



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación *in vitro* del efecto de un
extracto de frutos de *Physalis peruviana*
sobre algunas carbohidrasas intestinales**

Diana Patricia Rey Padilla

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia

2013

Evaluación *in vitro* del efecto de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales

Diana Patricia Rey Padilla

Tesis de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias Farmacología

Director (a):

Director (a):

Q.F, PhD Diana Marcela Aragón Novoa

Línea de Investigación:

Farmacología Experimental

Grupo de Investigación:

Principios Bioactivos en Plantas Medicinales

Y

Tecnología de Productos Naturales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C, Colombia

2013

*"I've loved, I've laughed and cried.
I've had my fill, my share of losing.
And now, as tears subside,
I find it all so amusing
To think I did all that.
And may I say, not in a shy way,
'Oh, no, oh, no, not me, I did it my way'"*

FRANK SINATRA

Agradecimientos

A Dios que ha guiado cada una de las etapas de mi vida, me ha dado la fortaleza para cumplir mis sueños y las bendiciones para siempre estar agradecida con Él.

A mi familia, en especial a mi madre, quienes me dieron todo su amor incondicional, la infinita paciencia, la energía y motivación para seguir adelante.

A la Universidad Nacional de Colombia por hacerme buscar la verdad en las aulas de la academia "Inter Aulas Academiæ Quære Verum".

A mi directora de Tesis Marcela Aragón, a quien le tengo tanto admiración como gratitud por su paciencia y aportes en mi vida profesional, su amistad, confianza y apoyo incondicional.

Al Departamento de Farmacia que no solo prestaron su infraestructura y laboratorios para mis ensayos sino también me aportaron su conocimiento y me hacen amar cada día más mi profesión, principalmente a los profesores José Julián López, Ilvar Muñoz, Javier Rincón, Maritza Rojas y Jaiver Rosas.

A todo el grupo de investigación: Paola, Reina, Jimena, María Isabel, Hilbert, Aura y en especial al profesor Luis Fernando, quienes siempre estuvieron dispuestos a prestarme su colaboración y estuvieron pendientes de mis avances durante todo el posgrado.

A mis amigos del Colegio Mayor de San Bartolomé que son como mis hermanos y quienes me han impulsado siempre a ser más para servir mejor.

A mis amigos de la Universidad: Sandra, Eduardo, Francisco, Sergio, Germán y Robin que me ayudaron en la edición, estadística, diseño gráfico y sobredosis de motivación.

A todos y cada uno de mis compañeros del posgrado Andrea, Diana, Daniel, Juan Camilo, Jimmy, Manuel, María Paula y Paola, gracias por su alegría, acompañamiento, afecto y comprensión.

A todos y cada uno de los estudiantes de pregrado de quienes tuve el privilegio de ser su docente auxiliar, en especial Virginia y Marcela, gracias por enseñarme tantas cosas, motivarme a ser una mejor colega y mostrarme la posibilidad de un futuro mucho mejor.

Resumen

Las últimas décadas han observado un incremento mundial en la incidencia y prevalencia de la Diabetes mellitus tipo 2, en la actualidad se utilizan una gran variedad de hipoglicemiantes. Entre estos, se encuentran los inhibidores de carbohidrasas intestinales cuyo enfoque es inhibir enzimas tales como alfa amilasa y alfa glucosidasas, que son responsables de la hidrólisis de los carbohidratos. Una gran variedad de investigaciones científicas recientes muestran que varias sustancias aisladas de las plantas tienen actividad hipoglicemiante y su principal modo de acción es inhibir las carbohidrasas intestinales. El presente trabajo estuvo dirigido a evaluar la inhibición de carbohidrasas intestinales de un extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* L. que en anteriores trabajos, de nuestro grupo de investigación, ha demostrado actividad hipoglicemiante, estableciendo su concentración inhibitoria 50 y su comportamiento cinético. Para ello se evaluaron y adaptaron metodologías propuestas en la literatura y se establecieron las mejores condiciones de tiempo de incubación, concentración enzimática y concentración de sustrato, para evaluar la actividad *in vitro* de posibles inhibidores enzimáticos.

Palabras clave: *Physalis peruviana*, carbohidrasas intestinales, alfa glucosidasas, alfa amilasa, actividad hipoglicemiante, concentración inhibitoria 50.

Abstract

The last decades have seen a worldwide increase in the incidence and prevalence of type 2 diabetes, currently using a variety of hypoglycemic agents. Among these inhibitors are intestinal carbohydrases whose approach is to inhibit enzymes such as alpha amylase and alpha glucosidase, which are responsible for the hydrolysis of carbohydrates. A variety of recent scientific research shows that several substances isolated from plants have hypoglycemic activity and its main mode of action is to inhibit intestinal carbohydrases. The present study was aimed to evaluate the inhibition of intestinal carbohydrases of an ethanol extract of fruits of *Physalis peruviana* L. in previous work, our research group has demonstrated hypoglycemic activity, establishing its inhibitory concentration 50 and its kinetic behavior. We evaluated and adapted methodologies proposed in the literature and established the best conditions of incubation time, enzyme concentration and substrate concentration, to evaluate the *in vitro* activity of potential enzyme inhibitors.

Keywords: *Physalis peruviana*, intestinal carbohydrases, alpha glucosidases, alpha amylase, hypoglycemic activity, inhibitory concentration 50.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Contenido	XI
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIX
Introducción	1
1 Marco Referencial.....	5
1.1 Diabetes mellitus	5
1.1.1 Fisiopatología y Diagnóstico	6
1.1.2 Tratamiento.....	9
1.2 Plantas Medicinales y Diabetes mellitus.....	11
1.2.1 Actividad biológica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	13
1.3 Carbohidrasas Intestinales.....	16
1.3.1 Alfa Glucosidasa.....	17
1.3.2 Alfa amilasa	20
1.3.3 Inhibición de las carbohidrasas intestinales	23
1.3.4 Acarbosa.....	27
1.3.5 Plantas Medicinales como inhibidores de carbohidrasas intestinales ..	29
2 Metodología.....	31
2.1 Materiales	31
2.2 Equipos.....	31
2.3 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de alfa glucosidasa.....	32
2.3.1 Inhibición de alfa glucosidasa utilizando pNPG como sustrato.....	33
2.3.2 Inhibición de alfa glucosidasa obtenida a partir del extracto acetónico de intestino de rata usando pNPG como sustrato.....	34
2.4 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de maltasa.....	36

2.4.1	Inhibición de maltasa obtenida a partir del extracto acetónico de intestino de rata.....	38
2.5	Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de alfa amilasa	39
2.5.1	Inhibición de alfa amilasa	40
2.6	Comportamiento cinético del extracto de <i>Physalis peruviana</i>	42
2.7	Análisis Estadístico.....	43
3	Resultados y discusión	45
3.1	Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de alfa glucosidasa a partir de la enzima derivada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.1.1	Inhibición de alfa glucosidasa derivada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando pNPG como sustrato.....	50
3.1.2	Inhibición de alfa glucosidasa a partir del polvo del extracto acetónico de intestino de rata usando pNPG como sustrato.....	52
3.2	Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de maltasa a partir de la enzima derivada del extracto acetónico de intestino de rata.	55
3.2.1	Inhibición de maltasa obtenida a partir del polvo del extracto acetónico de intestino de rata.....	57
3.3	Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de amilasa	59
3.3.1	Inhibición de alfa amilasa	62
3.4	Evaluación del efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> sobre carbohidrasas intestinales.....	64
3.5	Cinética de inhibición del extracto de <i>Physalis peruviana</i> sobre carbohidrasas intestinales.....	74
4	Conclusiones	87
5	Recomendaciones.....	89
A.	Anexo: Resultados del análisis de varianza de dos vías seguido del test de Boferroni	91
B.	Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de alfa glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	97
C.	Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata.	99
D.	Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata.....	101
E.	Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de alfa amilasa.....	103
	Bibliografía	105

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Algoritmo de diagnóstico de la Diabetes mellitus 2	8
Figura 1-2 Algoritmo de manejo terapéutico de la Diabetes mellitus tipo 2	9
Figura 1-3 Reacción de hidrólisis por las alfa glucosidasas.....	18
Figura 1-4 Mecanismo de doble desplazamiento nucleofílico en la reacción hidrolítica del enlace alfa-glucosídico	19
Figura 1-5 Mecanismo de ion oxocarbonio. Mecanismo en la reacción hidrolítica del enlace alfa-glucosídico	20
Figura 1-6 Mecanismo de doble desplazamiento de la alfa amilasa	22
Figura 1-7 Mecanismo de ion oxocarbonio de la alfa amilasa.....	23
Figura 1-8 Diagrama esquemático de la hidrólisis enzimática de los oligosacáridos y la inhibición competitiva de la acarbosa.....	26
Figura 2-1 Reacción de hidrólisis de la maltosa	36
Figura 2-2 Reacción de hidrólisis del almidón azul	39
Figura 3-1 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (0,1UI/mL).....	46
Figura 3-2 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (1UI/mL).....	47
Figura 3-3 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (10UI/mL).....	48
Figura 3-4 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa	51
Figura 3-5 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata	54
Figura 3-6 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por maltasa (1UI/mL).	56
Figura 3-7 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata.....	58
Figura 3-8 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa amilasa (2UI/mL).	61
Figura 3-9 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa amilasa.	63
Figura 3-10 Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>) sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa	65
Figura 3-11 Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>) sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata	67

Figura 3-12	Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>) sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata	69
Figura 3-13	Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>) sobre la actividad enzimática de alfa amilasa.....	73
Figura 3-14	Inverso de la velocidad de reacción de alfa glucosidasa en presencia y ausencia del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	80
Figura 3-15	Inverso de la velocidad de reacción de maltasa en presencia y ausencia del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	80
Figura 3-16	Inverso de la velocidad de reacción de alfa amilasa en presencia y ausencia del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	81

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Plantas Medicinales aceptadas con fines terapéuticos como hipoglucemiantes y en tratamiento de la diabetes en Colombia.....	13
Tabla 1-2 Actividades biológicas reportadas para cada órgano de <i>Physalis Peruviana</i>	15
Tabla 1-3 Principales plantas medicinales con inhibición de alfa glucosidasa ó alfa amilasa	29
Tabla 3-1 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (0,1UI/mL).....	45
Tabla 3-2 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (1UI/mL).....	47
Tabla 3-3 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (10UI/mL).....	48
Tabla 3-4 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa	51
Tabla 3-5 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata	53
Tabla 3-6 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por maltasa (1 UI/mL).	56
Tabla 3-7 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata.....	58
Tabla 3-8 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa amilasa (2UI/mL).	60
Tabla 3-9 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa amilasa	62
Tabla 3-10 Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana (Pp)</i> sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa	65
Tabla 3-11 Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana (Pp)</i> sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata	67
Tabla 3-12 Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana (Pp)</i> sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata	69
Tabla 3-13 Efecto del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana (Pp)</i> sobre la actividad enzimática de alfa amilasa.....	72
Tabla 3-14 Absorbancia de p-nitrofenol de en función del tiempo en ausencia del extracto de <i>Physalis peruviana (Pp)</i>	75

Tabla 3-15 Absorbancia de p-nitrofenol de en función del tiempo en presencia del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	75
Tabla 3-16 Absorbancia de quinoneimina en función del tiempo en ausencia del extracto de <i>Pp</i>	76
Tabla 3-17 Absorbancia de quinoneimina en función del tiempo en presencia del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	76
Tabla 3-18 Absorbancia del producto de hidrólisis del almidón azul en función del tiempo en ausencia del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	77
Tabla 3-19 Absorbancia del producto de hidrólisis del almidón azul en función del tiempo en presencia del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	77
Tabla 3-20 Velocidad de reacción en función de la concentración del sustrato en presencia y ausencia del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	78
Tabla 3-21 Inverso de la velocidad de reacción en función del inverso de la concentración del sustrato en presencia y ausencia del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>).....	79
Tabla 3-22 Parámetros cinéticos de la inhibición del extracto de <i>Physalis peruviana</i> (<i>Pp</i>) sobre las diferentes enzimas.....	81
Tabla A-1 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de pNPG sobre la actividad de alfa glucosidasa a 0,1 UI/mL.....	89
Tabla A-2 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de pNPG sobre la actividad de alfa glucosidasa a 1,0 UI/mL.....	89
Tabla A-3 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de pNPG sobre la actividad de alfa glucosidasa a 10,0 UI/mL.....	90
Tabla A-4 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la alfa glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
Tabla A-5 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la alfa glucosidasa extraída de polvo intestinal de rata.....	90
Tabla A-6 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de maltosa sobre la actividad de maltasa a 1,0 UI/mL.....	91
Tabla A-7 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la maltasa.....	91
Tabla A-8 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de almidón azul sobre la actividad de alfa amilasa a 2,0 UI/mL.....	91
Tabla A-9 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la alfa amilasa.....	92
Tabla A-10 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de <i>Pp</i> sobre la alfa glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
Tabla A-11 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de <i>Pp</i> sobre la alfa glucosidasa extraída de polvo intestinal de rata.....	92
Tabla A-12 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de <i>Pp</i> sobre la maltasa.....	93

Tabla A-13 Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de <i>Pp</i> sobre la alfa amilasa.....	93
Tabla B-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa glucosidasa.....	96
Tabla C-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa glucosidasa extraída del polvo intestinal de rata.....	98
Tabla D-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de maltasa	100
Tabla E-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa amilasa.	102

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
A	Absorbancia
ADA	Asociación Americana de la Diabetes American Diabetes Association
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
Asp	Ácido L- Aspártico
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
dL	deciLitro
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
E.S.M	Standard Error of the Mean Error Estándar de la Media
FNT γ	Factor de Necrosis tumoral gamma
GADA	Anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico Glutamic acid decarboxylase antibodies
GB	Glucemia Basal
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1 Glucagon-like peptide-1
Glu	Ácido glutámico
GndCl	Cloruro de guanidinio
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
IAA	Anticuerpos antiinsulínicos Insulin autoantibodies
IADPSG	Asociación Internacional de la Diabetes y Comisiones de Estudio del Embarazo International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups
ICA	Anticuerpos anti islotes pancreáticos Islet cell antibodies
IMC	Índice de masa corporal
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IL-6	Interleuquina 6
IL-12	Interleuquina 12
ITG	Intolerancia a la glucosa
kb	Kilobase
kg	Kilogramo

Abreviatura	Término
mg	Miligramo
Km	Constante de Michaelis Menden
L	Litro
≥	Mayor o igual
±	Mas o menos
m ²	Metro cuadrado
μl	Microlitros
Min	Minutos
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mM	Milimolar
MODY	Diabetes del adulto de inicio juvenil Maturity Onset Diabetes of the Young
M	Molar
NICE	Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica National Institutes of Health Care Excellence
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pNPG	p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido
PPA	Amilasa pancreática porcina Porcine Pancreatic Amylase
PPAI	Amilasa pancreática porcina I
PPAII	Amilasa pancreática porcina II
PPAR _γ	Receptor gamma activado por proliferador de peroxixoma Peroxisome proliferator-activated receptors
<i>Pp</i>	<i>Physalis Peruviana</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S.D	Standard Deviation Desviación Estándar
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
Trp	Triptófano
U.I	Unidades Internacionales
Vmax	Velocidad Máxima

Introducción

Se ha considerado el uso de plantas medicinales para el tratamiento de varias enfermedades. Uno de los síndromes que llama la atención debido a su impacto en salud pública es la Diabetes mellitus tipo II ya que en la actualidad afecta a 194 millones de personas en todo el mundo y para el año 2025 se calcula serán 333 millones las personas que desarrollarán diabetes según estadísticas de la OMS. El 35% de la población diabética procede de países industrializados y un 65% viven en países en vías de desarrollo, sólo en Latinoamérica hay alrededor de 19 millones de personas que padecen la enfermedad (OPS, 2001).

La Diabetes mellitus tipo II es un desorden tipo metabólico caracterizado por hiperglicemia permanente, la cual es causada por defectos en la secreción o acción de la insulina. A su vez, la hiperglicemia crónica está asociada con daño, disfunción y falla de varios órganos (ADA, 2012).

En la actualidad, se tienen diferentes esquemas de tratamiento para la Diabetes mellitus tipo II, estos incluyen desde cambios en el estilo de vida, inicio y combinación de hipoglicemiantes orales hasta uso de productos biotecnológicos y trasplantes pancreáticos (Ospina y Pinzón, 1995). Debido a que las estimaciones mundiales de aumento de la morbilidad de esta enfermedad, es un ¿campo promisorio, la obtención de nuevos fármacos hipoglicemiantes o coadyuvantes que logren el control de la glicemia en sangre y por ende reduzcan sus efectos crónicos. No obstante, se ha observado que a pesar de la existencia de estos esquemas de tratamiento la población latinoamericana ya sea por limitaciones económicas, escaso acceso a servicios de salud o tradiciones culturales opta por utilizar concomitante y en algunos casos únicamente la fitoterapia como tratamiento para este síndrome (Galvez et al., 2010).

El uso de plantas con fines medicinales proviene de nuestras comunidades nativas que, de generación en generación, fueron transmitiendo este conocimiento hasta lo que hoy

conocemos como etnomedicina. Sin embargo, no podemos desconocer que a medida que la humanidad ha avanzado científica y tecnológicamente se permite un mayor conocimiento en cuanto al comportamiento de la naturaleza y por ende hoy en día es imprescindible evaluar rigurosamente el estudio de las denominadas “plantas medicinales” para determinar su seguridad y efectividad.

Solo en Colombia se han reportado 43 plantas utilizadas como antidiabéticas (Ospina y Pinzón, 1995) y se ha demostrado que las plantas medicinales pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y mejorar la condición integral de los pacientes diabéticos, no solo por sus efectos hipoglicemiantes sino también al mejorar el perfil lipídico, el estado antioxidante y la función capilar (Gamboa, 2010).

Este es el caso de la especie *Physalis peruviana*, realizando una revisión sistemática de la relación entre esta planta y su efecto hipoglicemiante se encontraron varios trabajos en los que cabe resaltar que se ha demostrado el efecto hipoglicemiante de las fracciones del extracto etanólico, obtenido a partir de frutos frescos de *Physalis peruviana* mediante la administración oral a ratones normoglicémicos y diabéticos que sin encontrar efectos aparentes sobre la glicemia, pero si por una interacción con insulina exógena encontraron que potencia el efecto de la insulina. Además, no se observó toxicidad aparente en ratones de laboratorio al administrar oralmente los extractos (García y Sua, 1997).

Adicionalmente, en un modelo experimental de diabetes inducida con estreptozotocina, implementado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, se demostró la actividad antioxidante e hipoglicemiante de los extractos de los frutos de *P. peruviana*, describiendo los niveles de glucosa y utilizando algunos marcadores del estrés oxidativo. Este trabajo contribuyó a la validación del uso popular de los frutos de *P. peruviana* como antidiabético y aportó valiosa información sobre sus propiedades antioxidantes (Mora, 2008).

Existen diferentes posibles modos de acción a evaluar si se quiere profundizar en la evaluación del efecto hipoglicemiante. Algunos de ellos son la estimulación de secreción de insulina, el aumento de la sensibilidad a la insulina por los tejidos periféricos, músculos e hígado y la inhibición de enzimas de digestión de los polisacáridos (por ello

denominadas carbohidrasas). Estas enzimas están presentes en las vellosidades intestinales y participan en el desdoblamiento de polisacáridos como la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos, los cuales son convertidos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa). La inhibición de esta enzima lentifica la absorción de carbohidratos, el aumento posprandial de la glucosa plasmática disminuye tanto en sujetos normales como diabéticos (Fauci et al., 2009).

Este parece ser un posible modo de acción para los frutos de *Physalis peruviana* como agente hipoglicemiante y/o antidiabético ya que algunos trabajos previos en los cuales se han realizado revisiones sistemáticas se ha demostrado que varias plantas tradicionalmente consideradas antidiabéticas demuestran la inhibición de estas enzimas intestinales (Ye et al., 2010; Benalla et al., 2010)

Con todos los antecedentes anteriormente mencionados el presente trabajo se enfocó en hacer una evaluación *in vitro* del efecto farmacológico de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar *in vitro* la inhibición de algunas carbohidrasas como posible modo de acción hipoglicemiante de un extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*.

Objetivos Específicos

- Implementar ensayos *in vitro* que permitan la evaluación de posibles agentes inhibidores de las enzimas intestinales alfa amilasa, alfa glucosidasa y maltasa.
- Evaluar el efecto de un extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* sobre las enzimas intestinales alfa amilasa, alfa glucosidasa y maltasa.

1 Marco Referencial

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes es un grupo de síndromes caracterizados por hiperglicemia, consecuencia de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina, o ambas. La base de las anomalías en carbohidratos, grasas y proteínas, es la deficiente acción de la insulina y su metabolismo en los tejidos diana ya sea por la secreción inadecuada de insulina y/o la disminución de respuestas tisulares a la insulina en uno o más puntos en la complejas vías de acción de la hormona. Esta deficiencia de insulina es la primera causa de la hiperglicemia (ADA, 2012).

Los síntomas más comunes de la hiperglicemia son poliuria, polidipsia, pérdida de peso, a veces con polifagia y visión borrosa. La hiperglicemia crónica se asocia a largo plazo con daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos. En las crisis agudas, las potenciales consecuencias mortales de la diabetes no controlada son la hiperglicemia con cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no cetósico (ADA, 2012).

Actualmente la OMS calcula que en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes. Más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos y medios. La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre 2005 y 2030 (OMS, 2012).

En Colombia la prevalencia de Diabetes mellitus tipo 2 oscila entre el 4 y el 8%, en función del rango de edad de la población estudiada. El mestizaje, el envejecimiento y los factores asociados a la urbanización son los principales determinantes de la epidemia de diabetes que se observa en la región. Entre estos últimos destaca la alta frecuencia de sobrepeso (más del 30%) y de síndrome metabólico (entre 20% y 35%). La intolerancia a la glucosa es casi tan frecuente como la diabetes. Esta enfermedad se encuentra entre

las primeras cinco causas de muerte en Colombia y su morbilidad también es considerable. El sistema integrado de seguridad social ha permitido que la mayoría de los colombianos tengan acceso a una atención diabetológica aceptable pero aun existen importantes limitaciones. La incidencia de Diabetes mellitus tipo 1 en Colombia es relativamente baja (de 3-4 casos por 100.000 niños menores de 15 años) y la prevalencia se estima en un 0,07% (Aschner, 2010).

1.1.1 Fisiopatología y Diagnóstico

La OMS reconoce tres tipos de diabetes: la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y la diabetes gestacional (OMS, 2012).

La Diabetes mellitus tipo 1 se presenta en sólo el 5%-10% de los pacientes que tienen diabetes y es el resultado de la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. Los marcadores de la destrucción inmune de la célula beta están presentes en el momento del diagnóstico en el 90% de los individuos e incluyen anticuerpos anti islotes pancreáticos (ICA), anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico (GADA) y anticuerpos antiinsulínicos (IAA). Todos los pacientes con diabetes tipo 1 requieren tratamiento con insulina para mantener la normoglicemia (ADA, 2012).

La Diabetes mellitus tipo 2 se presenta en el 90 al 95% de la población diabética (OMS, 2012). Se caracteriza por tres alteraciones fisiopatológicas: Trastorno de la secreción de insulina, resistencia periférica a ésta y producción hepática excesiva de glucosa (Fauci et al., 2009). El trastorno de la secreción de insulina se debe principalmente a la disfunción de la célula beta pancreática, pero hasta que la masa de células beta no disminuya por debajo del 50%, no se altera la glicemia basal. Las causas de la reducción de la masa de células beta no son bien conocidas. Se ha señalado la presencia de un estado de apoptosis acelerada que podría, al menos de forma parcial, estar determinada genéticamente o por factores ambientales como depósitos de amiloide pancreáticos que parecen potenciar la destrucción de las células beta, hiperglicemia y lipotoxicidad ya que la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) ha demostrado tener un efecto deletéreo sobre la funcionalidad de la célula beta pancreática (Montero, 2007).

Con respecto a la resistencia periférica de insulina todavía no se ha desentrañado el mecanismo molecular preciso de esta. Los niveles de receptor de insulina y de actividad de tirosinquinasa está disminuida, pero lo más probable es que estas alteraciones sean secundarias a la hiperinsulinemia y no un defecto primario. Por tanto, se cree que en la resistencia a la insulina el factor predominante son los defectos posteriores al receptor (Fauci et al., 2009).

A medida que avanzan la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensadora, los islotes pancreáticos se tornan incapaces de mantener el estado de hiperinsulinismo. Se desarrolla entonces intolerancia a la glucosa (ITG), caracterizado por grandes elevaciones de la glicemia posprandial. Cuando declina todavía más la secreción de insulina y aumenta la producción hepática de glucosa, aparece la diabetes manifiesta con hiperglicemia en ayuno. Finalmente ocurre el fallo de las células beta. A menudo están elevados los marcadores de la inflamación como IL-6 y Proteína C reactiva (Fauci et al., 2009).

A su vez la resistencia a la acción de la insulina altera la utilización de glucosa por los tejidos sensibles a insulina y aumenta la producción hepática de glucosa; ambos efectos contribuyen a la hiperglicemia de la diabetes. El aumento de la producción hepática de glucosa es responsable predominantemente de los elevados niveles de glucosa en sangre, mientras que el decremento de la utilización periférica de glucosa produce hiperglicemia posprandial (Fauci et al., 2009).

La diabetes gestacional durante muchos años se la ha definido como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. Pero después del 2009, la Asociación Internacional de la Diabetes y Comisiones de Estudio del Embarazo (IADPSG), y la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomiendan que las mujeres de alto riesgo de diabetes deban hacer una visita inicial, utilizando los criterios estándar y recibir un diagnóstico de manifiesto, no gestacional de diabetes. Aproximadamente el 7% de todos los embarazos (que van del 1 al 14%, dependiendo de la población estudiada y las pruebas de diagnóstico empleadas) se complican debido a Diabetes mellitus gestacional, lo que resulta en más de 200.000 casos al año (ADA 2012).

Existen otros tipos de diabetes que se producen debido a trastornos específicos como: la diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY), cirugías, medicamentos, desnutrición, infecciones y otras enfermedades. Esos tipos de diabetes representan entre el 1% y el 5% del total de los casos diagnosticados (ADA, 2012).

Se confirmará la sospecha de presencia de Diabetes mellitus en los siguientes casos: (ADA 2012)

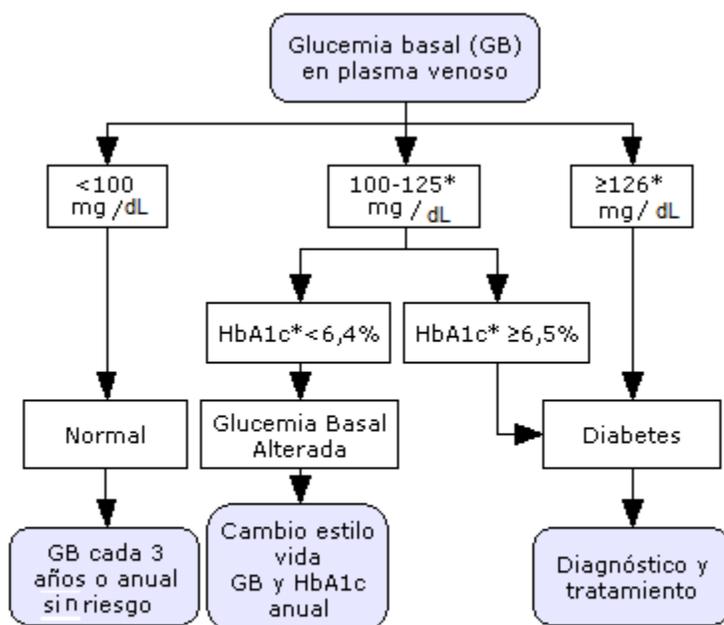
Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$

Glicemia en ayunas (al menos durante 8 horas) ≥ 126 mg/dL (7mmol/L)

Glicemia ≥ 200 mg/dL a las 2 horas tras la sobrecarga oral con 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua

Glicemia al azar ≥ 200 mg/dL en pacientes que presenten síntomas clásicos de hiperglicemia (poliuria, polidipsia polifagia) o crisis hiperglicémicas.

