Noviembre de (2008). Consultado en octubre de 2013.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/print.html>.

USDA. (2010). National nutrient database for standard reference. Consultado en octubre de 2013.  
<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2184?fg=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Stats&new>.

WILD, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. (2004). Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047. Consultado en junio de 2013  
<http://www.who.int/diabetes/facts/en/diabcare0504.pdf>.