Figura 1-1 Algoritmo de diagnóstico de la Diabetes mellitus 2



*En dos ocasiones

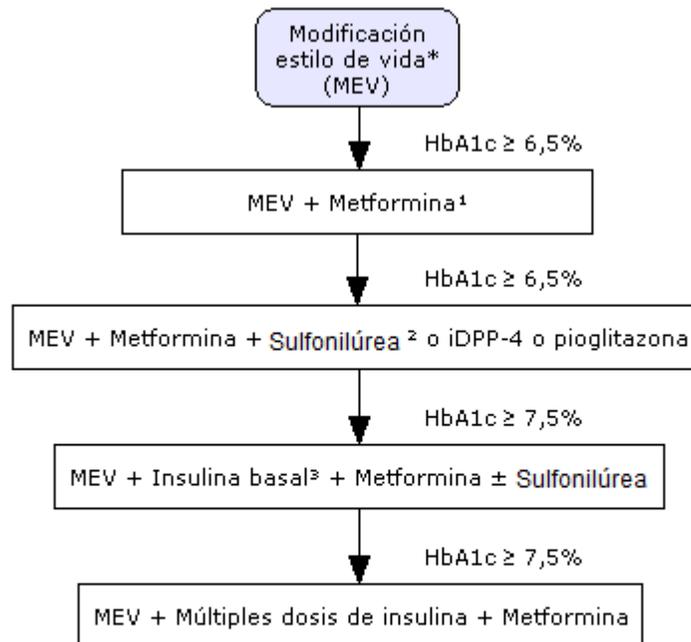
(Tomado de Fistera, 2011)

1.1.2 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).

Por lo general se comienza con un tratamiento no farmacológico que conlleva a la modificación del estilo de vida, principalmente de la dieta y actividad física. Para un adecuado tratamiento se puede utilizar el algoritmo de manejo terapéutico ilustrado en la Figura 1-2.

Figura 1-2 Algoritmo de manejo terapéutico de la Diabetes mellitus tipo 2



* Pacientes sintomáticos, con pérdida de peso y/o cetonuria deben insulinizarse inicialmente.

1. Considerar sulfonilúrea o sitagliptina si la metformina no se tolera o está contraindicada.

2. Preferible pioglitazona o inhibidores DPP-4 si hay problema potencial de hipoglucemia por SU.

3. Insulina basal= NPH nocturna o prolongada a cualquier hora. Considerar sustituir insulina por pioglitazona o inh. DPP-4 si rechazo o riesgo hipoglucemia; o por exenatida si IMC >35 kg/m².

(Tomado de Fisterra, 2011)

Con respecto a la modificación de estilos de vida principalmente se deriva en dos: la dieta y la actividad física. Estas dos van a requerir un asesoramiento individual (de acuerdo a costumbres y creencias) y van a variar especialmente cuando se presenta obesidad o alguna enfermedad concomitante tal como hipertensión o insuficiencia renal.

Dado que los intentos de modificación de estilos de vida no inducen o mantienen un control de la glicemia adecuado en la mayoría de pacientes, la farmacoterapia es necesaria para evitar los riesgos inherentes al desarrollo de la Diabetes mellitus. Al comenzar la farmacoterapia, se debe tener en cuenta que actualmente existen 7 grupos de hipoglicemiantes (sin incluir la insulina), los cuales tienen 3 posibles mecanismos de acción: (Fisterra, 2011)

Fármacos que estimulan la secreción de insulina como por ejemplo sulfonilúreas, secretagogos de acción rápida (glinidas), inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4) y análogos del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). Las sulfonilúreas² actúan con gran afinidad sobre receptores en las células beta pancreáticas 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, su principal riesgo es la hipoglicemia marcada (Florez, 1997). Los inhibidores de la enzima DPP-4, inhiben la función enzimática de degradar al péptido intestinal GLP-1, el cual se libera en el intestino ante la llegada de los alimentos produciendo la liberación de insulina pancreática e inhibiendo la liberación de glucagón (Fisterra, 2011).

Los análogos del GLP 1 son polipéptidos con una estructura similar al GLP-1 intestinal, pero con modificaciones en su estructura que impiden su degradación por la enzima DPP-4, por lo que tiene una vida media prolongada. (Fisterra, 2011).

- Fármacos que disminuyen la resistencia a la insulina: biguanidas y glitazonas.

Las biguanidas son derivados biguanídicos de los que el único actualmente aceptado es la metformina, aumenta el metabolismo de la glucosa en los tejidos, en particular de la glucólisis anaerobia, reduce la gluconeogénesis hepática e inhibe la absorción

de glucosa, aminoácidos y otros compuestos a nivel intestinal. A nivel subcelular, las biguanidas se fijan a la membrana mitocondrial, donde podrían alterar los sistemas de transporte (Flórez, 1997).

Las glitazonas se caracterizan por fijarse de manera directa y actuar sobre uno de los subtipos del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ). La principal consecuencia de activar el PPAR γ es el incremento de la transcripción de genes de enzimas que normalmente son inducidas por la insulina e intervienen en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Flórez, 1997).

- Fármacos que reducen o enlentecen la absorción de la glucosa: inhibidores de las alfa glucosidasas.

Los inhibidores de las alfa glucosidasas (α -glucosidasas), por inhibición enzimática reducen la formación de monosacáridos y por consiguiente la disponibilidad de la glucosa y otras hexosas para ser absorbidas en el intestino. Normalmente, los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos ingeridos en la dieta, son transformados en monosacáridos y hexosas para su absorción intestinal mediante la hidrólisis producida por las alfa glucosidasas (glucoamilasa, sacarasa, maltasa e isomaltasa), las cuales 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. Cabe aclarar que la actividad de las alfa glucosidasas es muy variable de un individuo a otro (Flórez, 1997).

1.2 Plantas Medicinales y Diabetes mellitus

El uso de plantas ha estado presente en las prácticas de la medicina tradicional desde tiempos inmemorables. Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que las plantas medicinales juegan un rol muy importante en el cuidado de la salud. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que aproximadamente el 80% de la población de los países emergentes acuden frecuentemente al uso de la medicina tradicional (mayormente derivados de plantas) como cuidados primarios en salud. La medicina tradicional también juega un rol importante en el cuidado de la salud del otro 20% de la

población de los países de economía emergente y de algunos países desarrollados (Galvez et al., 2010)

Aunque existen datos limitados, la experiencia con pacientes diabéticos indica que usan plantas medicinales y se recurre a vendedores de hierbas locales, haciendo las veces de coadyuvante en alcanzar la meta del control de la glicemia, incluso en Estados Unidos se usan algunos compuestos a base de plantas junto con otros medicamentos (Andrade y Heinrich, 2005).

Dado el reciente interés hacia las plantas medicinales, la investigación fitoterapéutica ha demostrado con evidencia científica que estas plantas medicinales contienen principios activos susceptibles de ser aislados y demuestran actividad farmacológica así como también se ha ampliado la evaluación de la efectividad y seguridad de las mismas. Aunque es difícil encontrar entre las plantas el sustituto a insulina, si es posible que se encuentren moléculas que estimulen la biosíntesis y secreción de insulina endógena.

Existen diferentes estudios de plantas hipoglicemiantes y una gran variedad de componentes tales como alcaloides, glicósidos, terpenos, flavonoides que entre otros han sido aislados para evaluar esta actividad. En el contexto es importante recordar que en la terapia de primera línea actual para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2 es la metformina (una biguanida), el cual es un derivado de un producto natural activo, la galegina, una guanidina aislada de la planta *Galega officinalis* L que fue usada desde el medioevo por personas diabéticas con una producción excesiva de orina ((Andrade y Heinrich, 2005).

Sin embargo, una revisión bibliográfica que se orientó hacia la búsqueda de información etnomedica, farmacológica y química, de las plantas que en Colombia tienen reputación como antidiabéticas, se evidenció, que de un listado de 43 plantas medicinales con uso antidiabético reportado en la literatura, aunque la gran mayoría tiene información aceptable, solo para 17 plantas se ha demostrado su efecto hipoglicemiante o antidiabético en experimentos serios y en 7 de ellas se ha reconocido el principio activo hipoglicemiante (Ospina y Pinzón, 1995). En el Vademecum Colombiano de Plantas

Medicinales, sólo 3 especies han sido aprobadas como hipoglicemiantes o antidiabéticas (tabla 1-1)

Tabla 1-1 Plantas Medicinales aceptadas con fines terapéuticos como hipoglicemiantes y en tratamiento de la diabetes en Colombia.

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizadas	Uso aprobado	Modelo utilizado
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Marañón	Corteza	Hipoglicemiante Antiinflamatorio	La administración a perros del extracto acuoso y del extracto en hexano produjo actividad hipoglicemiante.
<i>Momordica charantia</i> L.	Balsamina	Toda la Planta	Coadyuvante en el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente	Numerosos estudios en animales y humanos han determinado actividad hipoglicemiante.
<i>Bauhinia variegata</i> L.	Casco de vaca	Partes aéreas (Hojas)	Hipoglicemiante	El extracto etanólico a una concentración de 20µg/mL presentó actividad secretagoga de insulina.

(Tomado de Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales, 2008)

La evaluación de la actividad hipoglicemiante antidiabética debe contemplar una batería de ensayos que confirmen la actividad pero que den alguna luz sobre el posible modo de acción. Las metodologías actuales contemplan: screening básico en animales con sobrecarga de glucosa, actividad en animales normoglicémicos y diabéticos por aloxano y estreptozotocina, captación de glucosa por musculo estriado, transporte intestinal de glucosa, niveles simultáneos de glucosa e insulina plasmáticas, regeneración de células beta pancreáticas, producción de insulina por páncreas aislado entre otros (Ospina y Pinzón, 1995).

1.2.1 Actividad biológica de *Physalis peruviana* L.

Dentro de las plantas reportadas como hipoglicemiantes pero cuyo modo de acción aun no se ha identificado encontramos la *Physalis peruviana* (uchuva), que pertenece a la

familia de las Solanáceas y al género *Physalis*. Esta especie se caracteriza porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o capacho, existen más de 120 especies en el sur y norte de América (Ahmad et al., 1999).

La uchuva, originaria de los Andes suramericanos, es la especie más conocida de este género y se caracteriza por tener frutos azucarados y buenos contenidos de vitaminas A y C, además de hierro y fósforo. De la uchuva se comercializa el fruto, que es una baya carnosa en forma de globo, con un diámetro que oscila entre 1,25 y 2,5 centímetros y con un peso entre 4 y 10 gramos; está cubierto por un cáliz formado por cinco sépalos que le protege contra insectos, pájaros, patógenos y condiciones climáticas extremas. En la actualidad, Colombia es el mayor productor de uchuva del mundo, seguido por Sudáfrica. (Fischer et al., 2000).

Los cálices de *Physalis peruviana* (*P. peruviana*) han sido ampliamente usados en la medicina popular con propiedades anticancerígenas, antipiréticas y antiinflamatorias (Franco et al., 2007). Además se utiliza en el tratamiento de cáncer, leucemia, hepatitis y reumatismo (Wu et al., 2006). En Perú, el fruto ha sido usado tradicionalmente para el tratamiento empírico del cáncer y otras enfermedades como hepatitis, asma, malaria y dermatitis pero aun estas propiedades no han sido científicamente comprobadas (Zavala et al., 2006). En diferentes regiones de Colombia se le atribuyen propiedades medicinales como purificación de sangre del riñón, disminución de albúmina, limpieza de cataratas y control de la amebiasis (Universidad de los Andes et al., 1994). Además, es utilizado popularmente en el tratamiento de pterigios, para “fortificar el nervio óptico”, disminuir problemas de garganta, para el tratamiento de diabetes, como diurético, expectorante, para fortalecer dientes y evitar su caída, expectorante, antiséptico y cicatrizante (Bernal y Correa, 1998). En la Tabla 1-2 se presentan algunas actividades biológicas de *P. peruviana*.

Tabla 1-2 Actividades biológicas reportadas para cada órgano de *Physalis Peruviana*

Parte de la planta	Actividad reportada extracto, fracción o metabolito
Planta entera	Actividad antihepatoma/ Extracto etanólico Inducción de apoptosis en células humanas, antitumoral/ Extracto etanólico Actividad antioxidante/ Extracto etanólico
Hojas	Actividad antiinflamatoria y antioxidante/ Extracto etanólico Actividad antihepatotóxica/Extracto acuoso Apoptosis en células cancerígenas/ Extracto denominado SCEPP-5.
Partes aéreas	Actividad citotóxica contra células cancerígenas (Pulmón, mama, hígado)/ Witanólidos
Cálices	Actividad antiinflamatoria/ Fracción denominada Pp-D28-LF
Frutos	Actividad antimicrobiana/ jugo de pulpa de frutos Hipoglicemiante, antioxidante/ Fruto entero extracto hidroalcohólico Actividad antidiabética extracto Leve actividad antiinflamatoria

(Medina, 2012)

Por otra parte, existen algunos estudios clínicos tipo experimental prospectivo, realizados en Perú, en donde se encontró que la ingesta de *P. peruviana*, reduce en adultos jóvenes la glicemia postprandial a los 90 y 120 minutos. El estudio se llevó a cabo con 26 personas voluntarias, quienes fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: el grupo uno ingirió 25 g de frutos de *P. peruviana* y luego de 40 minutos se le administró una sobrecarga de glucosa, mientras que al grupo dos sólo se le administró esta última. Las muestras de sangre fueron tomadas a los 30, 60, 90 y 120 minutos. Luego de 3 días se intercambiaron los tratamientos. Los resultados mostraron que a los 90 minutos postprandial hubo una diferencia muy significativa ($p < 0.01$) y a los 120 minutos una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de glicemia de ambos grupos (Rodríguez y Rodríguez, 2007).

Dado que su actividad hipoglicemiante es reportada en varias referencia bibliográficas, se han propuesto varios modos de acción para esta actividad, y aunque no se ha determinado el mismo, se destacan las evaluaciones del efecto antioxidante debido a la presencia de tocoferol en el aceite de la pulpa y piel de *P. peruviana* (8.6% del total de lípidos) (Ramadan y Morsel, 2003). Por otro lado, a otros compuestos presentes en el fruto como flavonoides y witanólidos se les han atribuido actividad antioxidante y antiinflamatoria en los que intervienen macrófagos, FNT α , IL 6 e IL12 (Martinez et al., 2010).

Dado lo anterior, se tiene un especial interés académico en evaluar el posible modo de acción de un extracto etanólico de la *P. peruviana* y se ha escogido evaluar la inhibición sobre las enzimas alfa glucosidasas ya que su composición la hace una candidata a posiblemente presentar este modo de acción, con la aclaración que la actividad antioxidante e hipoglicemiante de los extractos de los frutos de *P. peruviana* se ha demostrado en modelos *in vivo* de sobrecarga de carbohidratos y de diabetes inducida con estreptozotocina (Mora, 2008).

1.3 Carbohidrasas Intestinales

Las enzimas son polímeros biológicos que catalizan las reacciones químicas que hacen la vida posible como se conoce (Murray et al., 2004), aunque ha sido difícil lograr un sistema de nomenclatura para enzimas que sea completo, consistente y al mismo tiempo fácil de usar, en 1964 la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica introdujo una clasificación sistemática, en la cual se consideran seis grupos principales de enzimas de acuerdo al tipo de su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular. Según esta comisión las carbohidrasas, pertenecen al grupo 3.2.1 de enzimas, donde el grupo 3 se refiere a las hidrolasas, el subgrupo 2 a las glicosilasas, y el último número 1 al tipo glicosidasas. (NC-IUBMB, 1992). Las carbohidrasas son un amplio grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos.

Debido a que el sistema anterior no estaba destinado a clasificar las enzimas según su estructura, se desarrolló otro sistema de clasificación con base en la similitud de secuencia de aminoácidos, lo cual ha dado lugar a la definición de numerosas familias diferentes, debido a que el pliegue de las proteínas está mejor conservado que sus secuencias algunas de las familias se pueden agrupar en clanes. El grupo de las glicosil hidrolasas incluye 128 familias y 14 clanes (CAZy, 2013).

Las carbohidrasas son enzimas digestivas y, como todas las enzimas, presentan especificidad de sustrato y son sensibles a la temperatura, pH y ciertos iones, a su vez las carbohidrasas se pueden clasificar en: poliasas y glucosidasas (Braverman, 1967).

- Poliasas: catalizan la reacción de polisacáridos, tales como α y β amilasas, α – amiloglucosidasa, enzima Q, celulasas, pectinasas, entre otras.
- Glucosidasas o Hexosidasas, enzimas que participan en la disociación de disacáridos y glicosidos, por ejemplo separan la aglicona del azúcar como la alfa y beta glucosidas, maltasa, invertasa, lactasa, alfa galacturonasa, entre otras

El presente trabajo está enfocado en las alfa glucosidasas y alfa-amilasas, las cuales son enzimas que intervienen en la descomposición de los carbohidratos complejos, tales como almidón y glucógeno. Ellas catalizan la escisión de residuos glucósidos individuales de diferentes glicoconjugados incluyendo polímeros alfa o beta enlaces de glucosa (Braverman, 1967).

1.3.1 Alfa Glucosidasa

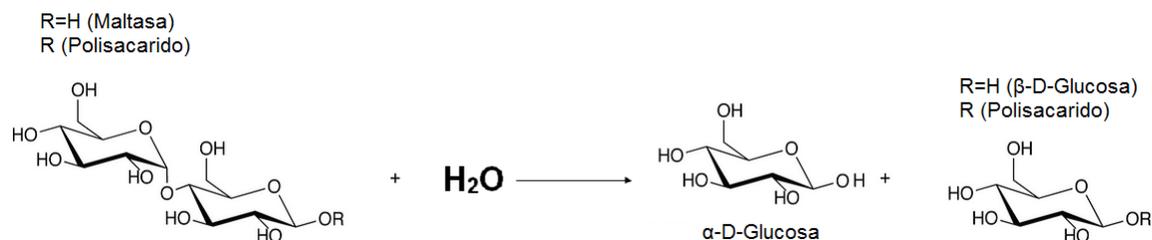
La alfa-glicosidasa (Clasificación EC# 3.2.1.20) también conocida como maltasa, glucoinvertasa, glucosidosacarasa, maltasa-glucoamilasa; α -glucopiranosidasa, glucosidoinvertasa; α -D-glucosidasa; α -glucósido hidrolasa, α -1,4-glucosidasa (SIB 2013). Aunque en la mayoría de los casos, la maltasa es equivalente a la alfa-glucosidasa, el término maltasa hace hincapié en la naturaleza disacárido del sustrato de la que se escinde la glucosa, mientras que alfa-glucosidasa hace hincapié en el enlace, ya sea que el sustrato es un disacárido o polisacárido.

El gen que codifica la alfa-glucosidasa lisosomal humana es de aproximadamente 20 kb de longitud, contiene 20 exones, su estructura ha sido clonada y confirmada (Hoefsloot et al., 1990). La alfa glucosidasa humana ha sido estudiada para evaluar la importancia del Asp-18 y otros residuos de aminoácidos que se ubican cerca del sitio activo de la enzima. Se encontró que sustituyendo el Asp-513 por el Glu-513 se interfiere en la modificación postraduccional y en transporte intracelular del precursor de la alfa glucosidasa. Además residuos de Trp-516 y Asp-518 son críticos para el funcionamiento catalítico de la enzima (Hermans et al., 1991).

La alfa glucosidasa utiliza una reacción hidrolítica, como se ilustra en la figura 1-3, hidroliza la terminal no reducida, de los residuos de α -D-glucosa 1,4-vinculados con la

liberación de α -D-glucosa. Los enlaces α -1,2 y α -1,3 se rompen a un ritmo mucho más lento e hidroliza aun más lentamente los enlaces 1,6- α -D glucosa. La velocidad de hidrólisis disminuye sustancialmente con el aumento de tamaño del sustrato. La alfa glucosidasa se puede adherir a sacarosa, pero no va a hidrolizar α -D-glucósidos tales como celobiosa (Worthington, 1993; SIB, 2013).

Figura 1-3 Reacción de hidrólisis por las alfa glucosidasas



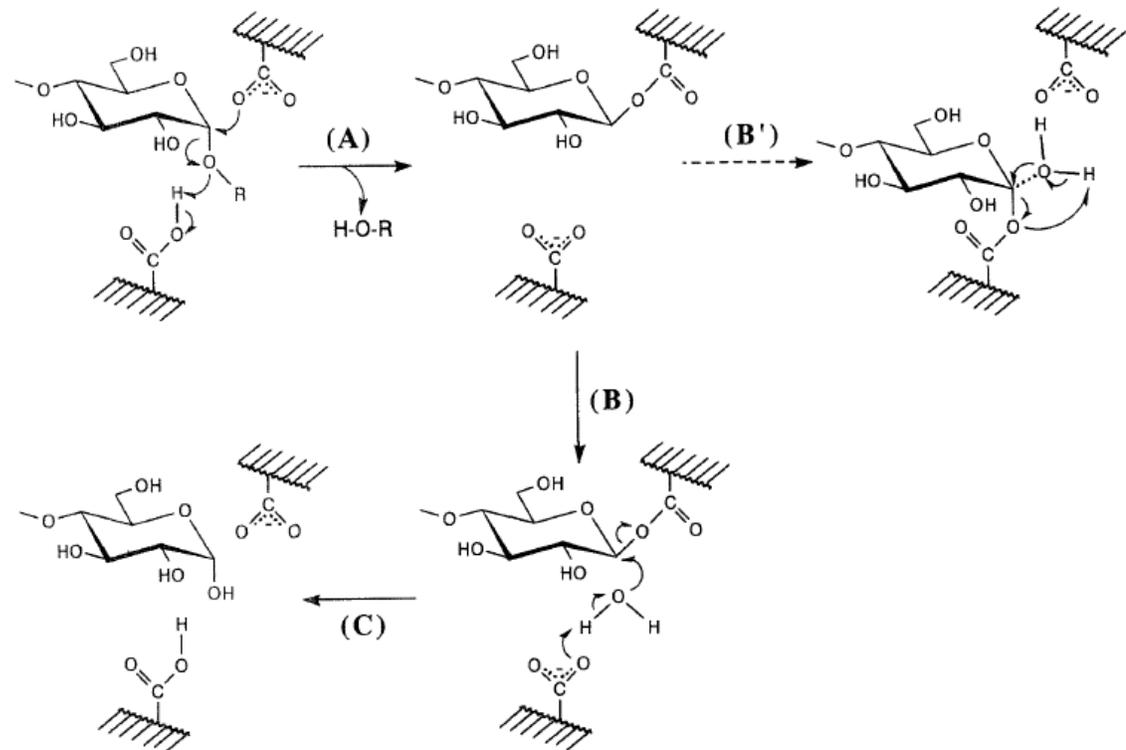
(Worthington, 1993)

Se han propuesto dos posibles mecanismos para llevar a cabo esta reacción, se puede realizar por un desplazamiento nucleófilo ó por la formación de ion oxocarbonio intermedio. En la gran mayoría de los casos la hidrólisis del enlace glucosídico es catalizada por dos residuos de aminoácidos de la enzima: un aminoácido ácido (donador de protones) y un nucleófilo que actúa como base. La hidrólisis se produce a través del mecanismo de retención de la configuración anomérica. (CAZy, 2013). El desplazamiento nucleofílico actúa mediante un mecanismo de dos etapas, como se ilustra en la figura 1-4 (Chiba, 1997).

En el primer paso el nucleófilo ataca el centro anomérico, dando como resultado la formación de una enzima glucosídica intermedia con un carácter ácido provisto por el carboxilato ácido. En el segundo paso el ahora carboxilato desprotonado actúa como base y se une a una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar la enzima intermedia, dando el producto hidrolizado (Chiba, 1997).

El otro mecanismo propuesto es la formación de un ion oxocarbonio intermedio que se ilustra en la figura 1-5.

Figura 1-4 Mecanismo de doble desplazamiento nucleofílico en la reacción hidrolítica del enlace alfa-glucosídico



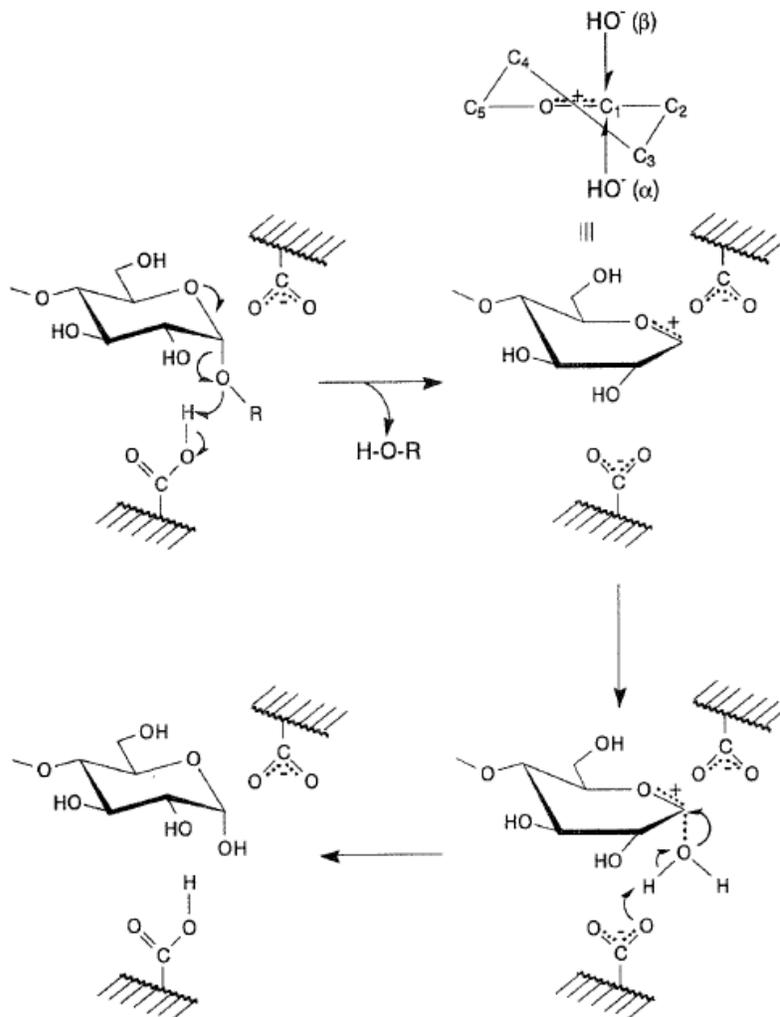
(Tomado de Chiba, 1997)

Aunque parece poco probable que existan oxocarbonio intermediarios iónicos en los sitios activos de glucosido hidrolasas, debido a que su tiempo de vida en el agua se estima en alrededor de 10 a 12 segundos y además, en presencia de nucleófilos, tales como los residuos de carboxilato contenidos en estos sitios activos, se ha demostrado que su tiempo de vida es considerablemente más corto, se ha demostrado mediante estudios cinéticos que los estados de transición para la transferencia del glucosido tienen características de un ion oxocarbonio (CAZy, 2013).

También se ha encontrado que existen cambios cinéticos en la alfa-glucosidasa inducidos por agentes desnaturizantes tales como cloruro de guanidinio (GndCl) y soluciones de Dodecilsulfato de Sodio (SDS). Estos desnaturizantes causan la pérdida de la actividad y el cambio conformacional. La pérdida de la actividad se produce a concentraciones menores de desnaturizante que las concentraciones requeridas para cambios conformacionales. Esto conduce a una conclusión de que la conformación activa

del sitio de la enzima es menos estable que toda la conformación de la enzima en respuesta a estos dos desnaturizante (Wu et al., 2009).

Figura 1-5 Mecanismo de ion oxocarbonio. Mecanismo en la reacción hidrolítica del enlace alfa-glucosídico



(Tomado de Chiba, 1997)

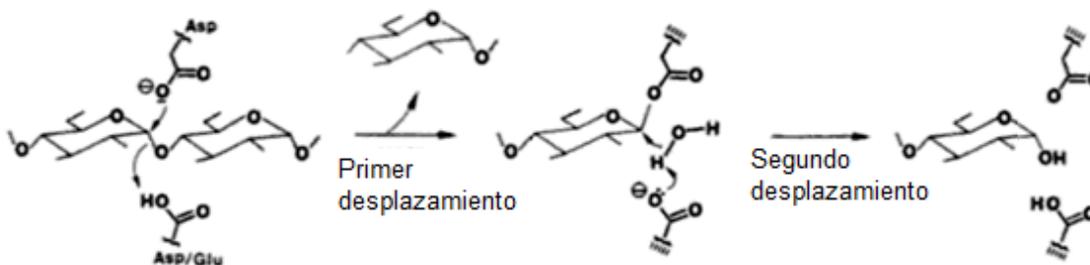
1.3.2 Alfa amilasa

La alfa amilasa (Clasificación EC# 3.2.1.1) fue descubierta y aislada por primera vez en 1833 por Anselme Payen siendo la primera enzima descubierta, las alfa-amilasas fueron nombrados por Kuhn en 1925 debido a que los productos de hidrólisis están en la

configuración alfa. En 1947, a partir del páncreas de cerdo, la enzima se cristalizó por primera vez y se estableció su peso molecular. En 1952 se informó sobre un método de purificación mejorado. La primera estructura cristalina de alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* se determinó en 1979, esta estructura de la resolución 6 Å fue mejorada con una resolución de 3 Å al año siguiente. En la década de 1980, las secuencias de aminoácidos de las dos formas PPAI y PPAII se determinaron y en la década de 1990 se comprobaron las tres estructuras cristalinas tridimensionales de cada forma. Por último, se fijó la secuencia de ADN completa en 1999 (Worthington, 1993 (2); Nushin et al., 1998).

La enzima se puede derivar de una variedad de fuentes, cada una con características diferentes. La alfa amilasa que se encuentra dentro del cuerpo humano sirve como la enzima activa en el jugo pancreático y la saliva. Es una familia de enzimas dependientes de cloruro, tanto la salival como pancreática, para ser activadas alostéricamente requieren la unión de un ion cloruro. La función del ion cloruro aún sigue siendo incierta y no se ha observado relación entre la afinidad de unión de aniones y su actividad (Nushin et al., 2002).

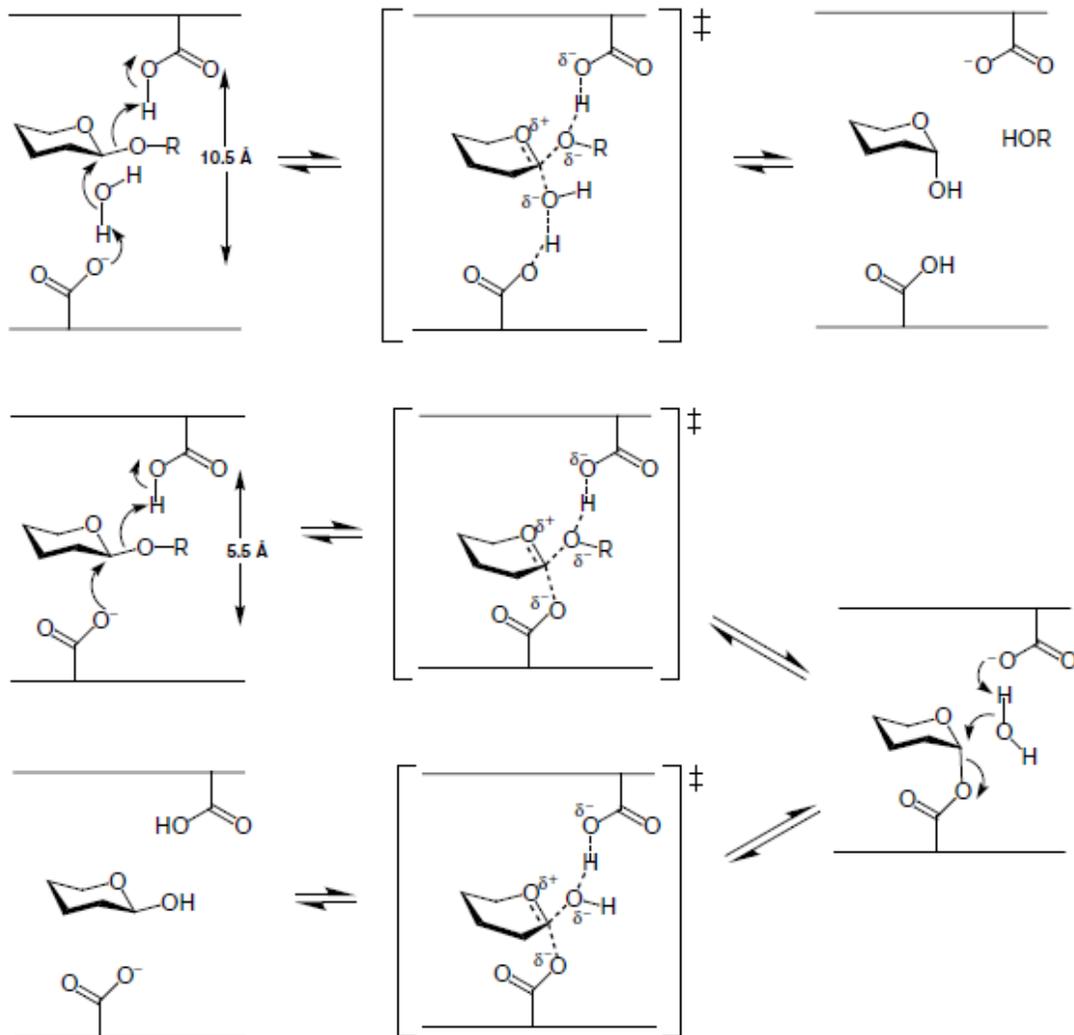
Su reacción consiste en hidrolizar los enlaces 1-4, separando moléculas largas de los polisacáridos a partir de almidón y glucógenos, produciendo azúcares simples, principalmente glucosa y maltosa, el término alfa se refiere a la configuración anomérica inicial del grupo de azúcar libre liberado (SIB (2), 2013). El primero en proponer el mecanismo de desplazamiento nucleofílico para las enzimas amilolíticas fue Koshland en 1959. Para la alfa amilasa, que retiene la configuración del sustrato, utiliza un mecanismo de doble desplazamiento, como se ilustra en la figura 1-6, primero utiliza una protonación del oxígeno glucosídico por un grupo carboxílico y se realiza un ataque nucleofílico al anión carboxilato en C1 libera al enlace glucosídico, resultando en la formación de un intermediario de tipo enlace covalente glucosil-enzima (un carboxil-acetal éster). Un segundo desplazamiento por una catálisis general de bases hidroliza el éster intermediario al producto que tiene la alfa configuración (Dominic, 1995).

Figura 1-6 Mecanismo de doble desplazamiento de la alfa amilasa

(Tomado de Dominic, 1995).

También se ha propuesto el mecanismo utilizando como intermediario el ion oxocarbonio, como se ilustra en la figura 1-7, es un mecanismo de protonación del oxígeno glucosídico, ambos, tanto la enzima inducida deformada como el sustrato con una semi-conformación de cadena, producen un enzima estabilizada, y un ion glucosil oxocarbonio intermedio. La semicadena de conformación libera la tensión estérica del C1 y mejora la accesibilidad del carbón anomérico al ataque frontal del agua promovido por la alfa amilasa, la dirección del ataque está mediada por la molécula de agua (Dominic, 1995; Rye y Withers, 2000)

La función de la alfa amilasa es hidrolizar los enlaces alfa 1-4 glucosídicos del almidón y lo separa en fragmentos cortos de polisacáridos. Una vez que la enzima alcanza el estómago, se inactiva debido al pH ácido. Sin embargo, una segunda forma de la enzima se localiza en el páncreas y también descompone el almidón. El jugo pancreático entra en el duodeno y páncreas y la alfa amilasa actúa sobre el almidón para producir maltosa, maltotriosa y oligosacáridos. Los oligosacáridos se conocen como dextrinas, que son fragmentos de amilopectina, que a su vez consisten en puntos de ramificación del enlace alfa 1-6. Las microvellosidades del epitelio intestinal rompen la maltosa y dextrinas en glucosa, que se absorbe en el sistema circulatorio. El glucógeno tiene una estructura relativamente similar al almidón y, por ende, sufre la misma vía digestiva (Kuriki et al., 1999).

Figura 1-7 Mecanismo de ion oxocarbonio de la alfa amilasa

(Tomado de Rye y Withers, 2000).

1.3.3 Inhibición de las carbohidrasas intestinales

La mayoría de procesos de síntesis se llevan a cabo rutinariamente por las células, principalmente por la acción de enzimas, que son biocatalizadoras de naturaleza proteica. Una característica importante de las enzimas es su especificidad por un sustrato debido a la singularidad de su sitio activo, con frecuencia una enzima selecciona solo un compuesto específico o una serie de compuestos relacionados con los cuales reacciona. (Bacca et al, 2009)

La determinación experimental de la actividad enzimática implica medir la velocidad de reacción catalizada la cual se puede calcular siguiendo la utilización progresiva de sustrato ó la formación de producto. Para medir la actividad catalítica de una enzima se debe determinar la velocidad inicial de la reacción, mantener las condiciones óptimas de la reacción tales como pH y temperatura, y tener en cuenta la cantidad de enzima presente (Bacca et al, 2009).

En 1913 a Leonor Michaelis y Maude Menten propusieron un modelo para el comportamiento cinético de una enzima de donde se obtiene la ecuación de Michaelis-Menten (Stryer et al., 2008).

$$V_o = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Donde V_o es la velocidad de formación del producto, $[S]$ es la concentración de sustrato, K_m es la constante de Michaelis que representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato y V_{max} es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando está totalmente saturada de sustrato (Stryer et al., 2008).

La presencia de un inhibidor que se une a la enzima puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima y/u obstaculizar que la enzima catalice su reacción correspondiente. A los inhibidores se les clasifica según su sitio de acción en la enzima, si modifican o no químicamente a la enzima o de acuerdo a los parámetros cinéticos sobre los que tienen efecto. Los inhibidores enzimáticos por lo general se clasifican en irreversibles, donde el inhibidor se une covalentemente a la enzima y la enzima queda inactiva permanentemente e inhibidores reversibles, donde el inhibidor puede disociarse de la enzima porque no se une por enlaces covalentes (Stryer et al., 2008).

A su vez la unión reversible se puede clasificar desde el punto de vista cinético en no competitiva y competitiva. En la inhibición competitiva el inhibidor competitivo es muy similar al sustrato normal de la enzima. Dada esa similitud estructural, este tipo de inhibidor se une reversiblemente al sitio activo de la enzima. El efecto del inhibidor competitivo en la actividad enzimática se revierte por un aumento en la concentración del sustrato: a altas concentraciones todos los sitios activos se combinan con el sustrato y la

actividad enzimática se normaliza. La V_{max} se mantiene constante con o sin inhibidor competitivo. Sin embargo, cuando está presente el inhibidor K_m aumenta y V_{max} nunca se alcanza por tanto la relación entre K_m/V_{max} aumenta (Murray et al., 2004).

En la inhibición no competitiva, el inhibidor se combina con la enzima en un lugar distinto al sitio activo, tanto en la enzima libre como la enzima unida al sustrato. La unión del inhibidor afecta la configuración tridimensional de la enzima y bloquea la reacción. Este tipo de inhibidor no compite directamente con el sustrato para unirse a la enzima (no afecta la unión Enzima-Sustrato) por lo tanto, este tipo de inhibición no es reversible cuando aumenta la concentración del sustrato. Esta inhibición disminuye la V_{max} según aumenta la concentración del inhibidor, pero no afecta K_m (la enzima puede unirse al sustrato), por tanto la relación entre K_m/V_{max} aumenta (Stryer et al., 2008).

Existe otro tipo de inhibición que es la incompetiva donde el inhibidor se combina en presencia del sustrato (es decir no con la enzima sola), por esta razón, el inhibidor ejerce su efecto sólo a altas concentraciones de sustrato en las que hay gran cantidad de complejo enzima-sustrato (ES). Por lo tanto, la variación del sustrato no afecta o evita la unión con el inhibidor. Por otro lado, es evidente que el sustrato y el inhibidor se combinan con la enzima en lugares diferentes. En este caso la V_{max} disminuye, la K_m aumenta pero la relación entre K_m/V_{max} se mantiene constante (Murray et al., 2004).

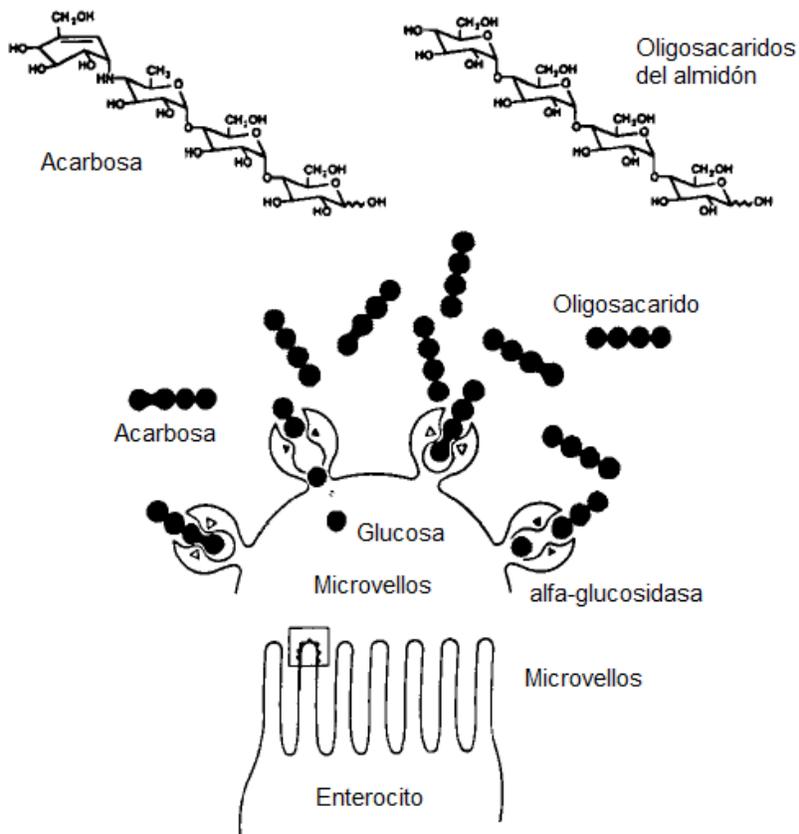
Como se ha descrito con anterioridad, la inhibición de algunas carbohidrasas intestinales reduce la formación de monosacáridos y por consiguiente, la disponibilidad de la glucosa y otras hexosas para ser absorbidas en el intestino. Los inhibidores de la alfa glucosidasa reducen la hiperglicemia postprandial retrasando la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, las fluctuaciones excesivas en los niveles de glucosa en sangre postprandial ó hiperglicemia postprandial, tienen consecuencias adversas para la morbilidad y la mortalidad relacionada con la diabetes.

Es importante destacar que estos agentes reducen la glucosa en sangre sin aumentar la secreción de insulina y no causan hipoglicemia ni aumento de peso. La inhibición de la actividad alfa glucosidasa reduce confiablemente los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1C) y niveles de insulina posprandial en individuos con diabetes tipo 2, lo cual es

uno de los objetivos primordiales del tratamiento. Además, el tratamiento con un inhibidor de la alfa glucosidasa puede mejorar el metabolismo de los lípidos, reducir los niveles de glucosa en plasma en ayuno y mejorar la sensibilidad a la insulina (Derek et al., 2004).

En el intestino delgado el almidón es digerido a oligosacáridos por la amilasa y posteriormente, en el borde en cepillo de los enterocitos del intestino delgado, las alfa glucosidasas digieren estos a glucosa. Los inhibidores de la alfa glucosidasa se unen competitivamente al sitio de unión de oligosacáridos de la alfa glucosidasas, que impide la unión y la hidrólisis enzimática del sustrato oligosacárido, tal como se muestra en la figura 1-8.

Figura 1-8 Diagrama esquemático de la hidrólisis enzimática de los oligosacáridos y la inhibición competitiva de la acarbosa



(Tomado de Bischoff, 1994)

De esta manera, la inhibición de alfa glucosidasa representa un enfoque farmacológico para la modificación de la digestión y absorción de carbohidratos consumidos conjuntamente con cambios en la dieta, ya que los carbohidratos no se digieren en la parte superior del intestino delgado, sino en el íleon, donde se produce la digestión y la absorción. Debido a su mecanismo de acción competitiva, los inhibidores de alfa glucosidasa necesitan ser tomados en el comienzo de una comida. Dentro de este grupo de fármacos se encuentran la acarbosa, el miglitol, la voglibosa y el emiglitalo. La acarbosa es el más ampliamente estudiado y prescrito de estos agentes (Bischoff, 1994; Holt et al., 1996).

1.3.4 Acarbosa

La acarbosa es un pseudotetrasacárido, un producto microbiano natural derivado de caldos de cultivo de la cepa *Actinoplanes* SE 50. Un componente insaturado que ha sido identificado como ciclito es esencial para una actividad inhibidora-glucosidasa (Heiner 2002). Acarbosa fue desarrollado y comercializado por Bayer, siendo el primer inhibidor de la alfa-glucosidasa aprobado para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Es un tratamiento de primera línea para los pacientes con diabetes tipo 2 adecuadamente tratados por la intervención dietética sola y para aquellos con altos niveles de glucosa en plasma postprandial (Derek et al., 2004).

La Acarbosa inhibe la alfa glucosidasa de manera reversible, competitiva y de manera dosis dependiente. Al inhibirla, retrasa la hidrólisis intestinal de oligosacáridos y disacáridos, principalmente en la mitad superior del intestino delgado, por consiguiente, la absorción de monosacáridos después de ingerir una comida se retrasa y el transporte de los mismos a la circulación se interrumpe (Mertes, 1998). La actividad farmacológica es persistente a largo plazo y con el uso continuo, además no existen en la literatura reportes de fallo y aunque no hay necesidad de ajustar la dosis en insuficiencia renal leve, se recomienda que sea retirada en caso de insuficiencia renal progresiva grave (Mertes, 2001). No obstante a largo plazo, la actividad de la alfa glucosidasa aumenta lentamente en la mitad inferior del intestino delgado debido a que la parte distal del intestino delgado es menos expuesta a los carbohidratos complejos (Heiner, 2002).

La afinidad relativa de la acarbosa para enzimas específicas es el siguiente: glicoamilasa > sacarasa > maltasa > dextranasa. Tiene poca afinidad por isomaltasa y ninguna afinidad por los beta-glucosidasas, tales como lactasa. Es importante resaltar que la acarbosa no tiene ningún efecto directo en la absorción de la glucosa (Costa y Pinol, 1997). La acarbosa se une a la sacarasa intestinal con 10^4 a 10^5 veces mayor afinidad que la sacarosa (Mertes, 1998). A diferencia de los derivados de desoxinojirimicina, que no actúan sobre la alfa amilasa pancreática, la acarbosa inhibe tanto la alfa amilasa como las alfa-glucosidasas con afinidad similar (Bischoff, 1994).

En los estudios clínicos se demostró que la acarbosa induce una mejora equivalente en el control glucémico de forma similar que la glibenclamida y la metformina en pacientes con diabetes tipo 2. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas después del tratamiento durante 24 semanas con acarbosa, metformina, o placebo fueron 7,6mM, 7,8mM, y 9,2mM, respectivamente, los niveles de glucosa postprandial de una hora fueron 8,7mM, 9,0mM y 10,9 mM, y los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) fueron 8,5%, 8,7% y 9,8% para los tres tratamientos, respectivamente. Acarbosa y metformina mejoraron significativamente cada una de estas medidas en comparación con el placebo ($p < 0,0001$), pero no hubo diferencias significativas entre acarbosa y metformina (Hoffmann y Spengler, 1997)

El tratamiento con acarbosa puede estar asociado con un aumento de la frecuencia de flatulencia y diarrea, como resultado de los efectos específicos del medicamento en la digestión de carbohidratos. La variación interindividual de estas enzimas intestinales, debido a factores genéticos o nutricionales, afecta considerablemente la magnitud de estos efectos adversos. La baja actividad de las enzimas alfa glucosidasa en el intestino delgado distal puede ocurrir en algunos pacientes, causando aumento y acumulación de carbohidratos no digeridos en el intestino grueso. Para reducir al mínimo los efectos adversos gastrointestinales, el tratamiento con acarbosa se debe iniciar con una dosis baja y aumentar gradualmente hasta que se logre un control glucémico adecuado (Heiner, 2002). Los efectos adversos gastrointestinales disminuyen significativamente de un 15% a 50% después de las 24 semanas, incluso con una dosis constante (Hoffmann y Spengler, 1997).

1.3.5 Plantas Medicinales como inhibidores de carbohidrasas intestinales

Existe un gran número de plantas con acción inhibitoria de la alfa-glucosidasa y alfa amilasa. Se han encontrado varios reportes de este posible modo de acción sobre todo en países con gran uso de la medicina tradicional ubicados principalmente en oriente y Latinoamerica. En la Tabla 1-3 se pueden encontrar las principales revisiones de plantas medicinales que han sido utilizadas tradicionalmente como antidiabéticas o hipoglicemiantes.

Tabla 1-3 Principales plantas medicinales con inhibición de alfa glucosidasa ó alfa amilasa

Lugar	Muestra	Resultados	Referencia
China	Se han reportado 82 extractos y 43 constituyentes de 41 plantas.	29 de estos extractos poseen una actividad inhibitoria de la alfa glucosidasa. 21 constituyentes demostraron inhibición de la alfa glucosidasa y 10 una inhibición de la alfa amilasa.	(Ye et al., 2010)
India	65 plantas especies de plantas y sus constituyentes.	4 plantas inhiben la alfa glucosidasa y 1 planta la alfa amilasa.	(Mukherjee et al., 2006).
Jordania	3 plantas	<i>Paronychia argentea</i> y la <i>Pistacia atlantica</i> , actividad inhibitoria de la alfa amilasa	(Hamdan et al., 2004).
	5 extractos de diferentes plantas.	Extractos de <i>Pistacia atlantica</i> , <i>Rheum ribes</i> y <i>Sarcopoterium spinosum</i> inhiben tanto la alfa glucosidasa como la alfa amilasa	(Hamdan et al., 2011).
Sudáfrica	4 extractos de plantas	3 demostraron inhibición tanto de la alfa glucosidasa como de la alfa amilasa	(Deutschländer et al., 2009)
	6 extractos en acetona de plantas	Inhibición tanto de alfa glucosidasa como alfa amilasa del extracto en acetona de <i>Cassia abbreviata</i> , <i>Senna italica</i> y <i>Mormordica balsamina</i>	(Shai et al., 2010).

Lugar	Muestra	Resultados	Referencia
Latinoamérica	27 plantas, infusiones, hierbas y especies.	2 plantas, 1 infusión y 2 especias inhiben de alfa-glucosidasa. Mientras que 1 planta, 1 especia y 2 infusiones, inhiben tanto la alfa-glucosidasa y la alfa-amilasa	(Galvez et al., 2010)
Brasil	356 especies	<i>Cassia auriculata</i> y la <i>Rhus chineses</i> presentaban la inhibición de alfa glucosidasa	(Negri, 2005)
México	4 plantas	Extracto de <i>Cecropia obtusifolia</i> , <i>Acosmium panamense</i> y <i>Malmea depressa</i> mostraron inhibir las alfa glucosidasas a menores concentraciones que la acarbosa	(Andrade et al., 2008).
Artículo de revisión en bases de datos Medline (PubMed)	47 especies pertenecientes a 29 familias.	Familias de plantas con mayor reporte como inhibidores de la alfa glucosidasa: Fabaceae (6 especies), Crassulaceae (3 especies); Hippocrateaceae (3 especies); Lamiaceae (3 especies); Myrtaceae (3 especies). Las especies más estudiadas son <i>Salacia reticulata</i> (Hippocrateaceae) y <i>Morus alba</i> (Moraceae). El estudio abarca también los productos naturales (componentes activos naturales y extractos crudos) aislados de las plantas medicinales que inhiben alfa glucosidasa y han sido notificadas durante la última década.	(Benalla et al., 2010)

Lo anterior indica que evaluar la inhibición de las carbohidrasas intestinales, principalmente alfa glucosidasa y alfa amilasa, por parte de plantas medicinales con actividad antidiabética demostrada, es una metodología frecuentemente utilizada para conocer el posible modo de acción de estas.

2 Metodología

2.1 Materiales

Alfa glucosidasa derivada de *Saccharomyces cerevisiae* Sigma/Aldrich G5003, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) Sigma/Aldrich N1377, Acarbosa Sigma/Aldrich A8980, Maltosa Sigma/Aldrich 63418, Polvo intestinal de rata (en acetona) Sigma/Aldrich I1630, un kit comercial Liquicolor (Human GLLQ1), extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, alfa amilasa de páncreas porcino (PPA) Sigma/Aldrich A3176, Almidón azul Sigma/Aldrich S7776.

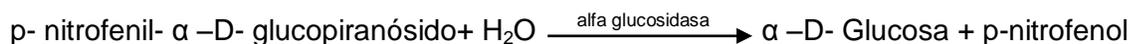
El extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* fue suministrado por estudiantes del grupo de investigación, tecnología de productos naturales del departamento de Farmacia y se preparó de la siguiente forma: 400 g de frutos se humectaron con 300mL de etanol al 96%, el material humectado se colocó en el percolador de 2L y posteriormente se adicionó 1500mL de etanol al 96%. Después de 24 horas se procedió abrir la llave del percolador, con una velocidad de goteo medio (aproximadamente 150 gotas por minuto). Una vez recolectado el extracto se concentró el extracto en el rotavapor. El proceso de extracción se realizó por 4 días (4 pasadas de solvente) para un total de etanol al 96% de 6L (relación droga:solvente 1:15). Para obtener el extracto seco este se concentró en rotavapor hasta evaporar la mayoría del etanol y se terminó la concentración en baño maría hasta obtener un extracto con una humedad entre el 3% y el 5% (Bernal, 2012)

2.2 Equipos

Lector de Microplacas BIORAD modelo 550, Espectrofotómetro de microplacas xMark BIORAD y lector de microplacas espectrofotómetro TECAN GENios, Sonicador Q125 QSONICA.

2.3 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de alfa glucosidasa.

Para determinar las condiciones adecuadas del ensayo de inhibición se utilizó la metodología descrita por Pistia-Brueggemann (Pistia y Hollingsworth, 2001) con ligeras modificaciones. El fundamento del ensayo se describe en la siguiente reacción.



En donde la actividad de la alfa-glucosidasa se evalúa indirectamente a través del p-nitrofenol liberado (el cual absorbe a 415 nm). Y una unidad de enzima liberará 1,0 μ mol de D-glucosa y 1,0 μ mol de p-nitrofenol por minuto, a partir de p-nitrofenil α -D-glucósido a pH 6,8 y 37°C. Por lo tanto a mayor inhibición de la enzima, menor es la cantidad de p-nitrofenol encontrada. (SIGMA, 1996)

Variables fijas: temperatura 37°C

Variables a determinar: concentración de sustrato, concentración de enzima.

Buffer: Se utilizó un buffer de fosfatos 0,5M que contiene con 0,244M de fosfato dibásico de potasio y 0,256M de fosfato monobásico de potasio con un pH 6,5-6,8.

Enzima: Se utilizó la enzima alfa glucosidasa de origen bacteriano (*Saccharomices cerviceae*) a varias concentraciones: 0,1U./mL, 1U./mLy 10U./mL.

Sustrato: Se utilizó como sustrato pNPG a concentraciones de 11,3mM, 7,5mM, 5mM, 3,3mM, 2,2mM, ya que estaban en el rango de concentraciones más reportadas en la literatura. Cada concentración de sustrato fue hecha por triplicado y leída por triplicado para dar un total de 9 mediciones.

Procedimiento: Se utilizó una microplaca de 96 pozos con un volumen máximo 300 μ L para cada pozo, se mezcló de la siguiente forma: 20 μ L buffer de fosfatos 0,5M, 20 μ L de la enzima y 40 μ L de agua destilada. La mezcla fue incubada a 37°C por 15min. 20 μ L de

substrato fueron adicionados y se incubó a 37°C por otros 15min, 30min, 45min y 60min. Después de esto la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro con un lector de microplacas BIORAD Modelo 550 a 415nm.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

La absorbancia se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Absorbancia} = (A_{415\text{nm}} \text{ Test} - A_{415\text{nm}} \text{ Blanco})$$

2.3.1 Inhibición de alfa glucosidasa utilizando pNPG como sustrato

Variables fijas: temperatura, concentración de sustrato, concentración de enzima.

Variable a determinar: concentración inhibitoria 50.

Buffer: se utilizó el mismo buffer mencionado en el anterior ensayo.

Enzima: Se utilizó la misma solución stock de enzima mencionada en el anterior ensayo, y se utilizó una concentración de 1UI/mL.

Sustrato: Se utilizó el mismo sustrato mencionado en el anterior ensayo y se utilizó una concentración de 11,3mM.

Inhibidor: Se utilizó acarbosa como patrón (control positivo) y el extracto etanólico de *Physalis peruviana*. Dado que en la literatura también se encuentra reportadas varias CI_{50} de la acarbosa y esta varía dependiendo de las condiciones del ensayo, se emplearon concentraciones de 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80, 40 y 20µg/mL de acarbosa. Para el extracto se utilizaron concentraciones de 10240, 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80 y 40µg/mL. Cada concentración de inhibidor fue incubada por triplicado y a su vez leída por triplicado para dar un total de 9 mediciones.

Procedimiento: Se utilizó una microplaca de 96 pozos con un volumen máximo 300µL para cada pozo, se mezcló de la siguiente forma: 20µL buffer de fosfatos 0,5M, 10µL del inhibidor, 10µL de la enzima y 40µL de agua destilada. La mezcla fue incubada a 37°C por 15min. 10µL de sustrato fueron adicionados y se incubó a 37°C por otros 15min, 30min, 45min y 60min. Después de esto la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro con lector de microplacas BIORAD Modelo 550 a 415nm.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

Para la última fila de la placa se no se colocó inhibidor, definiendo este sistema como el 100% de actividad enzimática.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula (Ye et al., 2010).

$$\% \text{ de Inhibición de la } \alpha \text{ - glucosidasa} = \frac{[(A_0 - A_{\text{blanco}}) - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})]}{(A_0 - A_{\text{blanco}})} * 100$$

Siendo:

A_0 = Absorbancia del 100% de la actividad enzimática.

A_{muestra} = absorbancia de la muestra o del patrón.

Y el A_{blanco} = como la absorbancia de la muestra ó patrón sin la presencia de la enzima.

2.3.2 Inhibición de alfa glucosidasa obtenida a partir del extracto acetónico de intestino de rata usando pNPG como sustrato.

En la literatura se encuentran diferentes métodos para evaluar la inhibición de estas enzimas, la gran mayoría de autores refiere que utiliza la alfa glucosidasa de origen bacteriano (*Saccharomyces cerevisiae*) y unos pocos refieren utilizar el liofilizado de polvo intestinal de rata que contiene una mezcla de enzimas intestinales. En el presente trabajo se utilizaron las dos metodologías a las mismas condiciones, con el fin de evaluar cual de las dos mostraba mejores resultados.

VARIABLES FIJAS: temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato.

VARIABLE A DETERMINAR: Concentración inhibitoria 50.

BUFFER: se utilizó el mismo buffer mencionado en el anterior ensayo.

ENZIMA: Se empleó el sonicador Q125 QSONICA, con un control de la una amplitud del 90% (90wt). Se suspendió un total de 100mg polvo intestinal de rata en 1mL de solución salina normal, se sonicó la suspensión 12 veces por 30 segundos a 4°C. Después se centrifugó (15000rpm, 30 min, 4°C) se utilizó 600µL del sobrenadante resultante que quedó a una concentración de 1,0UI/mL y para utilizar en el ensayo (Jo et al., 2011; Ayinampudi et al., 2012).

Se utilizó enzima extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata a una concentración de 1,0 UI/mL.

SUSTRATO: Se utilizó como sustrato el pNPG que se preparó de la manera indicada con anterioridad y se utilizó una concentración de 11,3mM.

INHIBIDOR: Se utilizó tanto el control positivo como la muestra en las mismas concentraciones que el ensayo anteriormente descrito.

PROCEDIMIENTO: Se utilizó una microplaca de 96 pozos con un volumen máximo 300µL para cada pozo, se mezcló de la siguiente forma: 20µL buffer de fosfatos 0,5M, 10µL del inhibidor, 10µL de la enzima y 40µL de agua destilada. La mezcla fue incubada a 37°C por 15min. 10µL de sustrato fueron adicionados y se incubó a 37°C por otros 15min, 30min, 45min y 60min. Después de esto la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro con un lector de microplacas BIORAD modelo 550 a 415nm.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

Para la última fila de la placa se no se colocó inhibidor, definiendo este sistema como el 100% de actividad enzimática.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó al siguiente fórmula: (Ye et al., 2010)

$$\frac{[(A_0 - A_{blanco}) - (A_{muestra} - A_{blanco})]}{(A_0 - A_{blanco})} * 100 = \% \text{ de Inhibición de la } \alpha - \text{ glucosidasa}$$

Siendo A_0 = Absorbancia del 100% de la actividad enzimática.

$A_{muestra}$ = absorbancia de la muestra o del patrón.

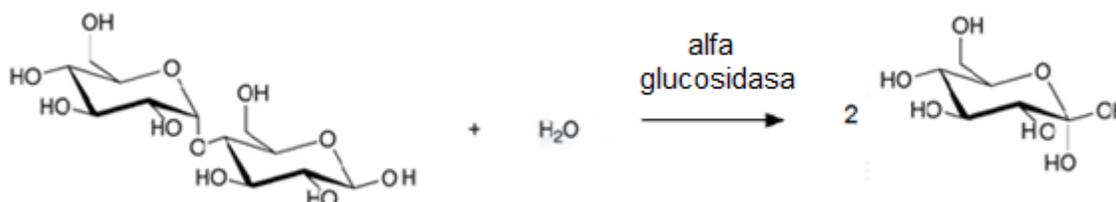
Y el A_{blanco} = como la absorbancia de la muestra ó patrón sin la presencia de la enzima.

2.4 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de maltasa

Para determinar las condiciones adecuadas del ensayo de inhibición, se utilizó la determinación de Glucosa por el método Glucosa Oxidasa- Peroxidasa (Dahlqvist, 1964, Jo et al., 2009). El fundamento del ensayo se describe en la siguiente reacción:

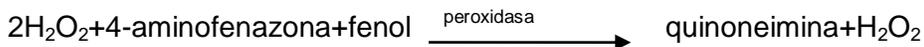
Como se muestra en la Figura 2-1, se lleva a cabo una reacción de hidrólisis, que rompe los enlaces de la maltosa convirtiéndola en dos moléculas de glucosa.

Figura 2-1 Reacción de hidrólisis de la maltosa



(Worthington, 1993)

La glucosa liberada se midió mediante el método de glucosa oxidasa. La reacción de la glucosa oxidasa junto con una reacción auxiliar se ha utilizado ampliamente para la determinación de la glucosa en los fluidos biológicos. Se han desarrollado multitud de reacciones auxiliares distintas a fin de mejorar la especificidad global del sistema de reacción o para retener la especificidad inherente de la glucosa oxidasa. El método utilizado en este reactivo se basa en la reacción indicadora de peróxido de hidrógeno que une a 4-aminoantipirina a un compuesto fenólico (Trinder, 1969).



La quinoneimina es de color rosa-violeta es leída a una longitud de onda entre 460nm y 560nm.

Primero la glucosa se oxida por acción de la glucosa oxidasa para dar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, posteriormente, el peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de peroxidasa con 4-aminofenazona y fenol, produciendo un complejo rojo-violeta usando al quinoneimina como indicador (Trinder ,1969). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa y se puede medir fotométricamente entre 460nm y 560nm.

Una unidad de maltasa puede convertir 1.0 μ mol of maltosa a 2.0 μ mol de D-glucosa por minuto a pH 6.0 y 25°C (la glucosa liberada se determina aun pH de 7.0). La unidad de peroxidasa oxida 1,0 μ mol de β -D-glucosa a D-gluconolactona y H₂O₂ por minuto a pH 5,1 a 35 ° C (equivalente a un consumo de O₂ de 22,4 μ l por minuto). Si la mezcla de reacción se satura con oxígeno, la actividad puede aumentar hasta en un 100% (Sigma, 1994).

Variables fijas: temperatura, concentración de enzima.

Variable a determinar: concentración de sustrato.

Buffer: se utilizó el mismo buffer mencionado en el anterior ensayo.

Enzima: Se utilizó enzima extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata a una concentración de 1,0 UI/mL.

Sustrato: Se utilizó como sustrato maltosa a las siguientes concentraciones: 16,88mM, 11,3mM, 7,5mM, 5mM, 3,3mM, 2,2mM, ya que estaban en el rango de concentraciones más reportadas en la literatura. Cada concentración de sustrato fue hecha por triplicado y leída por triplicado para dar un total de 9 mediciones.

Procedimiento: Se utilizaron 4 microplacas de 96 pozos con un volumen máximo 300 μ L para cada pozo, se mezcló de la siguiente forma cada microplaca: 20 μ L buffer de

fosfatos 0,5M, 20µL de la enzima y 40µL de agua destilada. La mezcla fue incubada a 37°C por 15min. 20µL de sustrato fueron adicionados y se incubo a 37°C por otros 10min, 25min, 40min y 55min, respectivamente, por último, se adicionó un kit comercial Liquicolor® Human y se volvió a incubar durante 5min más, después de esto la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro con un lector de microplacas BIORAD xMARK a 540nm.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

La absorbancia se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Absorbancia} = (A_{540\text{nm}} \text{ Test} - A_{540\text{nm}} \text{ Blanco})$$

2.4.1 Inhibición de maltasa obtenida a partir del extracto acetónico de intestino de rata.

Variables fijas: temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato.

Variable a determinar: Concentración inhibitoria 50.

Buffer: Se utilizó el mismo buffer mencionado en el anterior ensayo.

Enzima: Se utilizó enzima extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata a una concentración de 1,0UI/mL

Sustrato: Se utilizó como sustrato la maltosa que se preparó de la manera indicada con anterioridad y se utilizó una concentración de 7,5mM.

Inhibidor: Se utilizó tanto el control positivo como la muestra en las mismas concentraciones que el ensayo anteriormente descrito.

Procedimiento: Se utilizaron 4 microplacas de 96 pozos con un volumen máximo 300µL para cada pozo, se mezcló de la siguiente forma cada microplaca: 20µL buffer de fosfatos 0,5M, 10µL del inhibidor, 10µL de la enzima y 40µL de agua destilada. La mezcla

fue incubada a 37°C por 15min. 20µL de sustrato fueron adicionados y se incubó a 37°C por otros 10min, 25min, 40min y 55min, respectivamente, por último, se adicionó el kit comercial Liquicolor® Human y se volvió a incubar durante 5min más, después de esto la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro con un lector de microplacas BIORAD xMARK a 540nm.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

Para la última fila de la placa se no se colocó inhibidor, definiendo este sistema como el 100% de actividad enzimática.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó al siguiente formula (Jo et al., 2011)

$$\% \text{ de Inhibición de la maltasa} = \frac{[(A_0 - A_{blanco}) - (A_{muestra} - A_{blanco})]}{(A_0 - A_{blanco})} * 100$$

Siendo A_0 = Absorbancia del 100% de la actividad enzimática

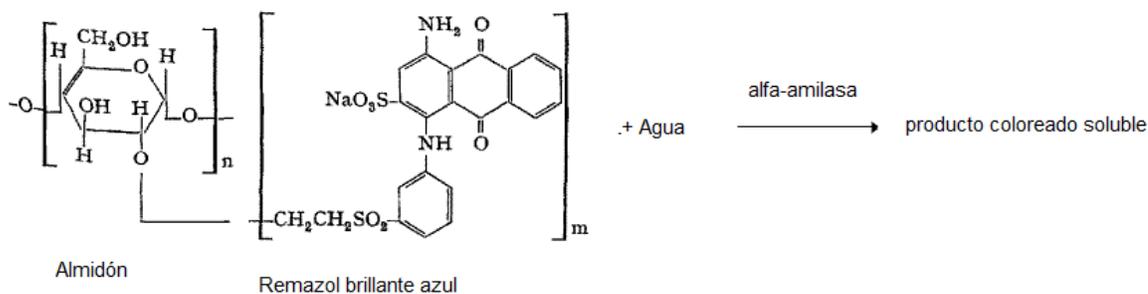
$A_{muestra}$ = absorbancia de la muestra o del patrón.

Y el A_{blanco} = como la absorbancia de la muestra ó patrón sin la presencia de la enzima.

2.5 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de alfa amilasa

Se utilizó la metodología descrita por Hansawasdi- Kawabata (Hansawasdi et al., 2000) con ligeras modificaciones. El ensayo se fundamenta en la hidrólisis del almidón unido covalentemente al Remazol azul brillante el cual es insoluble (Rinderknecht et al., 1967).

Figura 2-2 Reacción de hidrólisis del almidón azul



(Tomado de Rinderknecht et al., 1967)

VARIABLES FIJAS: temperatura, concentración de enzima.

VARIABLE A DETERMINAR: concentración del sustrato.

Buffer: Se utilizó un buffer Tris-HCl (0,05M, pH 6.9) que contiene cloruro de calcio 0,01M.

Enzima: La enzima alfa amilasa fue diluida el buffer de Tris-HCl (0,05M, pH 6.9). Se utilizó una solución de alfa amilasa en concentración de 2 UI/mL ya que fue la única concentración reportada en la literatura. Y una unidad de alfa amilasa ha sido definida previamente por el proveedor como aquella que libera 1,0mg de maltosa a partir del almidón en 3 minutos a pH 6,9 a 20°C (SIGMA, 1995).

Sustrato: Se utilizó como sustrato almidón azul que fue suspendido en el buffer en concentraciones de 20, 10, 5, 2,5 y 1,3 mg/mL ya que estaban en el rango de concentraciones más reportadas en la literatura.

Procedimiento: 200µL del sustrato fueron llevados a ebullición (100°C) por 5min y posteriormente se incubaron a 37°C por 5 minutos. Se agregó 100µL de solución de alfa amilasa 2 U.I./mL. La reacción fue llevada a cabo a 37°C por 10min. La reacción de la mezcla fue centrifugada a 3000rpm por 5min a 4°C. Al sobrenadante se le midió una absorbancia a 595nm, utilizando un espectrofotómetro TECAN GENios.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

La absorbancia fue calculada de la siguiente forma:

$$\text{Absorbancia} = (A_{595\text{nm}} \text{ Test} - A_{595\text{nm}} \text{ Blanco}).$$

2.5.1 Inhibición de alfa amilasa

VARIABLES FIJAS: temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato.

VARIABLE A DETERMINAR: Concentración inhibitoria 50.

Buffer: Se utilizó un buffer de Tris-HCl (0,05M, pH 6.9) que contiene cloruro de calcio 0,01M, hecho con anterioridad.

Enzima: Se utilizó una solución de alfa amilasa en concentración de 2,11U.l/mL.

Sustrato: Se utilizó como sustrato almidón azul a una concentración de 10 mg/mL.

Inhibidor: Se utilizó tanto el control positivo, acarbose, como la muestra, extracto etanólico de *Physalis peruviana* en las mismas concentraciones que en los ensayos anteriormente descritos.

Procedimiento: 200µL del sustrato fueron llevados a ebullición (100°C) por 5min y posteriormente se incubaron a 37°C por 5 minutos. Se agregó 200µL del inhibidor y 100µL de solución de alfa amilasa 2 U.l/mL. La reacción fue llevada a cabo a 37°C por 10min. La mezcla de reacción fue centrifugada a 3000rpm por 5min a 4°C. A 100 µL del sobrenadante se le midió una absorbancia a 595nm, utilizando un espectrofotómetro TECAN GENios.

Las últimas 3 columnas de la placa se destinaron para el blanco en el cual se colocaban todos los reactivos excepto la enzima.

Para la última fila de la placa se no se colocó inhibidor, definiendo este sistema como el 100% de actividad enzimática.

La inhibición de la alfa amilasa fue calculada de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición PPA} = \frac{(A_c - A_b) - (A_m - A_b)}{(A_c - A_b)} * 100 \text{ (Hansawasdi et al., 2000)}$$

Donde A_c la absorbancia del 100% de la actividad enzimática (solo el vehículo con la enzima)

A_m la muestra (con la enzima).

A_b el blanco (vehículo sin la enzima).

2.6 Comportamiento cinético del extracto de *Physalis peruviana*

Por otra parte, también se evaluó el comportamiento inhibitorio del extracto a diferentes tiempos con el fin de evaluar si es de tipo competitivo o no.

Se utilizó la metodología descrita por Kim y Shai, con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción fue realizada como se ha descrito anteriormente, excepto que varió la concentración del sustrato utilizando concentraciones de 16,9mM, 11,3mM, 7,5mM, 5mM, 3,3mM y 2,2mM. La concentración del extracto se mantuvo constante a 5120µg/mL. La reacción se inició mediante la adición de la enzima, y el punto final se leyó a 415nm para alfa glucosidasa, 540nm para maltasa y 595nm para alfa amilasa, a intervalos de 5 minutos durante 20 min (Kim et al., 2005; Shai et al., 2010).

Para determinar la velocidad de la reacción primero se determinó la pendiente de los datos de absorbancia en función del tiempo. Se determinó la pendiente de los datos de absorbancia en función del tiempo. Las unidades de estas pendientes son en Absorbancia sobre tiempo y estarán en mM ó mg por unidad de tiempo, este valor es por definición la velocidad enzimática. Luego se graficó esta velocidad enzimática en función de la concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos.

Luego mediante la utilización del modelo lineal utilizando la gráfica Lineweaver-Burk, donde se grafica el inverso de la velocidad en función del inverso de la concentración de sustrato el intercepto en Y nos proporciona el inverso de V_{max} y el intercepto en X el inverso de K_m (Murray et al., 2004), para poder establecer cuál tipo de inhibición (competitiva, no competitiva o acompetitiva) se ajusta más.

2.7 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados, como la media aritmética de los valores \pm desviación estándar ó error estándar de la media y fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Tukey y analizados mediante una ANOVA de dos vías; seguido de un test Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró que la diferencia entre la muestra y el blanco fue significativa (*), cuando $p < 0.05$. Los cálculos estadísticos y las gráficas, fueron procesados usando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows

3 Resultados y discusión

3.1 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de alfa glucosidasa a partir de la enzima derivada de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la primera etapa del trabajo se evaluó el comportamiento normal de la enzima alfa glucosidasa en función de la concentración del sustrato. En este caso el sustrato fue pNPG (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido) el cual en presencia de la enzima libera p-nitrofenol que es cuantificado a 415nm.

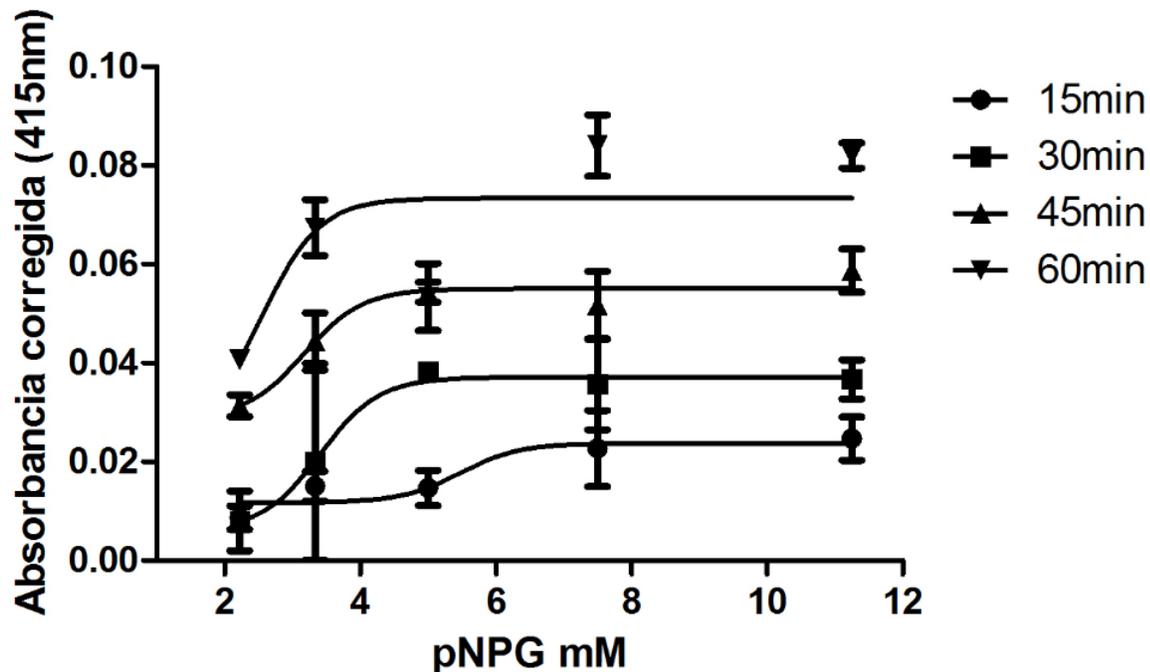
Teniendo en cuenta que en trabajos previos, en los que se emplea esta metodología, los tiempos de incubación variaban desde 5 hasta 75 minutos (Hogan et al., 2010), que las concentraciones de enzima están en un rango desde 0,01UI/mL (Ji et al., 2004) hasta 20 UI/mL (Kim et al., 2008) y que las concentraciones de sustrato están entre 0,5mM (Mayur et al., 2010) y 20mM (Ye et al., 2010), se decidió evaluar el comportamiento de la enzima en concentraciones de 0,1, 1,0 y 10 UI/mL, con diferentes tiempos de incubación y concentraciones de pNPG entre 2,2 y 11,3mM. Los resultados se presentan en las tablas 3-1 a 3-3 y en las gráficas 3-1 a 3-3.

Tabla 3-1 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (0,1UI/mL).

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
pNPG (mM)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
11,3	0,024 \pm 0,007	0,037 \pm 0,007	0,059 \pm 0,008	0,082 \pm 0,005
7,5	0,023 \pm 0,014	0,036 \pm 0,016	0,052 \pm 0,012	0,084 \pm 0,011
5,0	0,015 \pm 0,006	0,038 \pm 0,002	0,054 \pm 0,004	0,053 \pm 0,012
3,3	0,015 \pm 0,005	0,020 \pm 0,034	0,044 \pm 0,010	0,067 \pm 0,010
2,2	0,009 \pm 0,004	0,008 \pm 0,010	0,031 \pm 0,004	0,041 \pm 0,003

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3)

Figura 3-1 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (0,1UI/mL).



Absorbancia Corregida: Absorbancia de la muestra-Absorbancia del blanco de la muestra. pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranósido). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

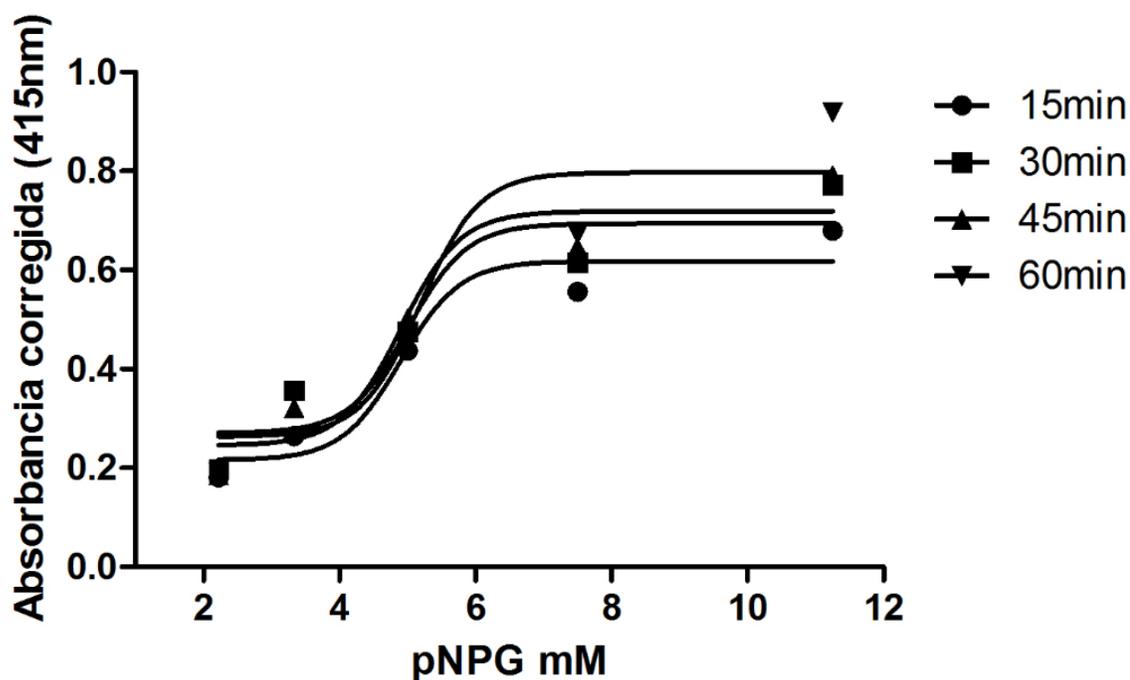
En el análisis de varianzas de dos vías seguido del post- test de Bonferroni, en cuanto al tiempo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 15 y 30 min, los tiempos 30 y 45 minutos, ni entre los 45 y 60 min a ninguna concentración, mientras que entre los tiempos de 15 y 45, 15 y 60 y 30 y 60 min fueron diferentes la mayoría de las concentraciones evaluadas (Tabla A-1 en el Anexo A). Estos resultados sugieren que la reacción mediada por la enzima es fuertemente dependiente del tiempo de incubación y que diferencias de tiempo superiores a 15 min influyen en el resultado encontrado.

Tabla 3-2 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (1UI/mL).

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
pNPG (mM)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
11,3	0,680±0,023	0,772±0,016	0,791±0,012	0,919±0,007
7,5	0,556±0,029	0,615±0,033	0,646±0,029	0,672±0,019
5,0	0,437±0,017	0,476±0,014	0,503±0,010	0,472±0,011
3,3	0,264±0,009	0,357±0,003	0,322±0,001	0,347±0,006
2,2	0,181±0,021	0,197±0,022	0,186±0,029	0,190±0,020

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3)

Figura 3-2 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (1UI/mL).



Absorbancia Corregida: Absorbancia de la muestra-Absorbancia del blanco de la muestra. pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

Para esta concentración enzimática en cuanto la variable del tiempo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 15 y 30, 15 y 45 y 15 y 60 minutos, en la mayoría de concentraciones, mientras que entre los tiempos de 30 y 45,

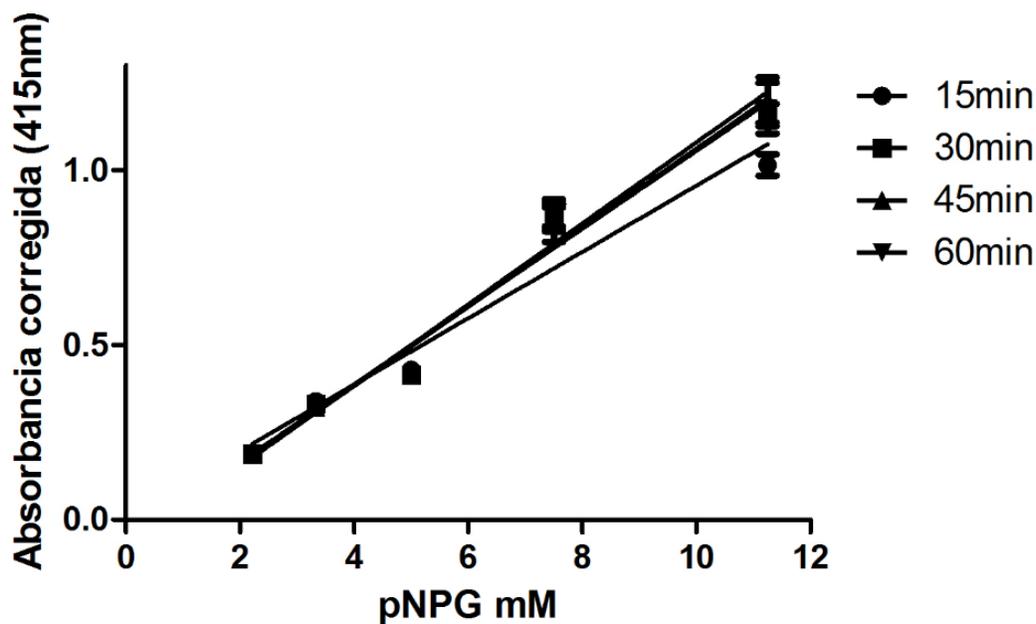
30 y 60 y 45 y 60 min solo las concentraciones más altas del sustrato presentaban diferencias significativas (Tabla A-2 en el Anexo A). Estos resultados sugieren que con el tiempo la reacción enzimática se va equilibrando y después de media hora el tiempo no presenta influencia sobre los resultados.

Tabla 3-3 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (10UI/mL).

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
pNPG (mM)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
11,3	1,015±0,053	1,158±0,056	1,201±0,113	1,177±0,126
7,5	0,844±0,085	0,878±0,067	0,871±0,069	0,864±0,067
5,0	0,429±0,008	0,415±0,008	0,414±0,009	0,413±0,011
3,3	0,339±0,012	0,332±0,006	0,323±0,013	0,322±0,014
2,2	0,188±0,003	0,188±0,002	0,190±0,003	0,189±0,003

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3)

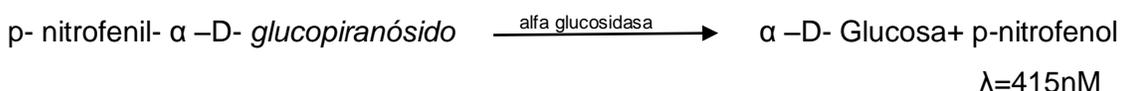
Figura 3-3 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa glucosidasa (10UI/mL).



Absorbancia Corregida: Absorbancia de la muestra-Absorbancia del blanco de la muestra. pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

Para la concentración enzimática de 10UI/mL en cuanto al tiempo únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la concentración más alta del sustrato (Tabla A-3 en el Anexo A). Estos resultados nos permiten deducir que para esta concentración enzimática diferencias de tiempo no influyen en el resultado encontrado

En este tipo de ensayos, las enzimas no se consumen en la reacción que catalizan y la actividad de estas se mide en función de los cambios en la concentración de sustrato o de producto liberado. En este ensayo, la reacción mediada por la alfa glucosidasa se mide en función de la concentración de producto liberado (p-nitrofenol) después de la acción de la enzima.



Inicialmente, la enzima transforma al pNPG en p-nitrofenol siguiendo un comportamiento lineal, a medida que avanza la reacción se va agotando la cantidad de sustrato y por consiguiente va disminuyendo la cantidad de producto que se genera por unidad de tiempo. En este momento disminuye la velocidad de la reacción y se alcanza un equilibrio en la reacción, lo que se manifiesta en la región asintótica de la curva (Murray et al., 2004). Un comportamiento de este tipo se obtuvo en el ensayo realizado con una concentración de alfa glucosidasa de 0,1UI/mL (tabla y gráfica 3-1). Sin embargo, la desviación estándar en cada uno de los puntos es alta, en especial si se compara con los resultados obtenidos para la concentración enzimática de 1,0 UI/mL (tabla y gráfica 3-2). Además, la absorbancia obtenida para la máxima actividad de alfa glucosidasa no supera los 0,08, valor inadecuado para proponer un ensayo que evalúe la posible inhibición enzimática en el cual se espera que no se libere el p-nitrofenol y en consecuencia la absorbancia disminuya considerablemente.

Respecto a la evaluación realizada con 1,0 UI/mL de alfa glucosidasa, es posible observar claramente tanto el comportamiento lineal como el asintótico que espera para de una reacción enzimática (gráfica 3-2), mostrando un equilibrio de la reacción, aproximadamente, desde la concentración de pNPG de 7,5 hasta la máxima concentración evaluada (11,3mM). En este caso, la máxima absorbancia encontrada fue

de 0,9, valor susceptible de ser disminuido en presencia de un inhibidor de la actividad enzimática.

Por el contrario, en la concentración enzimática de 10 U.I./mL no se manifiesta la curva asintótica en la gráfica por lo que el equilibrio de la reacción no se alcanza.

De acuerdo a los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de (enzima-sustrato) alfa glucosidasa y pNPG se estableció que la concentración más adecuada de enzima para el ensayo es de 1,0 UI/mL y que la concentración de pNPG sería 11,3 mM la cual está en zona de máxima reacción enzimática. La concentración de alfa glucosidasa está acorde a lo usualmente reportado en la literatura, donde la gran mayoría de autores utilizan 1UI/mL. Sin embargo, la concentración de pNPG sí es mucho mayor de la usualmente utilizada, la cual se encuentra reportada en su gran mayoría entre 1 y 5 mM de pNPG (Kwon et al., 2008; Hogan et al., 2010; Galvez et al., 2010; Jo et al., 2011; Shihabudeen et al., 2011, Wongsu et al., 2012). No obstante, Ye et al., reportan una concentración de 20mM para una concentración enzimática de 0,57 UI/mL (Ye et al., 2010). Dada la variedad de condiciones reportadas es importante destacar que cada laboratorio debe fijar las variables de su metodología y que las acá seleccionadas son aquellas que son repetibles en las condiciones de nuestro laboratorio.

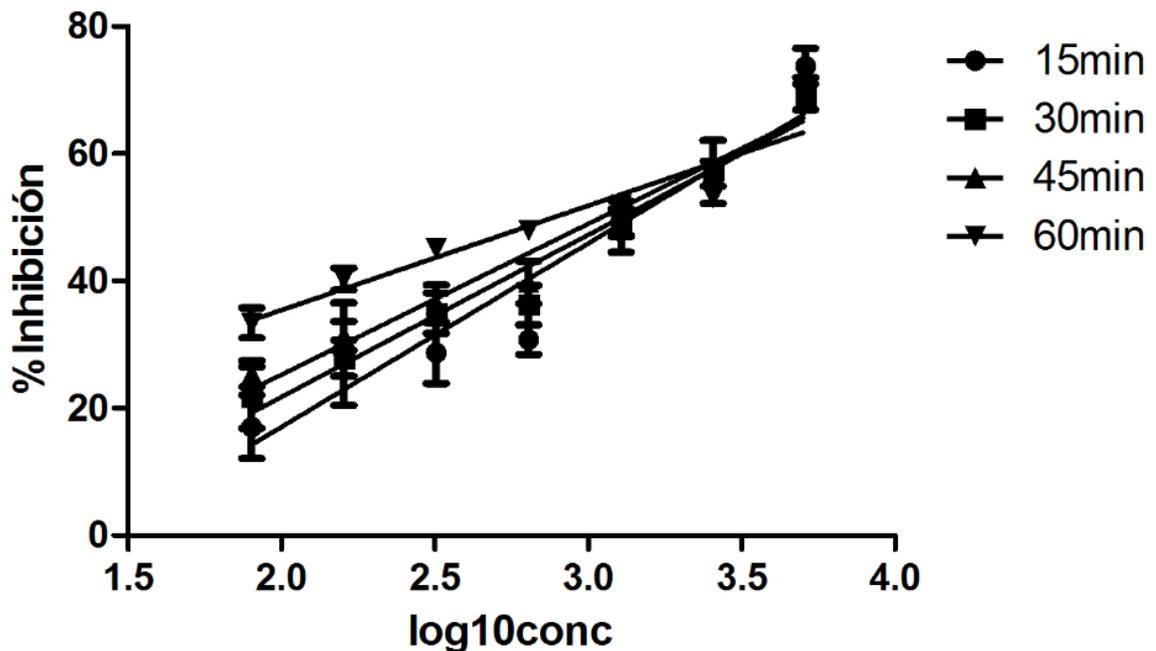
3.1.1 Inhibición de alfa glucosidasa derivada de *Saccharomyces cerevisiae* usando pNPG como sustrato

Una vez establecidos estos parámetros de concentración de la enzima y del sustrato, la siguiente etapa de la implementación del ensayo consistió en determinar experimentalmente la inhibición de la alfa glucosidasa por el fármaco acarbosa en ensayos de concentración-respuesta. La acarbosa es un reconocido inhibidor de la alfa glucosidasa y su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) ha sido reportada en rangos desde 2,5 μ g/ml (Mayur et al., 2010), hasta 10mg/ml (Youn et al., 2004), en este mismo ensayo. Los resultados obtenidos de la CI_{50} de acarbosa en el presente trabajo se presentan en la tabla 3-4 y gráfica 3-4.

Tabla 3-4 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Acarbosa ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
5120	73,8 \pm 4,9	68,9 \pm 2,5	69,4 \pm 4,3	68,6 \pm 0,8
2560	55,5 \pm 5,7	57,3 \pm 2,0	58,5 \pm 6,3	53,2 \pm 0,6
1280	47,8 \pm 5,7	49,3 \pm 3,7	49,8 \pm 4,9	52,0 \pm 1,4
640	30,8 \pm 4,0	36,2 \pm 5,4	39,8 \pm 5,7	47,9 \pm 2,5
320	28,7 \pm 8,4	34,9 \pm 5,5	36,4 \pm 5,1	45,1 \pm 2,5
160	28,5 \pm 14,0	27,8 \pm 4,9	31,3 \pm 3,9	40,3 \pm 3,0
80	17,1 \pm 8,6	21,7 \pm 8,4	25,4 \pm 3,5	33,4 \pm 4,1
CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	1387,5 (913,0-2298,0)	1282,6 (1001,0-1736,0)	1105,2 (866,4-1487,0)	773,2 (470,0-1296,0)

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La CI₅₀ esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

Figura 3-4 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa

Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

En el análisis de varianza de dos vías seguido de un test de Bonferroni, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones menores de 640 $\mu\text{g/mL}$ entre los tiempos de 15 y 60 minutos (Tabla A-4 en el Anexo A). Con estos

resultados podemos inferir que a altas concentraciones de acarbosa la inhibición no se ve afectada por el tiempo y que a su vez esta varía en tiempos superiores a 30 minutos.

El coeficiente de correlación (r^2) calculado para la regresión lineal en los tiempos de 15 y 60 minutos es de 0,914 y 0,916, mientras que para los de los tiempos de 30 y 45 minutos, fue de 0,967 y 0,969 respectivamente y aunque no se evaluó si hay diferencia significativamente estadística entre los mismos, dado que el coeficiente de correlación es una medida del comportamiento lineal se sugiere que los tiempos de 30 y 45 minutos son los tiempos más adecuados para evaluar la inhibición de la enzima.

La importancia de realizar este ensayo radica en tener un control positivo del ensayo es decir, demostrar con un patrón de inhibición el funcionamiento del ensayo, garantizando que, sin importar el comportamiento del extracto o de la sustancia a evaluar, es posible lograr la inhibición de la enzima.

La concentración inhibitoria 50 de la acarbosa para esta enzima en la literatura se reporta en concentraciones que varían desde 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (Mayur et al., 2010), hasta 10mg/mL (Youn et al., 2004). Es decir, que el valor de CI_{50} depende de las condiciones del ensayo tales como concentración de la enzima, concentración del sustrato y tiempo de incubación. En este caso los valores de CI_{50} obtenidos para acarbosa estuvieron entre 1,28 y 1,10 mg/mL, valores altos pero que se encuentran dentro del rango reportado en la literatura (Andrade et al., 2008; Gholamhoseinia et al., 2009; Mayur et al., 2010; Ye et al., 2010; Shihabudeen et al., 2011). Como se mencionó anteriormente, ya que la concentración de sustrato también está entre los valores más altos reportado en trabajos previos y que la acarbosa es un inhibidor competitivo de la enzima (Heiner, 2002), era de esperarse valores de CI_{50} altos para acarbosa.

3.1.2 Inhibición de alfa glucosidasa a partir del polvo del extracto acetónico de intestino de rata usando pNPG como sustrato

Una de las presentaciones comerciales de alfa glucosidasa utilizada es un liofilizado de un extracto intestinal de rata. En este extracto vienen varias enzimas intestinales de la

familia de alfa glucosidasa (EC 3.2.1.20) como maltasa, glucoinvertasa, sacarasa y glucoamilasa (CAZy, 2013).

Siguiendo el procedimiento de extracción de la alfa glucosidasa descrita en la página 34, se obtuvo un sobrenadante de concentración de alfa glucosidasa de 1,0 UI/mL (Jo et al., 2011, Kim et al., 2011). Debido a que se quieren comparar los resultados obtenidos mediante las dos fuentes enzimáticas, se dejó la misma concentración de pNPG del ensayo anterior en 11,3mM. Además, los autores que comparan las diferentes fuentes enzimáticas reportan las mismas concentraciones de sustrato y los mismos tiempos de incubación para ambos ensayos (Jo et al., 2009, Shihabudeen et al., 2011). Los resultados de esta inhibición mediada por acarbosa se presentan en la tabla 3-5 y gráfica 3-5.

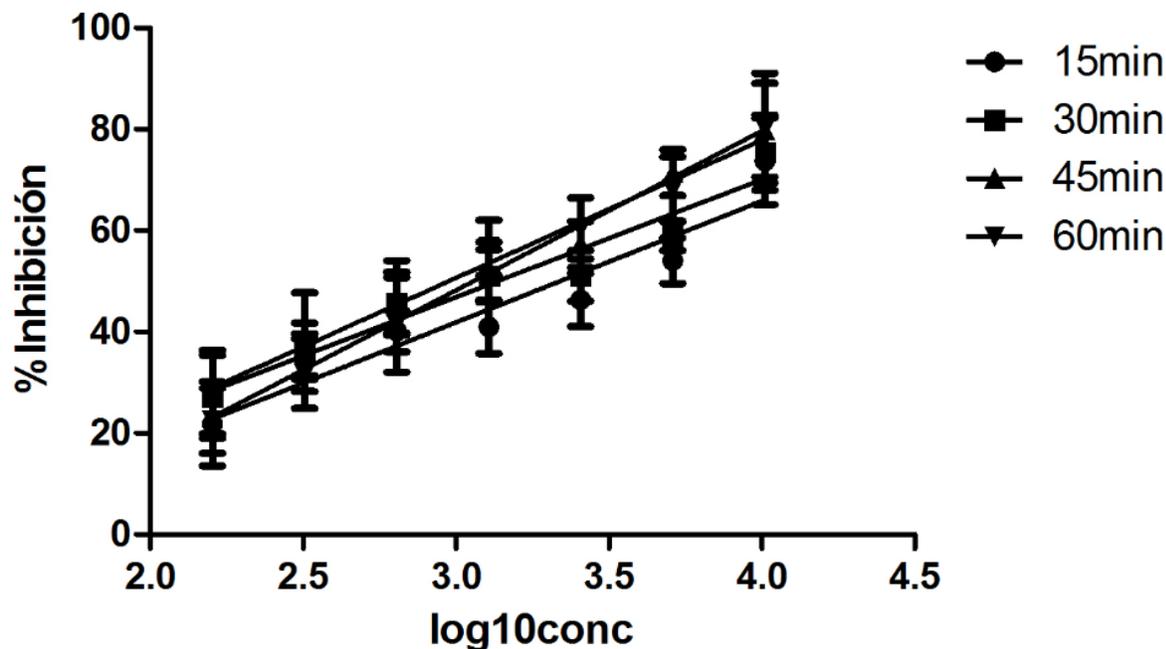
Tabla 3-5 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Acarbosa ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
5120	73,7 \pm 14,9	75,4 \pm 12,8	79,8 \pm 16,0	80,2 \pm 18,7
2560	54,0 \pm 7,7	58,9 \pm 5,0	71,4 \pm 7,8	68,1 \pm 11,2
1280	46,3 \pm 9,1	51,0 \pm 8,7	57,3 \pm 7,9	60,4 \pm 10,4
640	41,0 \pm 9,2	51,0 \pm 9,0	51,8 \pm 10,2	56,6 \pm 9,4
320	40,1 \pm 7,1	45,6 \pm 10,8	46,9 \pm 12,3	41,4 \pm 16,1
160	33,9 \pm 9,9	36,2 \pm 9,6	39,5 \pm 14,1	31,7 \pm 11,9
80	21,8 \pm 14,4	27,2 \pm 14,2	28,1 \pm 14,3	22,5 \pm 11,1
CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	1094,7 (649,2-1975,0)	683,6 (439,2-1080,0)	474,0 (355,3-623,5)	570,7 (457,1-691,4)

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La CI₅₀ esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

Para la inhibición enzimática ejercida por acarbosa sobre la alfa glucosidasa extraída del polvo intestinal de rata en no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos (Tabla A-5 en el Anexo A), lo que sugiere que el tiempo no afecta los resultados obtenidos en ninguna de las concentraciones evaluadas.

Figura 3-5 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata



Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

En este ensayo, los coeficientes de correlación para la regresión lineal fueron de 0,909, 0,939, 0,981, 0,987, para los tiempos de incubación de 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente, y aunque no se determinó si hay diferencia significativamente estadística entre los mismos, dado que el coeficiente de correlación es una medida del comportamiento lineal se sugiere que los mejores tiempos para evaluar el porcentaje de inhibición sobre la alfa glucosidasa extraída son entre 45 y 60 minutos. También se observa que la dispersión de los datos, aumenta considerablemente en comparación con los datos de la alfa glucosidasa purificada.

La CI_{50} reportada para acarbosa sobre la alfa glucosidasa extraída de fuente intestinal, varía entre 36,89 $\mu\text{g/ml}$ (Shihabudeen et al., 2011) y 400 $\mu\text{g/ml}$ (Shai et al., 2011). Es importante destacar que pocos artículos reportan pNPG como sustrato para alfa glucosidasa extraída de polvo intestinal de rata. Con respecto al valor de la CI_{50} llama la atención que el valor es mucho menor (entre 474,0 y 1094,1 $\mu\text{g/mL}$) que el encontrado para la enzima proveniente del *Saccharomyces cerevisiae* (entre 773,2 y 1387,5 $\mu\text{g/mL}$)

como lo demostró Shai quien encontró un valor de CI_{50} de acarbosa de 1,50mg/mL y 0,4mg/mL sobre alfa glucosidasa purificada y alfa glucosidasa extraída, respectivamente (Shai et al., 2011). Probablemente esto se deba a la diferencia de reconocimiento molecular en el sitio de unión de las enzimas. Es así como, muchos inhibidores de la alfa glucosidasa proveniente del *Saccharomyces cerevisiae* no presentan inhibición sobre las alfa glucosidasas extraídas de mamíferos (Kim et al., 2011, Jo et al., 2011). Incluso algunos autores reportan que tanto la voglibosa como acarbosa tienen efectos inhibitorios altos en alfa glucosidasa de mamíferos, pero ninguna actividad inhibidora frente a alfa glucosidasa de *S. cerevisiae* (Kim et al., 2005; Kumar et al., 2012), igualmente Shinde reportó que a concentración de 1mg/mL no hay inhibición de la acarbosa sobre la alfa glucosidasa de *S. cerevisiae* (Shinde et al., 2008).

3.2 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de maltasa a partir de la enzima derivada del extracto acetónico de intestino de rata.

Como se explicó anteriormente, en el extracto vienen varias enzimas intestinales de la familia de alfa glucosidasa (EC 3.2.1.20), como maltasa, glucoinvertasa, sacarasa y glucoamilasa (CAZy 2013). Por lo que se hizo factible evaluar estas enzimas de manera individual variando el sustrato, por ejemplo utilizando maltosa para evaluar maltasa ó sacarosa para sacarasa (Jo et al., 2009).

Siguiendo el mismo procedimiento de extracción de la alfa glucosidasa descrita en la página 34, se obtiene un sobrenadante de concentración enzimática de 1,0 UI/mL (Jo et al., 2009; Jo et al., 2011; Kim et al., 2011; Shihabudeen et al., 2011). En este caso el sustrato fue maltosa el cual en presencia de la enzima libera glucosa (Dahlqvist, 1964) que es cuantificada a 540nm utilizando un kit comercial Liquicolor® Human.

Teniendo en cuenta que en trabajos previos, en los que se emplea esta metodología, los tiempos de incubación variaban entre 15 y 120 minutos (Li et al., 2005) y que se querían comparar los resultados obtenidos en este ensayo con los previamente descritos, se utilizaron los mismos tiempos de incubación (15, 30, 45 y 60 min).

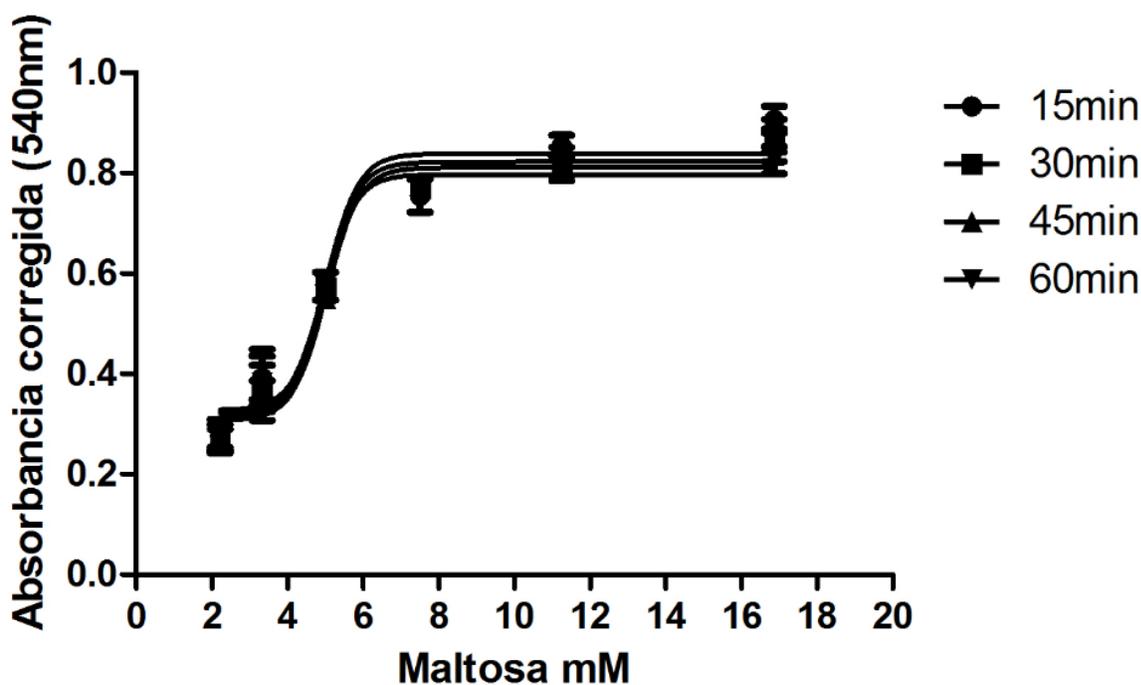
Por otra parte, las concentraciones de maltosa se reportaban desde 1,2mM (Jo et al., 2009) hasta 50mM (Kim et al., 2008), razón por la cual evaluamos este sustrato en concentración entre 2,2 y 16,9 mM. Los resultados se presentan en la tabla 3-6 y en la gráfica 3-6.

Tabla 3-6 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por maltasa (1 UI/mL).

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Maltosa (mM)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
16,9	0,907±0,037	0,875±0,046	0,855±0,046	0,826±0,038
11,3	0,853±0,030	0,822±0,041	0,808±0,025	0,805±0,028
7,5	0,755±0,047	0,770±0,011	0,769±0,007	0,761±0,002
5,0	0,577±0,008	0,571±0,022	0,550±0,001	0,574±0,039
3,3	0,393±0,080	0,371±0,091	0,356±0,043	0,383±0,048
2,2	0,276±0,032	0,270±0,029	0,270±0,041	0,277±0,045

Los resultados se expresan como la media ± S.D (n=3)

Figura 3-6 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por maltasa (1UI/mL).



Absorbancia Corregida: Absorbancia de la muestra-Absorbancia del blanco de la muestra. Los resultados se expresan como la media ± E.S.M (n=3)

En el análisis de varianza de dos vías seguido de un test de Bonferroni no se encontraron diferencias significativas (Tabla A-6 en el Anexo A), de lo que se deduce que la reacción mediada por la maltasa no se ve afectada por el tiempo.

En este ensayo enzimático se midió la concentración de glucosa liberada partir de diferentes concentraciones iniciales de maltosa se alcanza el equilibrio de la reacción cuando se observa el comportamiento asintótico de la gráfica (Murray et al., 2004). En la gráfica 3-6 se observa claramente un equilibrio de la reacción a partir de 7,5mM de maltosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de (enzima-sustrato) maltasa-maltosa podemos inferir que la concentración de maltosa ideal para evaluar el papel de posibles inhibidores de la actividad enzimática maltasa, es de 7,5mM. Aunque esta concentración de sustrato es un poco mayor a la usualmente utilizada, la cual se encuentra reportada en su gran mayoría entre 3,5 y 5mM de maltosa (Bhandari et al., 2007; Gao et al., 2008; Shinde et al 2008., Wang et al., 2010) se encuentra en el mismo rango de concentración y es la que presenta mejores resultados en nuestras condiciones de trabajo El análisis de varianza no mostró diferencias significativos en el tiempo sugiriendo que no hay efecto de dicho tiempo en la respuesta evaluada.

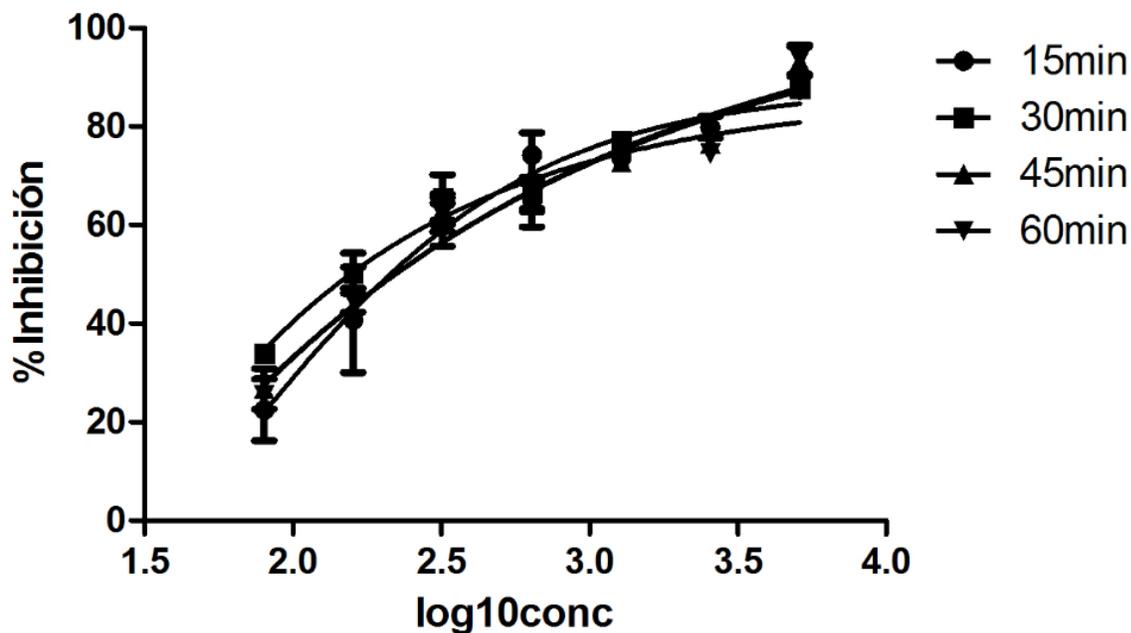
3.2.1 Inhibición de maltasa obtenida a partir del polvo del extracto acetónico de intestino de rata.

Una vez establecidos estos parámetros de concentración del sustrato, la siguiente etapa de la implementación del ensayo consistió en determinar experimentalmente el comportamiento en relación concentración-respuesta de acarbosa, un reconocido inhibidor de la maltasa, y determinar su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) la cual ha sido reportada para esta enzima en rangos desde 27.62 (Shankar y Dnyaneshwar, 2013) hasta 233 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Shinde et al., 2008), en este mismo ensayo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentan en la tabla 3-7 y gráfica 3-7.

Tabla 3-7 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Acarbosa ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
5120	87,5 \pm 2,6	87,7 \pm 1,6	93,2 \pm 5,2	93,6 \pm 5,1
2560	79,8 \pm 3,8	68,5 \pm 1,1	76,6 \pm 0,7	74,5 \pm 1,1
1280	73,6 \pm 2,7	77,0 \pm 2,4	72,8 \pm 2,5	73,9 \pm 1,2
640	74,2 \pm 7,8	66,4 \pm 5,5	65,8 \pm 5,4	64,0 \pm 7,6
320	60,0 \pm 7,5	65,6 \pm 8,0	63,2 \pm 5,4	62,1 \pm 6,1
160	40,7 \pm 18,5	50,2 \pm 7,1	42,3 \pm 2,5	44,7 \pm 4,2
80	22,5 \pm 10,8	34,0 \pm 2,2	26,8 \pm 7,2	25,4 \pm 3,0
CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	272,4 (168,6-389,5)	171,5 (80,74-374,6)	258,7 (158,9-382,2)	263,5 (153,5-407,7)

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La CI₅₀ esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

Figura 3-7 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata

Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

No se encontraron diferencias significativas en la variable del tiempo (Tabla A-7 en el anexo A).

Para estas gráficas, los coeficientes de correlación (r^2) son de 0,899, 0,844, 0,935 y 0,926 para los tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente, lo que nos conlleva a concluir que existe una relación no lineal entre la respuesta y la concentración que lo obtenido utilizando alfa glucosidasa extraída y pNPG como sustrato, esta diferencia como se explicó con anterioridad puede deberse a que la fuente enzimática es diferente.

Los valores de CI_{50} encontrados (entre 171,511 y 272,427) son cercanos a los reportados en la literatura para la inhibición de maltasa por parte de la acarbosa que van de $27,62 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$ (Shankar y Dnyaneshwar, 2013) a $233,0 \pm 4,0 \mu\text{g/mL}$ (Shinde et al., 2008). También se observa que existe una disminución de la CI_{50} con respecto a lo reportado en los ensayos anteriores, lo cual confirma que la acarbosa presenta una mejor inhibición para enzimas extraídas del intestino de rata, que por las derivadas de bacterias (Kim et al., 2008). Así mismo, también esta disminución se puede deber al sustrato utilizado ya que se ha reportado que al acarbosa se une a las enzimas intestinales tipo maltasa en mayor afinidad que el propio sustrato (Mertes, 1998).

3.3 Implementación de un ensayo para evaluar la inhibición de amilasa

La alfa amilasa hidroliza los enlaces 1-4, separando moléculas largas de los polisacáridos a partir de almidón y glucógenos, produciendo azúcares simples, principalmente glucosa y maltosa (SIB (2), 2013), por lo que su inhibición también está asociada a la reducción de niveles de glucosa en sangre.

Al igual que en los ensayos anteriores, en primera instancia se evaluó el comportamiento normal de la enzima alfa amilasa en función de la concentración del sustrato. En este caso el sustrato fue almidón unido covalentemente al Remazol azul brillante el cual es insoluble (almidón azul) el cual en presencia de la enzima libera un compuesto de color azul que es soluble, que es cuantificado a 595nm.

Teniendo en cuenta que en trabajos previos, en los que se emplea esta metodología, las concentraciones de sustrato variaban entre 2mg/mL (Gao y Kawabata, 2005) y 10mg/mL (Ye et al., 2010), se decidió evaluar el comportamiento de la enzima en estas concentraciones. Sin embargo, los autores que reportaban el empleo de esta

metodología reportaban una concentración enzimática de 2 UI/mL (Hansawasdi et al., 2000; Gao y Kawabata, 2005; Gao et al., 2008; Ye et al., 2010, Sudha y Kumar, 2012) y tiempo de incubación de 15 minutos, para fines comparativos se siguieron manejando los tiempos anteriormente descritos y se mantuvo en una concentración enzimática de 2UI/mL.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentan en la tabla 3-8 y gráfica 3-8

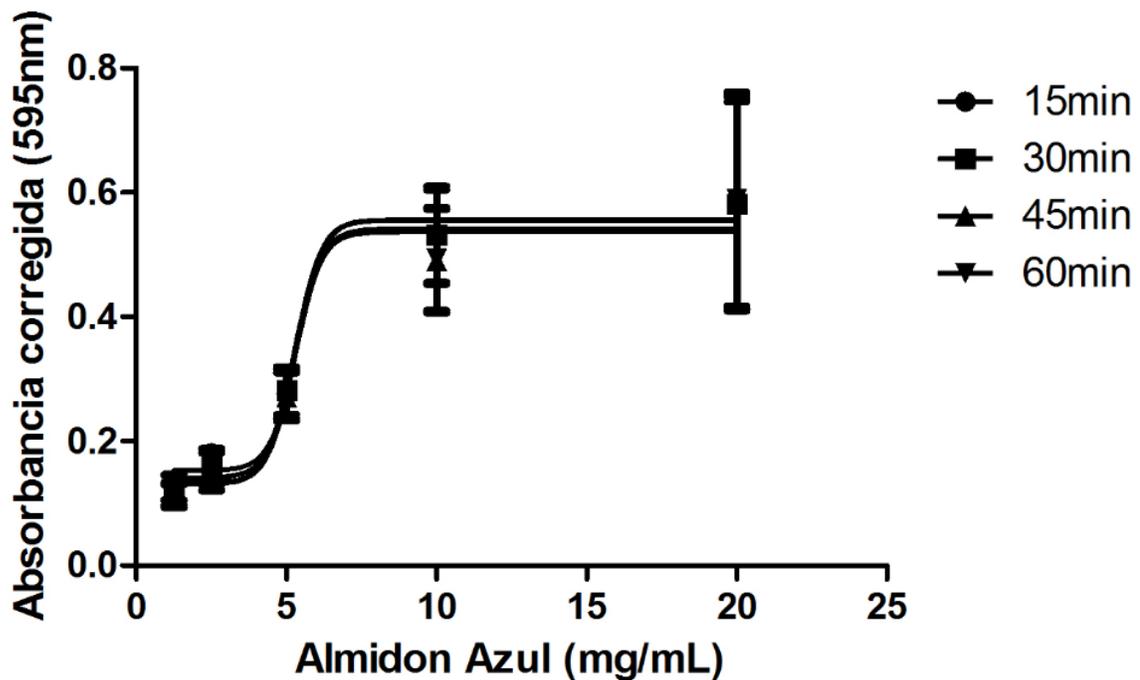
Tabla 3-8 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa amilasa (2UI/mL).

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Almidón Azul (mg/mL)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
20,0	0,582±0,298	0,581±0,286	0,584±0,298	0,590±0,298
10,0	0,530±0,129	0,531±0,136	0,490±0,144	0,493±0,144
5,0	0,276±0,069	0,281±0,067	0,271±0,066	0,274±0,067
2,5	0,180±0,027	0,159±0,051	0,151±0,052	0,151±0,052
1,3	0,126±0,035	0,124±0,035	0,115±0,032	0,111±0,032

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3)

Se induce que la reacción enzimática de la alfa amilasa no se ve afectada por el tiempo dado que en el análisis de varianza de dos vías seguido de un test de Bonferroni no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones evaluadas (Tabla A-8 en el Anexo A).

Figura 3-8 Efecto de la concentración de sustrato en la aparición de producto mediada por alfa amilasa (2UI/mL).



Absorbancia Corregida: Absorbancia de la muestra-Absorbancia del blanco de la muestra. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

En este caso el análisis de varianza de dos vías seguido del post- test de Bonferroni, reporta que no había una diferencia significativa entre los tiempos de incubación.

Para determinar la concentración de sustrato que sería mejor utilizar para el ensayo de inhibición, se requiere que se alcance el equilibrio de la reacción, es decir cuando se agote el sustrato y la cantidad de producto generado disminuya, lo cual se observa en la grafica 3-8, cuando la curva pasa de ser lineal a ser asintótica (Murray et al 2004). En la gráfica 3-8, se observa que muestra un equilibrio de la reacción a partir de 10mg/mL de almidón azul.

De acuerdo a los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de amilasa-almidón azul podemos plantear que la concentración de amilasa ideal para evaluar posibles inhibidores, es de 10mg/mL la cual es la usualmente utilizada (Hansawasdi et al., 2000; Ye et al., 2010; Sudha y Kumar, 2012). Como el análisis de varianza no mostró

diferencias significativas en el tiempo, se evidenció que esta variable, en el rango evaluado, no tiene influencia en la respuesta obtenida.

3.3.1 Inhibición de alfa amilasa

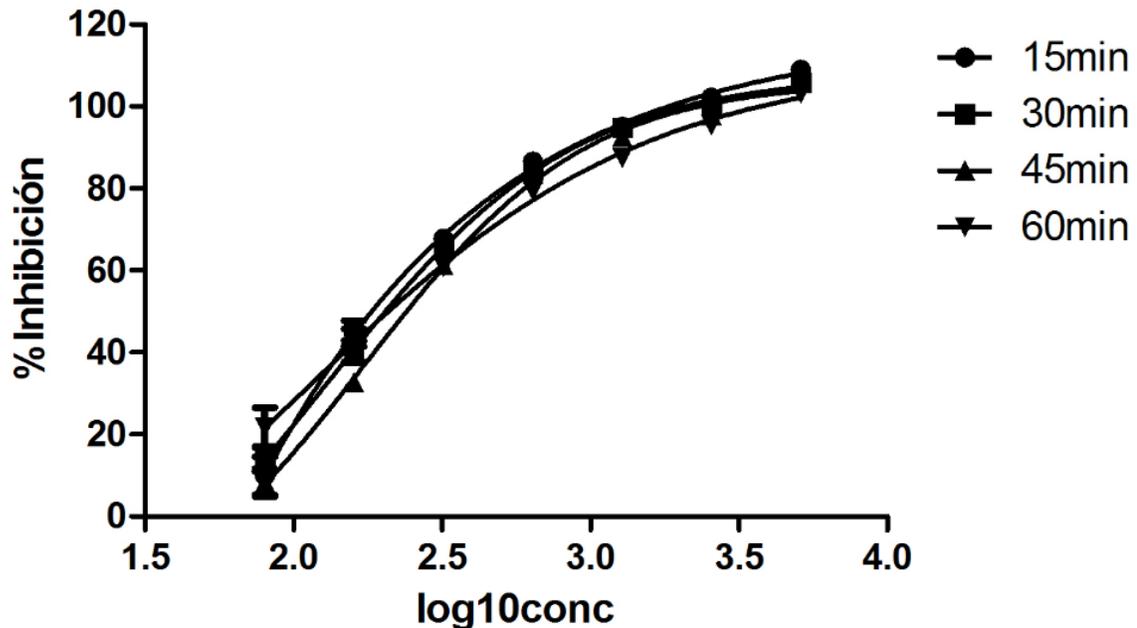
Una vez establecidos estos parámetros de concentración de la enzima y del sustrato, la siguiente etapa de la implementación del ensayo consistió en determinar experimentalmente el comportamiento en relación concentración-respuesta de acarbosa, un inhibidor de la alfa amilasa, y determinar su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) la cual ha sido reportada para esta enzima en rangos desde 1,75 μ g/mL (Kim et al., 2005) hasta 14,9mg/mL (Subramanian et al., 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentan en la tabla 3-9 y gráfica 3-9.

Tabla 3-9 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa amilasa

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Acarbosa (μ g/mL)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
5120	108,9 \pm 2,5	105,8 \pm 2,6	106,5 \pm 2,7	103,3 \pm 2,5
2560	102,2 \pm 1,4	100,2 \pm 0,5	98,0 \pm 0,6	95,5 \pm 1,7
1280	95,0 \pm 1,2	94,9 \pm 1,1	92,5 \pm 1,0	87,5 \pm 1,0
640	86,5 \pm 1,1	84,5 \pm 0,7	83,4 \pm 1,2	79,4 \pm 1,0
320	67,8 \pm 0,7	66,2 \pm 1,2	61,3 \pm 0,3	61,0 \pm 3,5
160	44,6 \pm 5,4	40,2 \pm 4,6	32,6 \pm 3,6	41,7 \pm 7,0
80	9,9 \pm 8,0	14,0 \pm 5,3	8,3 \pm 5,8	21,7 \pm 8,4
CI_{50} (μ g/mL)	226,1 (162,7-255,6)	231,3 (186,6-244,8)	286,2 (217,0-290,5)	229,6 (191,5-249,7)

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La CI_{50} esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

En cuanto al tiempo solo se observaron diferencias significativas en la concentración de 80 μ g/mL a los tiempos de 15 y 60 y 45 y 60 minutos (Tabla A-9 en el Anexo A), por lo que podemos inferir que la inhibición que ejerce la acarbosa sobre la alfa amilasa no es dependiente del tiempo en la gran mayoría de concentraciones evaluadas.

Figura 3-9 Efecto de acarbosa sobre la actividad enzimática de alfa amilasa.

Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

El coeficiente de correlación (r^2) calculado para la regresión no lineal, fue de 0,9050, 0,9144, 0,9220, 0,9550, para los tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente y aunque no se estableció si hay diferencia significativamente estadística entre los mismos, dado que el coeficiente de correlación es una medida del comportamiento lineal, se puede inferir que el mejor tiempo de incubación es a los 60 minutos, lo cual es contrario a lo usualmente reportado que es 15 minutos. La diferencia probablemente se deba a que en el presente trabajo se dejaba reaccionar durante una hora y se medía la liberación del producto cada 15 minutos, mientras que en estos ensayos la inhibición se detiene por enfriamiento y adición de ácido acético al 50% (Hansawasdi et al., 2000; Gao y Kawabata, 2005; Gao et al., 2008; Ye et al., 2010; Sudha y Kumar, 2012).

Con respecto a la CI_{50} la literatura reporta una CI_{50} sobre la amilasa desde 1,75 μ g/mL (Kim et al., 2005) hasta 14,9 mg/mL (Subramanian et al., 2008), por lo que los valores dados están dentro de las concentraciones usualmente reportada. Se observa que hay una disminución en la CI_{50} con respecto a lo reportado por las alfa glucosidasas, este fenómeno también es reportado por autores que indican CI_{50} menores para amilasa que para alfa glucosidasa (Kim et al., 2005, Wang et al., 2010, Deguchi y Miyasaki, 2010).

Esto se puede explicar debido a que, así como se expresó anteriormente, la alfa glucosidasa de tipo I (de la levadura *S. cerevisiae*) y la de tipo II (a partir las especies de mamíferos), tiene diferencias estructurales. Así mismo la alfa amilasa y la alfa glucosidasa muestran diferentes cinéticas de inhibición, debido a las diferencias estructurales relacionadas con el origen de las enzimas (Chiba, 1997). En la literatura ya se ha reportado que la acarbosa tiene efecto inhibitor significativo sobre glucoamilasa de 90%, sobre sacarasa de 65% y sobre maltasa de 60% (Youn et al., 2004).

3.4 Evaluación del efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* sobre carbohidrasas intestinales

Una vez establecidos los parámetros de concentración de la enzima y del sustrato, y después de haber evaluado el comportamiento de la acarbosa, la última etapa de este trabajo consistió en determinar el posible efecto sobre las enzimas evaluadas, del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) y el comportamiento en una relación concentración-respuesta para así determinar su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) en cada uno de los ensayos implementados.

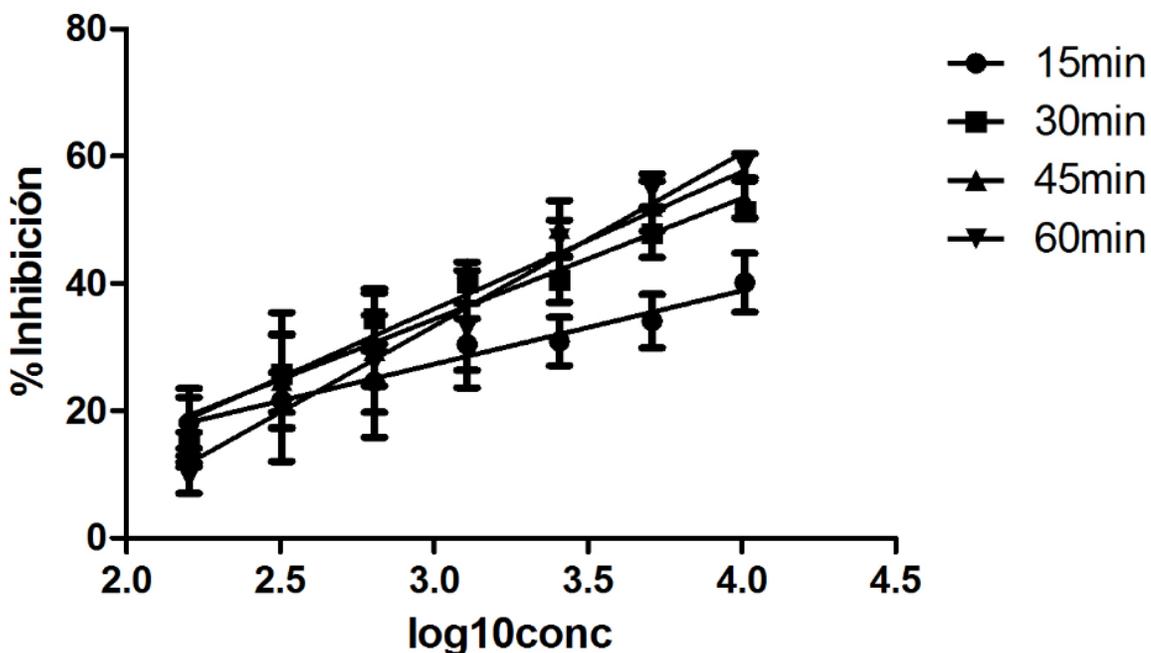
El comportamiento en relación concentración-respuesta del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la alfa glucosidas de *S. cerevisiae* se muestra en la Tabla 3-10 y figura 3-10.

Tabla 3-10 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Extracto <i>Pp</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
10240	40,1 \pm 8,0	51,3 \pm 2,6	53,2 \pm 5,1	58,5 \pm 3,3
5120	34,1 \pm 7,3	47,9 \pm 6,6	52,2 \pm 6,8	54,6 \pm 4,5
2560	30,9 \pm 6,6	40,6 \pm 6,2	48,7 \pm 7,5	47,0 \pm 5,1
1280	30,4 \pm 7,0	40,1 \pm 5,6	42,4 \pm 2,1	32,8 \pm 16,0
640	24,6 \pm 8,3	34,5 \pm 6,9	29,5 \pm 9,7	27,5 \pm 20,2
320	21,7 \pm 7,6	25,8 \pm 10,5	24,7 \pm 12,8	23,7 \pm 20,3
160	18,1 \pm 6,9	14,7 \pm 3,2	17,3 \pm 10,7	9,5 \pm 4,2
CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	92343,8 (27508,0-116888,0)	6645,613 (3091,0-10200,2)	4468,2 (2599,0-7593,0)	4114,7 (2826,0-5990,0)

Physalis peruviana (*Pp*). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La CI_{50} esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

Figura 3-10 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa



Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

No se observaron diferencias significativas en el tiempo a ninguna de las concentraciones evaluadas para la inhibición sobre alfa glucosidasa del extracto de

Physalis peruviana, (Tabla A-10 en el anexo A), por lo que podemos deducir que los resultados solo dependen de la concentración de este.

En este caso los coeficientes de correlación de los tiempos de 30 y 45 minutos que habían demostrado ser mejores en acarbosa dieron un coeficiente de correlación de 0,942 y 0,951 respectivamente, mientras que para 60 minutos existe un coeficiente de correlación de 0,975 por lo que podríamos inferir, aunque no se estipuló si hay diferencia significativamente estadística, que el dato de 60 minutos nos da una mejor relación lineal, también se observa que la desviación estándar de los datos en todos los tiempos es mucho mayor que para los datos reportados en la acarbosa.

La concentración inhibitoria 50 del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, se encuentran entre 4,11 y 92,34 mg/mL mientras que la concentración inhibitoria 50 de otros extractos de plantas medicinales usadas tradicionalmente como hipoglicemiante, se encuentran reportadas desde 1,8µg/mL para el extracto de *Punica granatum* (Li et al., 2005) hasta 17,2mg/mL para el extracto de *Andrographis paniculata* Nees (Subramanian et al., 2008). Sin embargo, la gran mayoría de trabajos reportan valores de CI_{50} menores de 200 µg/mL, (Benalla et al., 2010, Ye et al., 2010), por lo que se puede afirmar que el extracto de frutos de *Physalis peruviana* si ejerce un efecto inhibitorio sobre las alfa glucosidasas moderado ya que su CI_{50} es mayor a 200µg/mL. Es importante resaltar que el tiempo de incubación tiene un efecto significativo sobre la reacción enzimática, ya que en el tiempo de 15 minutos el valor de la CI_{50} es mucho mayor que lo que se calcula para los otros tiempos, dado que este valor es sustancialmente diferente de los otros y que su intervalo de confianza también es alto, se aconseja que el tiempo de incubación sea mayor de 15 minutos para mejores resultados. Con resultados obtenidos es posible sugerir que el extracto necesita al menos 45 minutos de incubación con la alfa glucosidasa para ejercer su efecto inhibitorio con mayor potencia.

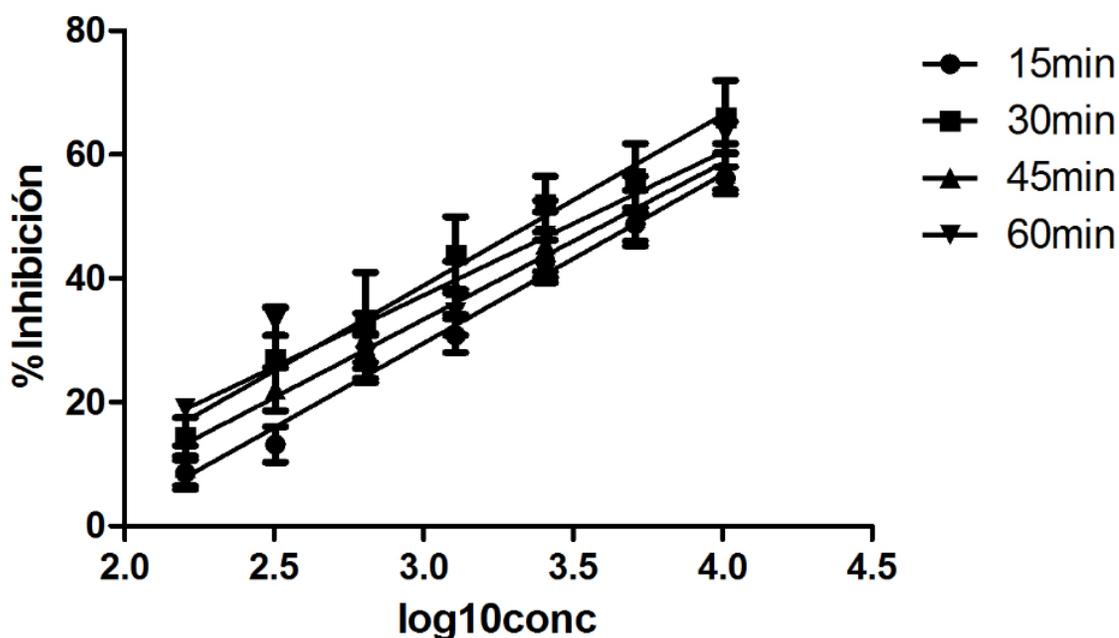
El comportamiento en relación concentración-respuesta del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la alfa glucosidasa extraída de liofilizado de polvo intestinal de rata utilizando como sustrato pNPG se muestra en la Tabla 3-11 y figura 3-11.

Tabla 3-11 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Extracto <i>Pp</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
10240	56,2 \pm 3,2	66,0 \pm 10,2	57,0 \pm 5,8	63,5 \pm 3,1
5120	48,7 \pm 4,7	56,2 \pm 9,6	49,7 \pm 7,8	53,9 \pm 4,5
2560	42,7 \pm 5,9	52,0 \pm 7,8	45,5 \pm 9,2	46,8 \pm 9,9
1280	30,8 \pm 4,7	43,8 \pm 10,7	38,5 \pm 7,4	34,5 \pm 6,4
640	27,0 \pm 6,6	33,2 \pm 13,4	30,4 \pm 6,8	27,5 \pm 6,3
320	13,1 \pm 5,0	27,0 \pm 14,5	22,1 \pm 6,0	33,0 \pm 3,9
160	8,6 \pm 3,6	14,4 \pm 5,4	9,5 \pm 6,1	18,9 \pm 2,3
Cl₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	5639,8 (3817,0-7814,0)	2540,7 (1961,0-3387,0)	4553,2 (2886,0-7256,0)	3552,7 (2176,0-5896,0)

Physalis peruviana (*Pp*). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La Cl₅₀ esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

Figura 3-11 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata



Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

En el análisis de varianza de dos vías seguido de un test de Bonferroni, para la inhibición sobre alfa glucosidasa extraída del polvo intestinal de rata, el extracto de *Physalis*

peruviana a excepción de la concentración de 320µg entre 15 y 60 minutos, no mostró diferencias significativas en el tiempo, (Tabla A-11 en el anexo A), por lo que podemos inferir que la inhibición ejercida por este no depende del tiempo.

Con respecto a la concentración inhibitoria 50 en esta metodología, se observa que hay una disminución con respecto al valor reportado en el anterior ensayo, en el que se utilizó alfa glucosidasa de *S. cerevisiae*, al igual a lo previamente descrito para la acarbosa. Como se había discutido previamente, los valores reportados en la inhibición de las alfa glucosidasas obtenidas de microorganismos no se pueden extrapolar a los valores reportados para enzimas extraídas de intestino de mamíferos. Algunos estudios reportan que la mayoría de los extractos presentan una menor concentración inhibitoria para la alfa glucosidasa de *S. cerevisiae* que para la enzima extraída de intestino de mamíferos, (Babu et al., 2004, Kwon et al. 2008, Shai et al., 2011). Sin embargo, este no es el caso del extracto de *Physalis peruviana*. Es importante resaltar que para que un extracto vegetal pueda inhibir la digestión de los carbohidratos complejos a monosacáridos en el tracto gastrointestinal humano, debe mostrar la inhibición de la enzima extraída del mamífero, no sólo la de la versión microbiana de esta, ya existen discrepancias en los resultados que podrían ser debidas a las diferencias estructurales (Lee y Lee, 2001). En este caso, el extracto se comporta de manera similar a la acarbosa y es probable que componentes del extracto se unan mejor sitio catalítico de las alfa glucosidasas intestinales.

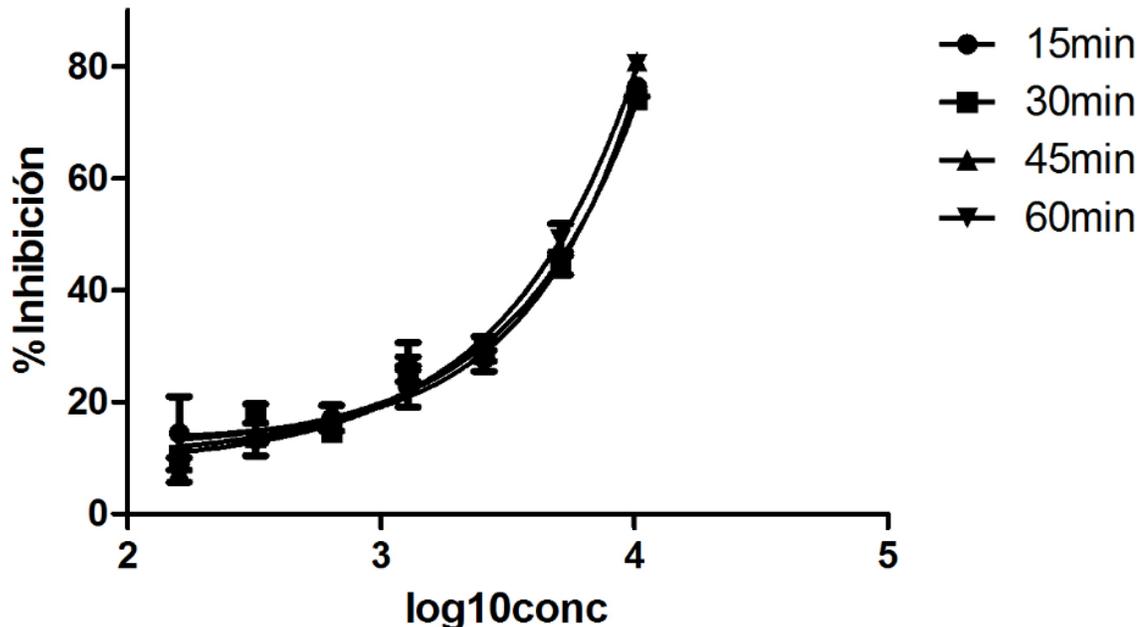
El comportamiento en relación concentración-respuesta del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la alfa glucosidasa extraída de liofilizado de polvo intestinal de rata utilizando como sustrato pNPG se muestra en la Tabla 3-12 y figura 3-12.

Tabla 3-12 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Extracto <i>Pp</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
10240	76,4 \pm 3,1	74,1 \pm 0,8	80,9 \pm 0,5	80,4 \pm 1,6
5120	44,8 \pm 3,6	44,6 \pm 1,8	46,6 \pm 2,8	49,0 \pm 5,0
2560	27,7 \pm 1,9	29,5 \pm 3,7	28,8 \pm 1,9	27,3 \pm 3,2
1280	22,8 \pm 6,4	24,6 \pm 0,4	28,2 \pm 4,2	25,9 \pm 3,9
640	17,1 \pm 4,0	14,6 \pm 2,7	15,9 \pm 0,8	18,4 \pm 1,9
320	13,3 \pm 5,1	18,6 \pm 2,6	13,6 \pm 1,5	16,1 \pm 6,0
160	14,4 \pm 11,4	10,5 \pm 2,4	7,8 \pm 3,8	7,7 \pm 1,3
CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	5335,3 (2782,0-8702,0)	5387,7 (2886,0-8669,0)	4218,0 (2606,0-7147,0)	4191,0 (2530,0-7277,0)

Physalis peruviana (*Pp*). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La CI₅₀ esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%.

Figura 3-12 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata



Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

Para la inhibición sobre maltasa ejercida por el extracto de *Physalis peruviana* en cuanto a la variable del tiempo a excepción de la concentración de 320 μg entre 15 y 60 minutos,

no mostró diferencias significativas en el tiempo, (Tabla A-12 en el anexo A), por lo que podemos deducir que la inhibición ejercida por este no depende del tiempo

En este ensayo en el cual el producto liberado por la acción de la enzima era glucosa, es de mucha importancia la utilización de una muestra blanco, es decir una muestra incubada en las mismas condiciones pero sin la adición de la enzima. La importancia radica en el hecho de que para *Physalis peruviana* se reporta una composición nutricional de 13,1g de carbohidratos (entre ellos glucosa) por cada 100g de pulpa (Fischer et al., 2000), por esta razón es indispensable que para aquellos extractos que reporten glucosa en su composición nutricional, descontar la lectura del blanco para no atribuir a la enzima toda la cantidad de glucosa encontrada.

Los coeficientes de correlación fueron 0,7733, 0,8101, 0,8321 y 0,8235 para los tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente, igualmente se ve que la relación entre respuesta y concentración es mucho menor que la establecida utilizando como sustrato el pNPG, lo cual era de esperarse dado los resultados dados por la acarbosa. Sin embargo, se confirma que el tiempo de incubación que presente un mayor coeficiente de correlación es el de 45 minutos y se propone para evaluar el porcentaje de inhibición

Respecto a los valores de CI_{50} los encontrados en el presente trabajo (4,190 a 5,387 mg/mL) para frutos de *Physalis peruviana* sobre alfa amilasa, son menores a los obtenidos para la inhibición de alfa glucosidasa de *S. cerevisiae* (4,114 a 92,343 mg/mL) y muy parecidos a los reportados por la alfa glucosidasa extraída (2,540 a 5,639 mg/mL). De igual forma que lo descrito con anterioridad, al parecer el extracto se une de manera más selectiva a las enzimas extraídas de intestino de rata que a las de origen bacteriano.

Para la acarbosa se encontró valores de CI_{50} menor sobre maltasa que sobre alfa glucosidasas debido que se une en mayor afinidad que el propio sustrato (Mertes, 1998). En el caso del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* no se observa este comportamiento lo que sugiere que el extracto se une de manera menos selectiva que la maltosa, esto puede deberse a que la acarbosa es un compuesto puro, mientras que el extracto tiene una gran cantidad de compuestos que pueden unirse a diversas proteínas incluidas en la solución de la enzima cruda, haciendo que su unión sea menos

específica. Este fenómeno también se ha reportado para otros extractos como el de *Stichopus japonicus* (Nguyen y Kim, 2009).

La literatura reporta que las alfa-glucosidasas I (derivadas de bacterias, insectos o levaduras), muestran mayor actividad hacia sustratos heterogéneos tales como sacarosa y pNPG, y poca o ninguna actividad hacia sustratos homogéneos tales como maltooligosacáridos, lo que implica que las alfa glucosidasas I reconoce la "estructura glicosil" en el sustrato (Nguyen y Kim, 2009). En cambio las enzimas derivadas de mamíferos, llamadas alfa glucosidasas II, hidrolizan sustratos homogéneos más rápidamente que los heterogéneos, lo que indica que esta clase de alfa glucosidasas reconoce la "maltoestructura" (Kimura et al., 2004). Se encuentra que la hidrólisis de p-nitrofenol-2-desoxi-D-arabino-hexopiranosido (derivado del pNPG) fue catalizada por la alfa glucosidasa II (Nishio et al., 2002), pero no se observa tal reacción con la alfa glucosidasa I, lo que sugiere que los grupos hidroxilo en la posición 2 de la glucosa son esenciales para la hidrólisis de la alfa glucosidasa I (Kimura et al., 2004). La alfa-glucosidasa II cataliza la hidratación de D-glucal para producir 2-desoxi-D-arabino-hexosa, pero alfa glucosidasa I no muestra ningún producto hidrolizado (Chiba et al., 1988).

La concentración inhibitoria 50 de las alfa glucosidasas depende en gran medida de las condiciones de los ensayos. En primer lugar tenemos el tiempo de incubación, el cual se propone de 45 minutos para todos los ensayos (alfa glucosidasa de *S. cerevisiae*, alfa glucosidasa extraída de polvo intestinal de rata y maltasa extraída de polvo intestinal de rata). Con respecto a esta variable, para la gran mayoría de ensayos el porcentaje de inhibición aumenta conforme aumenta el tiempo de incubación, lo cual se traduce en una menor concentración inhibitoria 50. De acuerdo a lo reportado por Li, podemos inferir que la inhibición ejercida aumentó progresivamente por la incubación del inhibidor con la enzima ya que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio, en un mecanismo de reacción bimolecular, de unión varía con la concentración de enzima, la inhibición parece reflejar un modo lento de unión (Li et al., 2005). Las gráficas de CI_{50} a partir de los experimentos con diferentes tiempos de incubación podría sugerirse que el extracto debe ser consumido antes de las comidas; estrategia acorde a lo recomendado para la acarbose la cual deberá administrarse antes o en el primer bocado de las comidas (Mertes, 1998). Estudios clínicos de tipo experimental prospectivo realizado en Perú en

los cuales se espera un tiempo de 40 minutos después de la ingesta de la *Physalis peruviana* para la sobrecarga de glucosa, los niveles de glucosa posprandial se reducen significativamente después de 90 y 120 minutos (Rodríguez y Rodríguez, 2007)

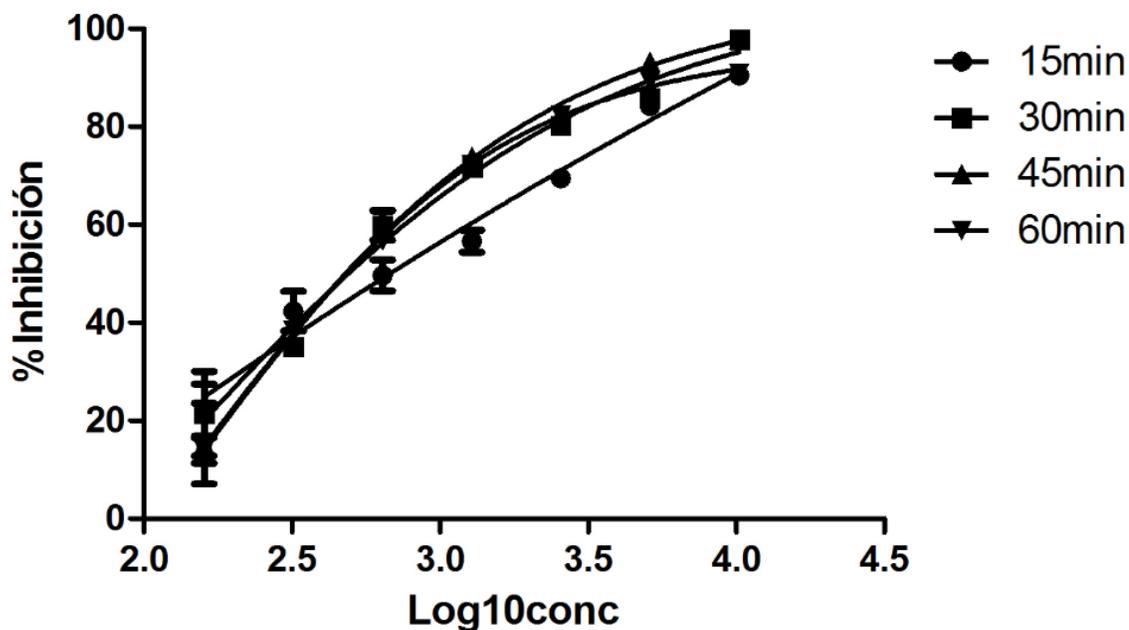
El comportamiento en relación concentración-respuesta del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la amilasa porcina pancreática utilizando como sustrato almidón azul se muestra en la Tabla 3-13 y figura 3-13.

Tabla 3-13 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de alfa amilasa

Tiempo de incubación	15 min	30 min	45 min	60 min
Extracto <i>Pp</i> (µg/mL)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
10240	90,5±0,5	97,8±1,6	97,8±1,4	90,9±0,4
5120	84,2±1,1	85,8±1,4	93,2±1,1	89,2±2,4
2560	69,5±3,0	80,2±0,8	82,4±1,1	82,3±0,6
1280	56,6±3,9	71,8±1,9	73,9±1,7	72,2±0,8
640	49,6±5,5	59,8±5,1	59,9±5,3	56,8±3,3
320	42,3±7,0	35,1±1,4	36,1±1,0	38,4±3,0
160	22,1±9,2	21,4±15,0	15,3±14,3	13,9±4,5
CI₅₀ (µg/mL)	715,3 (514,5-919,7)	572,6 (429,4-659,9)	584,8 (449,4-623,3)	619,9 (442,2-704,0)

Physalis peruviana (*Pp*). Los resultados se expresan como la media ± S.D (n=3). La CI₅₀ esta expresada como la media y sus límites de confianza del 95%

Figura 3-13 Efecto del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (*Pp*) sobre la actividad enzimática de alfa amilasa



Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M (n=3)

En cuanto a la variable tiempo, el análisis de varianza de dos vías seguido del test de Bonferroni, mostró diferencias significativamente estadísticas para las concentraciones de 2560 y 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre los tiempos de 15 y 30, 15 y 45 y 15 y 60 minutos, (Tabla A-13 en el anexo A), por lo que podemos decir que el tiempo no afecta los resultados obtenidos en la inhibición del extracto de *Physalis peruviana* sobre alfa amilasa, en la mayoría de concentraciones evaluadas.

Los coeficientes de correlación son 0,9814, 0,9552, 0,9443, 0,9204 para los tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente, dado que para el ensayo de inhibición de alfa amilasa con acarbosa se había observado un coeficiente de correlación de 0,9550 en el tiempo de 60 minutos, aunque para el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* este sea el menor coeficiente de correlación, para posteriores ensayos como cada muestra se comporta diferente se propone que se siga manteniendo 60 minutos como tiempo de incubación.

Con respecto a la concentración inhibitoria 50, se observa que el valor es mucho menor de lo encontrado por las alfa glucosidasas, por lo que podríamos afirmar que el extracto

de *Physalis peruviana* produce una débil inhibición sobre las alfa glucosidasas en comparación con la alfa amilasa, presentando un comportamiento similar al obtenido para acarbosa.

Sin embargo, es de destacar que previamente se había reportada el efecto hipoglicemiante del extracto en una Tesis de Maestría realizada previamente en el grupo de investigación, donde se utilizaron ratones suizos ICR con una sobrecarga oral de almidón (Medina, 2012). De este modo, los resultados *in vitro* obtenidos están acorde con lo encontrado *in vivo*.

Un aspecto negativo de los inhibidores de las enzimas intestinales como la acarbosa es que se presenta con frecuencia trastornos del tracto digestivo tales como distensión abdominal, flatulencia y meteorismo y diarrea (Jo et al., 2011). Estos efectos adversos se asocian a la fuerte actividad inhibitoria sobre alfa amilasa debido a la no digestión del almidón (Bischoff, 1994, Wongsu et al., 2012). Es así como un extracto que presente una menor inhibición sobre alfa amilasa se consideran que podrían minimizar o no presentar estos efectos adversos (Bischoff, 1994; Kwon et al., 2008).

3.5 Cinética de inhibición del extracto de *Physalis peruviana* sobre carbohidrasas intestinales

Para el cálculo de estos parámetros cinéticos se varió la concentración del sustrato utilizando concentraciones de 16,9mM, 11,3mM, 7,5mM, 5mM, 3,3mM y 2,2mM, mientras que la concentración del extracto se mantuvo constante a 5120µg/mL. Primero se tenían los datos de absorbancia en función del tiempo en presencia y ausencia del extracto de *Physalis peruviana*, tal como lo muestran las tablas 3-14 a 3-19.

Tabla 3-14 Absorbancia de p-nitrofenol de en función del tiempo en ausencia del extracto de *Physalis peruviana* (Pp)

pNPG (mM)	16,875	11,250	7,500	5,000	3,333	2,222
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
5	0,056± 0,022	0,051± 0,017	0,055± 0,028	0,045± 0,032	0,054± 0,035	0,048± 0,024
10	0,102± 0,015	0,106± 0,006	0,084± 0,005	0,083± 0,007	0,072± 0,018	0,061± 0,018
15	0,160± 0,020	0,138± 0,043	0,137± 0,039	0,129± 0,036	0,107± 0,043	0,110± 0,044
20	0,222± 0,020	0,198± 0,056	0,188± 0,048	0,183± 0,043	0,152± 0,065	0,149± 0,054

Donde p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido (pNPG). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La pendiente de estos resultados se toma como la velocidad de reacción y se expresa en función de la concentración del sustrato en la tabla 3-20.

Tabla 3-15 Absorbancia de p-nitrofenol de en función del tiempo en presencia del extracto de *Physalis peruviana* (Pp)

pNPG (mM)	16,875	11,250	7,500	5,000	3,333	2,222
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
5	0,055± 0,008	0,050± 0,003	0,046± 0,007	0,042± 0,014	0,033± 0,011	0,030± 0,011
10	0,069± 0,013	0,070± 0,014	0,064± 0,005	0,056± 0,004	0,061± 0,007	0,056± 0,014
15	0,095± 0,017	0,099± 0,012	0,091± 0,010	0,075± 0,013	0,073± 0,019	0,068± 0,015
20	0,131± 0,005	0,140± 0,003	0,122± 0,010	0,102± 0,005	0,098± 0,008	0,071± 0,033

Donde p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido (pNPG). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La pendiente de estos resultados se toma como la velocidad de reacción y se expresa en función de la concentración del sustrato en la tabla 3-20

Teniendo en cuenta que para la medición de glucosa como producto, utilizamos el ensayo de glucosa Oxidasa- Peroxidasa y se mide la absorbancia de la quinoneimina a 540nm se obtienen los datos de las tablas 3-16 y 3-17.

Tabla 3-16 Absorbancia de quinoneimina en función del tiempo en ausencia del extracto de *Pp*

Maltosa (mM)	16,875	11,250	7,500	5,000	3,333	2,222
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
5	0,190± 0,004	0,178± 0,005	0,163± 0,015	0,147± 0,007	0,137± 0,005	0,132± 0,009
10	0,213± 0,004	0,198± 0,011	0,178± 0,029	0,157± 0,012	0,145± 0,007	0,138± 0,023
15	0,228± 0,018	0,210± 0,013	0,189± 0,035	0,164± 0,018	0,150± 0,013	0,142± 0,030
20	0,347± 0,016	0,313± 0,012	0,286± 0,080	0,277± 0,008	0,247± 0,015	0,239± 0,025

Donde *Physalis peruviana* (*Pp*). Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La pendiente de estos resultados se toma como la velocidad de reacción y se expresa en función de la concentración del sustrato en la tabla 3-20

Tabla 3-17 Absorbancia de quinoneimina en función del tiempo en presencia del extracto de *Physalis peruviana* (*Pp*)

Maltosa (mM)	16,875	11,250	7,500	5,000	3,333	2,222
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
5	0,256± 0,020	0,239± 0,014	0,229± 0,058	0,224± 0,007	0,216± 0,012	0,209± 0,006
10	0,293± 0,019	0,272± 0,009	0,257± 0,075	0,250± 0,007	0,233± 0,013	0,226± 0,015
15	0,312± 0,017	0,287± 0,011	0,267± 0,076	0,259± 0,006	0,238± 0,014	0,231± 0,018
20	0,332± 0,016	0,302± 0,012	0,279± 0,079	0,270± 0,007	0,243± 0,014	0,235± 0,022

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La pendiente de estos resultados se toma como la velocidad de reacción y se expresa en función de la concentración del sustrato en la tabla 3-20

Para el ensayo del almidón azul mediamos la absorbancia del producto coloreado soluble a 595nm, tal como se muestra en las tablas 3-18 y 3-19.

Tabla 3-18 Absorbancia del producto de hidrólisis del almidón azul en función del tiempo en ausencia del extracto de *Physalis peruviana* (Pp)

Almidón Azul (mg/mL)	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
5	0,233 ±0,026	0,107 ±0,039	0,104 ±0,020	0,167 ±0,027	0,146 ±0,027
10	0,263 ±0,011	0,147 ±0,016	0,119 ±0,015	0,194 ±0,024	0,172 ±0,013
15	0,313 ±0,009	0,178 ±0,010	0,165 ±0,014	0,231 ±0,030	0,192 ±0,011
20	0,354 ±0,042	0,221 ±0,009	0,209 ±0,014	0,254 ±0,016	0,233 ±0,012

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La pendiente de estos resultados se toma como la velocidad de reacción y se expresa en función de la concentración del sustrato en la tabla 3-20.

Tabla 3-19 Absorbancia del producto de hidrólisis del almidón azul en función del tiempo en presencia del extracto de *Physalis peruviana* (Pp)

Almidón Azul (mg/mL)	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
5	0,133 ±0,011	0,144 ±0,021	0,025 ±0,029	0,107 ±0,016	0,111 ±0,004
10	0,161 ±0,007	0,151 ±0,007	0,011 ±0,027	0,118 ±0,005	0,121 ±0,007
15	0,173 ±0,019	0,156 ±0,035	0,047 ±0,013	0,144 ±0,014	0,147 ±0,020
20	0,198 ±0,008	0,195 ±0,019	0,063 ±0,012	0,148 ±0,004	0,148 ±0,011

Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3). La pendiente de estos resultados se toma como la velocidad de reacción y se expresa en función de la concentración del sustrato en la tabla 3-20

Se determinó la pendiente de los datos de absorbancia en función del tiempo. Las unidades de estas pendientes son en Absorbancia sobre tiempo y estarán en mM ó mg por unidad de tiempo, este valor es por definición la actividad enzimática. La tabla 3-20 muestra el valor estas pendientes en función de la concentración de la concentración de sustrato.

Tabla 3-20 Velocidad de reacción en función de la concentración del sustrato en presencia y ausencia del extracto de *Physalis peruviana* (*Pp*)

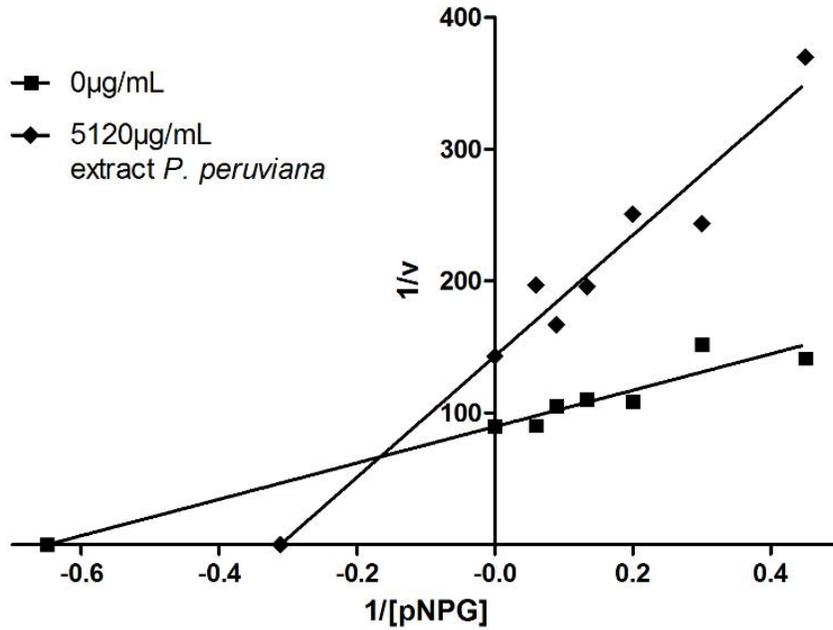
pNPG ó Maltosa mM	Velocidad de reacción de alfa glucosidasa(mM/min)		Velocidad de reacción de Maltasa (mM/min)		Almidón azul mg/mL	Velocidad de reacción Alfa amilasa (mg/min)	
	Ausencia del extracto de <i>Pp</i>	Presencia del extracto de <i>Pp</i>	Ausencia del extracto de <i>Pp</i>	Presencia del extracto de <i>Pp</i>		Ausencia del extracto de <i>Pp</i>	Presencia del extracto de <i>Pp</i>
16,88	0,0111	0,0051	0,0097	0,0050	20,00	0,0082	0,0041
11,25	0,0095	0,0060	0,0084	0,0040	10,00	0,0074	0,0032
7,50	0,0091	0,0051	0,0076	0,0032	5,00	0,0072	0,0030
5,00	0,0092	0,0040	0,0079	0,0029	2,50	0,0060	0,0030
3,33	0,0066	0,0041	0,0067	0,0017	1,25	0,0057	0,0027
2,22	0,0071	0,0027	0,0065	0,0017			

Luego se tabuló el inverso de la la velocidad de reacción en función del inverso de la concentración de sustrato y se calculo mediante una regresión lineal el intercepto tanto en el eje Y como en el X, lo cual se muestra en la tabla 3-21.

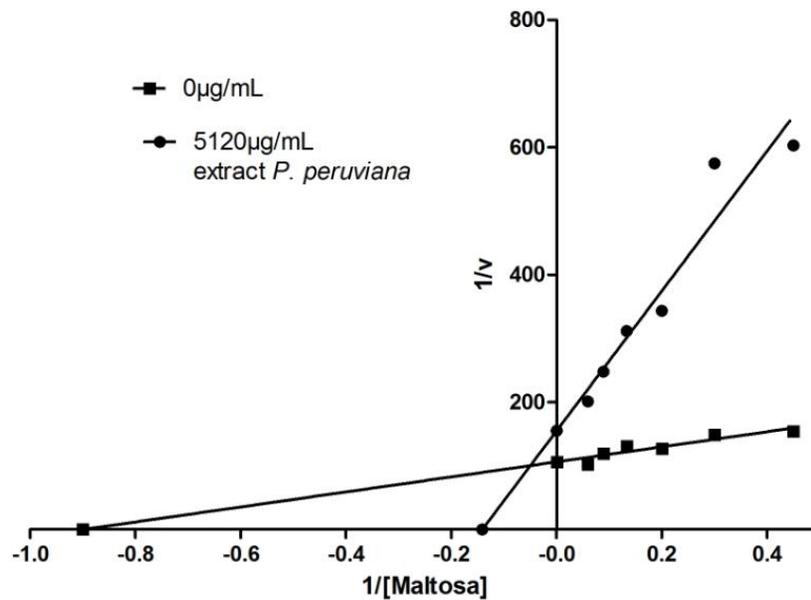
Tabla 3-21 Inverso de la velocidad de reacción en función del inverso de la concentración del sustrato en presencia y ausencia del extracto de *Physalis peruviana* (*Pp*)

Inverso de la concentración de pNPG ó Maltosa mM	Inverso de la velocidad de reacción de alfa glucosidasa (mM/min)		Inverso de la velocidad de reacción de Maltasa (mM/min)		Inverso de la concentración de Almidón azul mg/mL	Inverso de la velocidad de reacción Alfa amilasa (mg/min)	
	Ausencia del extracto de <i>Pp</i>	Presencia del extracto de <i>Pp</i>	Ausencia del extracto de <i>Pp</i>	Presencia del extracto de <i>Pp</i>		Ausencia del extracto de <i>Pp</i>	Presencia del extracto de <i>Pp</i>
0,059	90,090	196,078	103,093	200,000	0,050	121,951	243,902
0,089	105,263	166,667	119,048	250,000	0,100	135,135	312,500
0,133	109,890	196,078	131,579	312,500	0,200	138,889	333,333
0,200	108,696	250,000	126,582	344,828	0,400	166,667	333,333
0,300	151,515	243,902	149,254	588,235	0,800	175,439	370,370
0,450	140,845	370,370	153,846	588,235	-	-	-
Intercepto en X	-0,650	-0,312	-0,9006	-0,1411	Intercepto en X	-1,756	-2,432
Intercepto en Y	89.620	143.100	106.3	155.0	Intercepto en Y	125.600	281.400

Se grafica el inverso de la velocidad de la reacción enzimática como función del inverso de la concentración de sustrato, en presencia y ausencia de 5120 μ g del extracto de *Physalis peruviana*, como muestran las figuras 3-14, 3-15, 3-16.

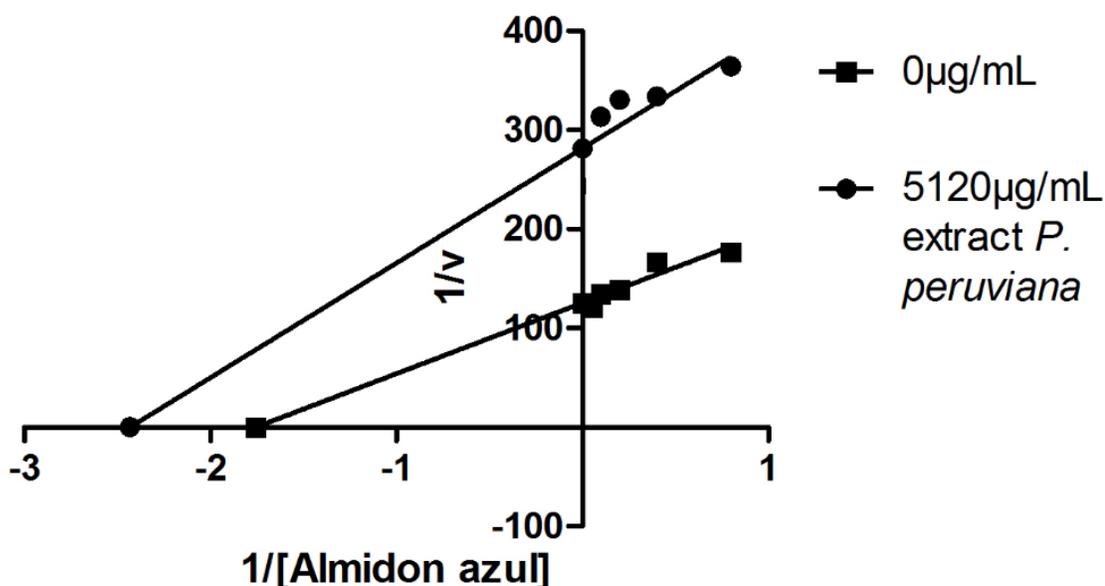
Figura 3-14 Inverso de la velocidad de reacción de alfa glucosidasa en presencia y ausencia del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (Pp)

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido)

Figura 3-15 Inverso de la velocidad de reacción de maltasa en presencia y ausencia del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (Pp)

V; velocidad de la reacción

Figura 3-16 Inverso de la velocidad de reacción de alfa amilasa en presencia y ausencia del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (Pp)



V; velocidad de la reacción.

De acuerdo al modelo lineal de Lineweaver-Burk, el intercepto en el eje Y de las graficas nos proporciona el inverso de V_{max} y el intercepto en el eje X el inverso de K_m (Murray et al., 2004), los cuales se determinan para poder establecer cuál tipo de inhibición (competitiva, no competitiva o acompetitiva) se ajusta más. Los parametros calculados se muestran en la tabla 3-22.

Tabla 3-22 Parámetros cinéticos de la inhibición del extracto de *Physalis peruviana* (Pp) sobre las diferentes enzimas

Parámetro cinético	Alfa glucosidasa		Maltasa		Alfa amilasa	
	Ausencia del extracto de Pp	Presencia del extracto de Pp	Ausencia del extracto de Pp	Presencia del extracto de Pp	Ausencia del extracto de Pp	Presencia del extracto de Pp
V_{max} (mM/min)	1,538	3,205	1,110	7,087	0,569	0,411
K_m	0,011	0,007	0,009	0,006	0,008	0,004
K_m / V_{max}	137,877	458,654	118,032	1098,512	71,526	115,707
Tipo de inhibición	Competitiva		Competitiva		No Competitiva	

V_{max} ; Velocidad Máxima, K_m ; constante cinética.

La tabla 3-22 así como la figura 3-14 y figura 3-15 muestran que el extracto de *Physalis peruviana* tiene un comportamiento de tipo competitivo sobre la inhibición de maltasa y alfa glucosidasa, donde el incremento de la concentración del sustrato reduce el efecto inhibitor. Este hecho es concordante con los resultados obtenidos en la inhibición, dado que se comportaba de manera muy similar a la acarbosa, la cual tiene una inhibición de tipo competitivo sobre estas enzimas. Sin embargo, por lo general se prefiere un comportamiento no competitivo porque la presencia o no del sustrato no afectaría la unión del inhibidor a la enzima, lo que se traduce en una menor interacción con las comidas. (Kim et al 2005., Mayur et al., 2010, Shihabudeen et al., 2011).

En la alfa amilasa se observa por el contrario un comportamiento no competitivo (Tabla 3-21 y figura 3-16). El hecho de que el extracto haya presentado una cinética de inhibición diferente sobre alfa amilasa y alfa glucosidasa puede ser debido a las diferencias estructurales relacionadas con los orígenes de las enzimas (Chiba, 1997). Otra de las razones por las cuales el extracto de *Physalis peruviana* presenta una combinación de inhibición competitiva y no competitiva puede ser debido a que el extracto presenta más de un componente inhibitor. Dicho de otra manera, no podemos descartar la posibilidad de que un inhibidor que se adhiere a una amplia sobre las regiones de alfa glucosidasa y otro se una a la región de alfa amilasa, lo cual es factible debido a la presencia tanto de polifenoles como de flavonoides.

El comportamiento cinético del extracto de *Physalis peruviana* sobre alfa amilasa mostró una característica no competitiva, lo que indica que se une a un sitio distinto del sitio activo de la enzima e inhibe tanto enzima libre como la enzima ligada al sustrato. Las razones de porque el extracto muestra una inhibición menor que la acarbosa probablemente se deba a que los extractos crudos contienen componentes no activos, junto con los activos, por lo tanto, si se logra aislar el (los) compuesto(s) activo (s) a partir de esta planta ayudará a identificar el (los) inhibidor(es) potente(s) de la hidrólisis de las carbohidrasas. Como se ha mencionado con anterioridad la inhibición sobre alfa amilasa por diferentes clases de compuestos fenólicos (Shim et al., 2003; Kim et al., 2005; Tadera et al., 2006) como de algunos flavonoides (Tadera et al., 2006) se describe en la literatura.

Con respecto a los resultados obtenidos por el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, se ha estudiado ampliamente que las complicaciones vasculares inducidas por hiperglicemia con la disfunción oxidativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) producida por cadena transportadora de electrones mitocondrial (Kawamura et al., 1994; Brownlee, 2005). Esta disfunción de los ROS está vinculada con la elevación los niveles de glucosa y por tanto con complicaciones vasculares inducidas por la hiperglicemia (Kawamura et al., 1994).

Los compuestos fenólicos que se caracterizan en su mayoría por tener una actividad antioxidante, también desempeñan un papel importante en la inhibición de la alfa glucosidasa y alfa amilasa (Mai y Chuyen, 2007; Jo et al., 2011; Shankar y Dnyaneshwar, 2013). Un estudio reciente indica que un extracto enriquecido en polifenoles de *Centratherum anthelminticum* (L.) que contiene una mezcla de compuestos fenólicos y flavonoides tales como ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido ferúlico, quercetina y caempferol mostraron una inhibición significativa de glucosidasa intestinal *in vitro* y también redujo posprandial hiperglicemia en ratas (Ani y Naidu, 2008). Estos hallazgos también han sido observados para compuestos polifenólicos como ácido cafeico y ácido p-cumarínico (Wongsa et al., 2012).

Compuestos flavonoides como quercetina y sus derivados como isoquercetina, rutina, miricetina, están inversamente asociados a los riesgos de la diabetes tipo 2 (Griffiths et al., 2002) y han demostrado actividad inhibitoria sobre alfa glucosidasa (Rigelsky y Sweet, 2002). Específicamente los flavonoles con una hidroxilación en el carbono 3 del anillo C, aumentan o favorecen la actividad inhibitoria (Tadera et al., 2006). Sin embargo, también se reporta que flavonoides como quercetina, luteolina, apigenina, y sus glucósidos correspondientes diferentes tipos de flavonoides, están presentes en un grupo importante de drogas naturales contra la diabetes de tipo 2 justificando una mayor investigación la actividad inhibitoria sobre alfa glucosidasa de flavonoles y de sus respectivas agliconas (Shin et al., 1995; Jo et al., 2009).

Teniendo en cuenta que la acción hipoglicemiantes de los extractos se ha asociado con frecuencia a la acción antioxidante de los mismos, muchos autores reportan que existe una fuerte correlación entre los antioxidantes y los inhibidores de tanto alfa glucosidasas como alfa amilasa. En lo reportado por Kwon la actividad inhibitoria tanto de la alfa

glucosidasa microbiana como la de la extraída de mamífero son proporcionales a la actividad antioxidante (evaluada por la reducción del radical DPPH) (Kwon et al., 2008, Galvez et al., 2010). Esta proporcionalidad se hace más evidente en extractos que ha reportado inhibición de la alfa amilasa (McCue et al., 2005; Kwon et al., 2008). McCue también reporta una relación entre la inhibición de alfa amilasa y la inhibición de la ECA, probablemente la presencia de fenoles o sinergismo entre fenoles y proteínas están involucrados en el mecanismo de inhibición enzimática (McCue et al., 2005).

De este modo, la presencia de compuestos fenólicos ó flavonoides pueden relacionarse con la inhibición de alfa glucosidasas y alfa amilasa (Oboh et al., 2012) y plantas cuyos estudios fitoquímicos reporten la presencia de estos metabolitos secundarios o cuyos estudios biológicos hayan demostrado actividad antioxidante (usualmente por disminución del radical DPPH) pueden llegar a ser promisorias en la inhibición de alfa glucosidasas o amilasa. Dado que los frutos de *Physalis peruviana* tienen presencia tanto de fenoles como flavonoides (Cerón et al., 2010), se ha demostrado su actividad antioxidante e hipoglicemiante de los extractos de los frutos en un modelo experimental de diabetes inducida con estreptozotocina (Mora, 2008, Wu et al., 2005), se ha reportado la presencia de polifenoles con capacidad antioxidante (Cerón et al., 2010, Licodiedoff et al., 2013), y presencia de flavonoides como quercetina y campferol y flavonoles y su capacidad antioxidante (Wu et al., 2006, Arun y Asha, 2007) es un extracto promisorio para la inhibición de alfa glucosidasas y alfa amilasa. Por esta razón, se evaluó la actividad inhibitoria del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* sobre estas carbohidrasas intestinales, obteniendo como resultado una moderada inhibición sobre las alfa glucosidasas y alta inhibición sobre las alfa amilasa lo cual está de acuerdo a lo reportado en la literatura en relación con su rica composición en polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante.

En un estudio que se hizo sobre frutos nativos peruanos, el extracto acuoso de *Physalis peruviana* reporta menor contenido de fenoles con respecto a otras frutas nativas peruanas tales como Lucuma (*Pouteria lucuma*), Pacae (*Inga feuille*), Papayita arequipeña (*Carica pubescens*), Capuli (*Prunus capuli*), Aguaymanto y Algarrobo (*Prosopis pallida*) aunque fue el que presentó la mayor capacidad antioxidante, lo que

indica que no siempre hay relación entre la capacidad antioxidante y la cantidad de polifenoles. Así mismo, este extracto produjo una inhibición menor del 50% a 50mg/mL sobre alfa glucosidasas lo que fue mucho menor a lo inhibido por las otras especies. No hubo diferencia en el extracto etanólico al 12% y el porcentaje de inhibición fue menor sobre alfa amilasa. Así mismo también se encuentra una inhibición sobre ECA menor que el de las otras especies. El estudio también reporta que no siempre se encuentra relación entre la actividad antioxidante y la actividad inhibitoria de alfa glucosidasas (Pinto et al., 2009).

La diferencia con los resultados reportados en el presente trabajo radican en primer lugar en las condiciones del ensayo de inhibición de alfa glucosidasa, dado que Pinto reporta utilizar 1,0 UI de enzima, 5mM de pNPG y 5 minutos de incubación y no se evaluó sobre la enzima extraída de polvo intestinal, ni maltasa, la cual es fundamental en la evaluación de los extractos.

El tipo de extracto evaluado en el trabajo de Pinto también es diferente al empleado en el presente trabajo por lo que los compuestos extraídos pueden variar. Pinto y col., tomaron 5 g de frutos y se extrajeron en 100mL de etanol al 12% toda la noche a 55°C (Pinto et al., 2009). En el extracto empleado en esta Tesis, pesaron 400 g de frutos y se humectaron con 300mL de etanol al 96%, el material humectado se colocó en el percolador de 2L y posteriormente se adicionó 1500mL de etanol al 96%. Después de 24 horas se procedió a abrir la llave del percolador, con una velocidad de goteo medio (aproximadamente 150 gotas por minuto). Una vez recolectado el extracto se concentró el extracto en el rotavapor. El proceso de extracción se realizó por 4 días (4 pasadas de solvente) para un total de etanol al 96% de 6L (relación droga:solvente 1:15). Para obtener el extracto seco este se concentró en rotavapor hasta evaporar la mayoría del etanol y se terminó la concentración en baño maría hasta obtener un extracto con una humedad entre el 3% y el 5% (Bernal, 2012).

La metodología utilizada para medir la inhibición de alfa amilasa también fue diferente, ya que ellos utilizan la propuesta por el manual enzimático Worthington, mientras que en el presente se utilizó la utilización del sustrato almidón azul. Ha sido comprobado que otros ensayos pueden inducir a valores errados debido a la presencia de beta amilasas (en especial en la gran mayoría de plantas) que interfieren en los resultados, el ensayo de

azul de almidón fue el único método satisfactorio para todos los tejidos dado que la beta-amilasa libera sin color (Douglas y Duke, 1983).

Dado que como se ha visto las condiciones de los ensayos son muy importantes para el reporte de los resultados obtenidos por lo que se proponen los protocolos presentados en los Anexos B-E, para futuras evaluaciones de inhibición sobre carbohidrasas intestinales.

4 Conclusiones

Se implementaron en nuestros laboratorios de investigación, cuatro ensayos que permiten la evaluación *in vitro* de extractos con posible actividad inhibitoria de alfa glucosidasas de tipo I y II, maltasa y alfa amilasa.

El extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* tiene diferencias en la selectividad inhibitoria de la enzima *in vitro* y por tanto diferentes respuestas a las alfa glucosidasas microbiana (tipo I) y la extraída de polvo intestinal de rata (tipo II).

El extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* muestra una inhibición de tipo competitivo sobre las alfa glucosidasas y tipo no competitivo sobre la alfa amilasa.

Se propone la inhibición de carbohidrasas intestinales como uno de los modos de acción mediante el cual los frutos de *Physalis peruviana* han mostrado actividad hipoglicemiente y antidiabética.

Se contribuyó al estudio farmacológico de los frutos de *Physalis peruviana* y a la validación de su uso tradicional.

5 Recomendaciones

Profundizar en el estudio fitoquímico de los frutos de *Physalis peruviana* y establecer cual(es) componente(s) es el responsable de la actividad inhibitoria de carbohidrasas intestinales observadas en el presente trabajo.

Evaluar para el extracto de *Physalis peruviana* la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, dado que está directamente relacionada tanto con las complicaciones de la diabetes como con la actividad antioxidante.

Utilizar como patrón un extracto que haya demostrado inhibición sobre carbohidrasas intestinales ya que se podría comparar mejor el comportamiento que con un inhibidor puro tipo acarbossa.

A. Anexo: Resultados del análisis de varianza de dos vías seguido del test de Boferroni

Tabla A-1. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de pNPG sobre la actividad de alfa glucosidasa a 0,1 UI/mL

min mM	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
11,3	ns	**	***	ns	***	ns
7,5	ns	*	***	ns	***	**
5	ns	***	***	ns	ns	ns
3,3	ns	*	***	ns	***	ns
2,2	ns	ns	**	ns	**	ns

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

Tabla A-2. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de pNPG sobre la actividad de alfa glucosidasa a 1,0 UI/mL

min mM	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
11,3	***	***	***	ns	***	***
7,5	**	***	***	ns	**	ns
5	ns	***	ns	ns	ns	ns
3,3	***	**	***	ns	ns	ns
2,2	ns	ns	ns	ns	ns	ns

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

Tabla A-3. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de pNPG sobre la actividad de alfa glucosidasa a 10,0 UI/mL

min mM	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
11,3	*	***	**	ns	ns	ns
7,5	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
5	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
3,3	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
2,2	Ns	ns	ns	ns	ns	ns

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido). ns no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Tabla A-4. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la alfa glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

min $\mu\text{g/mL}$	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	***	ns	ns	ns
320	ns	ns	**	ns	ns	ns
160	ns	ns	*	ns	*	ns
80	ns	ns	**	ns	ns	ns

ns no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Tabla A-5. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la alfa glucosidasa extraída de polvo intestinal de rata.

min $\mu\text{g/mL}$	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
5120	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	ns	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns
80	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Tabla A-6. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de maltosa sobre la actividad de maltasa a 1,0 UI/mL

min mM	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
16,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
11,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2,2	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

Tabla A-7. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la maltasa.

min µg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	ns	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns
80	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

Tabla A-8. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de almidón azul sobre la actividad de alfa amilasa a 2,0 UI/mL

min mg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
20	ns	ns	ns	ns	ns	ns
10	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1,25	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

Tabla A-9. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración de acarbosa sobre la alfa amilasa.

Min µg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
10240	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	ns	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Tabla A-10. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de *Pp* sobre la alfa glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

min µg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
10240	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	ns	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Physalis peruviana (*Pp*). ns no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Tabla A-11. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de *Pp* sobre la alfa glucosidasa extraída de polvo intestinal de rata

min µg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
10240	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	*	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Physalis peruviana (*Pp*). ns no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Tabla A-12. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de *Pp* sobre la maltasa.

min μg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
10240	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1280	ns	ns	ns	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	ns	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Physalis peruviana (*Pp*). ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

Tabla A-13. Evaluación estadística de la influencia del tiempo de incubación y la concentración del extracto de *Pp* sobre la alfa amilasa.

min μg/mL	15-30	15-45	15-60	30-45	30-60	45-60
10240	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5120	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2560	ns	*	*	ns	ns	ns
1280	**	***	**	ns	ns	ns
640	ns	ns	ns	ns	ns	ns
320	ns	ns	ns	ns	ns	ns
160	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Physalis peruviana (*Pp*). ns no significativo, * p<0,05; ** p<0,01 y *** p< 0,001

B. Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de alfa glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Buffer: Pesar 3,402g de fosfato monobásico de potasio y se disolver en 25mL de agua destilada para formar una solución de fosfato monobásico de potasio 1M. Por aparte pesar 4,355g de fosfato dibásico de potasio y disolver en 25mL de agua destilada para formar una solución de fosfato dibásico 1M. Utilizar 12,2mL de fosfato dibásico de potasio 1M y 12,8mL de fosfato monobásico de potasio 1M, mezclar y diluir a 50mL. Se obtiene un buffer de fosfatos 0,5M que contiene 0,244M de fosfato dibásico de potasio y 0,256M de fosfato monobásico de potasio con un pH 6,5-6,8 (Pistia y Hollingsworth, 2001).

Enzima: Pesar 16,95mg del alfa glucosidasa Sigma-G5003 y diluir en 3mL del buffer anteriormente mencionado, dado que según la ficha técnica del producto hay 5,9UI/mg de solido, se realizan los siguientes cálculos:

$$\frac{5,9UI * 16,95mg}{1mg * 3mL} = 33,333UI/mL$$

Luego para obtener una concentración de 1UI/mL

$$\frac{33,333UI}{mL} * Vi = \frac{1UI}{mL} * 1mL$$
$$Vi = 0,030mL \text{ ó } 30\mu L$$

30μL que se llevan a 1mL para obtener la concentración deseada.

Sustrato: Pesar 15mg de pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido) Sigma N1377 y se diluir en 1mL del buffer preparado con anterioridad. Dado que el peso molecular del sustrato es 315,25 g/mol. Se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{15mg}{\frac{315,25mg}{mmol} * 1mL} = 0,047M \text{ ó } 47mM$$

Luego para obtener una concentración de 11,3mM

$$47mM * V_i = 11,3mM * 1mL$$

$$V_i = 0,240mL \text{ ó } 240\mu L$$

240 μ L que se llevan a 1mL para obtener la concentración deseada.

Tabla B-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa glucosidasa.

Reactivos	Concentración Inicial	Blanco del control	Control (100% actividad enzimática)	Blanco de la muestra	Patrón ó Muestra
Buffer de Fosfatos 0,5M pH 6,8	---	50 μ L	40 μ L	30 μ L	20 μ L
Muestra	10240, 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80 y 40 μ g/mL	---	---	20 μ L	20 μ L
Alfa glucosidasa	1UI/mL	---	10 μ L	---	10 μ L
Agua destilada	---	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L
Mezclar agitando suavemente					
Incubar a 37°C por 15min					
Adicionar 10 μ L de pNPG 11,3mM					
Mezclar agitando suavemente e incubar a 37°C durante 45minutos					
Medir el p-nitrofenol liberado a 415nm					

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido)

C. Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de alfa glucosidasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata.

Buffer de fosfatos: Pesar 3,402g de fosfato monobásico de potasio y se disolver en 25mL de agua destilada para formar una solución de fosfato monobásico de potasio 1M. Por aparte pesar 4,355g de fosfato dibásico de potasio y disolver en 25mL de agua destilada para formar una solución de fosfato dibásico 1M. Utilizar 12,2mL de fosfato dibásico de potasio 1M y 12,8mL de fosfato monobásico de potasio 1M, mezclar y diluir a 50mL. Se obtiene un buffer de fosfatos 0,5M que contiene 0,244M de fosfato dibásico de potasio y 0,256M de fosfato monobásico de potasio con un pH 6,5-6,8 (Pistia y Hollingsworth, 2001).

Enzima: Utilizar un sonicador con un control de la una amplitud del 90% (90wt). Suspender un total de 100mg polvo intestinal de rata en 1mL de solución salina normal, sonicar la suspensión 12 veces por 30 segundos a 4°C. Después centrifugar (15000rpm, 30 min, 4°C) utilizar 600µL del sobrenadante resultante que queda en una concentración de 1,0UI/mL y utilizar para el ensayo. (Jo et al., 2011; Ayinampudi et al., 2012).

Sustrato: Pesar 15mg de pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranosido) Sigma N1377 y se diluir en 1mL del buffer preparado con anterioridad. Dado que el peso molecular del sustrato es 315,25 g/mol. Se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{15mg}{\frac{315,25mg}{mmol} * 1mL} = 0,047M \text{ ó } 47mM$$

Luego para obtener una concentración de 11,3mM

$$47mM * Vi = 11,3mM * 1mL$$

$$V_i = 0,240\text{mL} \text{ ó } 240\mu\text{L}$$

240 μL que se llevan a 1mL para obtener la concentración deseada.

Tabla C-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa glucosidasa extraída del polvo intestinal de rata

Reactivos	Concentración Inicial	Blanco del control	Control (100% actividad enzimática)	Blanco de la muestra	Patrón ó Muestra
Buffer de Fosfatos 0,5M pH 6,8	---	50 μL	40 μL	30 μL	20 μL
Muestra	10240, 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	---	---	20 μL	20 μL
Alfa glucosidasa extraída	1UI/mL	---	10 μL	---	10 μL
Agua destilada	---	40 μL	40 μL	40 μL	40 μL
Mezclar agitando suavemente					
Incubar uniformemente a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15min					
Adicionar 10 μL de pNPG 11,3mM					
Mezclar agitando suavemente e incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 45minutos					
Medir el p-nitrofenol liberado a 415nm					

pNPG: (p- nitrofenil- α -D- glucopiranósido)

D. Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de maltasa extraída del liofilizado de polvo intestinal de rata.

Buffer de fosfatos: Pesar 3,402g de fosfato monobásico de potasio y se disolver en 25mL de agua destilada para formar una solución de fosfato monobásico de potasio 1M. Por aparte pesar 4,355g de fosfato dibásico de potasio y disolver en 25mL de agua destilada para formar una solución de fosfato dibásico 1M. Utilizar 12,2mL de fosfato dibásico de potasio 1M y 12,8mL de fosfato monobásico de potasio 1M, mezclar y diluir a 50mL. Se obtiene un buffer de fosfatos 0,5M que contiene 0,244M de fosfato dibásico de potasio y 0,256M de fosfato monobásico de potasio con un pH 6,5-6,8 (Pistia y Hollingsworth, 2001).

Enzima: Utilizar un sonicador con un control de la una amplitud del 90% (90wt). Suspender un total de 100mg polvo intestinal de rata en 1mL de solución salina normal, sonicar la suspensión 12 veces por 30 segundos a 4°C. Después centrifugar (15000rpm, 30 min, 4°C) utilizar 600µL del sobrenadante resultante que queda en una concentración de 1,0UI/mL y utilizar para el ensayo. (Jo et al., 2011; Ayinampudi et al., 2012).

Sustrato: Pesar 15mg de maltosa Sigma 63418 y se diluir en 1mL del buffer preparado con anterioridad. Dado que el peso molecular del sustrato es 360,31g/mol. Se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{15mg}{\frac{360,31mg}{mmol} * 1mL} = 0,0416M \text{ ó } 41,6mM$$

Para obtener una concentración de 7,5mM

$$41,6mM * Vi = 7,5mM * 1mL$$

$$Vi = 0,180mL \text{ ó } 180\mu L$$

180µL que se llevan a 1mL para obtener la concentración deseada.

Tabla D-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de maltasa

Reactivos	Concentración inicial	Blanco del control	Control (100% actividad enzimática)	Blanco de la muestra	Patrón ó Muestra
Buffer de Fosfatos 0,5M pH 6,8	---	50µL	40µL	30µL	20µL
Muestra	10240, 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80 y 40µg/mL	---	---	20µL	20µL
Alfa glucosidasa	1UI/mL	---	10µL	---	10µL
Agua destilada	---	40µL	40µL	40µL	40µL
Mezclar agitando suavemente					
Incubar a 37°C por 15min					
Adicionar 10µL de maltosa 7,5mM					
Mezclar agitando suavemente e incubar a 37°C durante 40 minutos					
Adicionar 150µL de un kit comercial Liquicolor® Human					
Mezclar agitando suavemente e incubar a 37°C durante 5 minutos					
Medir glucosa liberada a 540nm					

E. Anexo: Protocolo para evaluar inhibición de alfa amilasa

Buffer: Pesar 21,03g de Trizma Base (Sigma/Aldrich) y 4,44g de CaCl₂ anhidro, diluir con un litro de agua destilada, para obtener una solución de 0,2M de Tris que contiene 0,04M de CaCl₂. Aparte medir un volumen de 1mL de una solución de ácido clorhídrico 1M y llevar a volumen final de 100mL, para obtener una solución de ácido clorhídrico a una concentración de 0,01M. A 50mL de la solución de Tris 0,2M que contiene CaCl₂ 0,04M, se agregó ácido clorhídrico 0,01M hasta obtener pH 6,9 y se llevo a un volumen final de 200mL con agua destilada, para obtener un buffer de Tris-HCl (0,05M, pH 6.9) que contiene CaCl₂0,01M.

Enzima: Pesar 15mg de amilasa porcina pancreática Sigma A3170, y diluir en 1mL del buffer anteriormente preparado, dado que según la ficha técnica del producto había 22UI/mg de solido, se realizan los siguientes cálculos:

$$\frac{15mg * 22UI}{1mg * 1mL} = 330UI/mL$$

Luego para obtener una concentración de 2UI/mL

$$\frac{330UI}{mL} * Vi = \frac{2UI}{mL} * 1mL$$

$$Vi = 0,006mL \text{ ó } 6\mu L$$

6μL que se llevan a 1mL para obtener la concentración deseada.

Sustrato: Pesar 15mg de Almidón Azul Sigma S7776 y se suspender en 1mL del buffer Tris-HCl 0,05M pH 6,9, para obtener una concentración de 10mg/mL, se hicieron los siguientes cálculos:

$$\frac{15mg}{mL} * Vi = \frac{10mg}{mL} * 0,4mL$$

$$V_i = 0,266mL \text{ ó } 267\mu L$$

267 μ L que se llevan a 0,4mL para obtener la concentración deseada.

Tabla E-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa amilasa.

Llevar a ebullición (100°C) 200 μ l de Almidón Azul (10mg/mL) por 5min					
Incubar a 37°C por 5 minutos					
Reactivos	Concentración inicial	Blanco del control	Control (100% actividad enzimática)	Blanco de la muestra	Patrón ó Muestra
Muestra	10240, 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80 y 40 μ g/mL	---	---	200 μ L	200 μ L
Alfa amilasa	2 UI/mL	---	100 μ L	---	100 μ L
Buffer de Tris-HCl (0,05M, pH 6.9) que contiene CaCl ₂ 0,01M	----	300 μ L	200 μ L	100 μ L	—
Mezclar agitando vigorosamente					
Incubar a 37°C por 60min					
Centrifugar a 3000rpm por 5min a 4°C					
Medir Absorbancia a 100 μ L del sobrenadante a 595nm					

Bibliografía

Ahmad, S., Malik, A., Afza, N., Yasmin, R. (1999). A new withanolide glycoside from *Physalis peruviana*. *Chem. Pharm. Bull.*, 47(4), 477—480.

American Diabetes Association (ADA). (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 35,S1, S64-S71.

Andrade A., Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 325–348.

Andrade A., Becerra J., Cardenas R. (2008). Alpha glucosidase inhibiting activity of some mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 116, 27–32.

Ani V., Naidu A.A. (2008). Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cummin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. *Eur Food Res Technol*. 226, 897–903.

Arun M., Asha V.V. (2007). Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 110–114.

Aschner P. (2010). Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Av Diabetol*. 26, 95-100.

Ayinampudi SR., Domala R., Merugu R., Bathula S., Janaswamy M.R. (2012). New icetexane diterpenes with intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical scavenging activity isolated from *Premna tomentosa* roots. *Fitoterapia*. 83(1), 88-92.

Babu K.H., Tiwari A. K., Srinivas P.V., Ali A.Z., Raju B.C., Rao M. (2004). Yeast and mammalian α -glucosidase inhibitory constituents from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall.ex Meisson. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14, 3841–3845.

Bacca G.C., Castillo L.M., Garcia L.M., Lancheros R.J. (2009). Enzimología. Manual de estudios y Práctica. Universidad INCCA de Colombia. Bogotá D.C. Pp 21-33.

Benalla W., Bellahcen S., Bnouham M. (2010) Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current Diabetes Reviews*.6, 247-254.

Bernal H., Correa J. (1998). Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Bogotá, Colombia: Editora Guadalupe Ltda. Tomo XII. p. 441.

Bernal R.C.A. (2012). Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Bhandari M.R., Jong-Anurakkun N., Kawabata J. (2007). α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*). *Food Chemistry*. 103, 1319–1323.

Bischoff H. (1994). Pharmacology of α -glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*. 24, Suppl 3, 3-10.

Braverman J.B.S. (1967). Introducción a la bioquímica de los alimentos. Edición Española. Ediciones Omega S.A. p.171.

Brownlee M. (2005). The pathobiology of diabetic complications A unifying mechanism. *Diabetes*. 54(6), 1615-1625.

CAZy. Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy). 2013. Glicosilhidrolasas. Última actualización 10-05-2013. [Internet]. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>. Consultado el 12 de Mayo de 2013.

Cerón I.S., Higuera J.C. Cardona C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*. 5, 17-26.

Chiba S. (1997). Molecular mechanism in α -Glucosidase and glucoamylase. *Bioscience Biotech. Biochem.* 61 (8), 1233-1239.

Costa B, Pinol C. (1997). Acarbose in ambulatory treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus associated to imminent sulfonylurea failure; a randomised multicentric trial in primary health care. Diabetes and Acarbose Research Group. *Diabetes Res Clin Pract.* 38(1), 33-40.

Dahlqvist A. (1964). Method for assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry.* 7, 18-25

Deguchi Y., Miyasaki K. (2010). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. *Nutrition & Metabolism.* 7, 1-9.

Derek L.S., Taylor S.I., Olefsky J. M. (2004). Diabetes mellitus: A fundamental and clinical Text. 3ra Edición. Lippincott Williams & Wilkins. Capítulo 79. α -Glucosidase inhibitors in the treatment of diabetes. <http://www.msdlatinamerica.com/diabetes/sid1418338.html>

Deuschländer M.S., Van de Venter M., Roux S., Louw J., Lall N. (2009) Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol 124. pp 619–624.

Dominic W.S. (1995) Food enzymes: structure and mechanism. *Chapman & Hall.* Pp 56-59.

Douglas D.C., Duke S.H. (1983). Specific determination of α -amylase activity in crude plant extracts containing β -Amylase. *Plant Physiol.* 71, 229-234.

Fauci A. S., Braunwald E., Kasper D. L. (2009). Principios de medicina interna. 17^a ed. México DF. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, Capítulo 338. Diabetes mellitus.

Fisterra. (2011). Guías clínicas- Diabetes mellitus tipo 2. Elaborado por grupo de diabetes de la asociación galega de medicina familiar y comunitaria. Última actualización 24-03-2011. http://www.fisterra.com/guias2/diabetes_mellitus.asp. Consultado el 10 de marzo de 2013.

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

Fischer, G., Flórez, V., Sora, A. (2000). Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá) Facultad de Agronomía, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola, Asociación Hortofrutícola de Colombia. Santa Fe de Bogotá Colombia, p. 7.

Franco, L., Matiz, G., Calle, J., Pinzón, R., Ospina, L. (2007). Antiinflammatory activity of extracts and fractions obtained from *Physalis peruviana* L. calyces. *Biomedica*, 27(1), 110–115.

Galvez R. L., Kwon Y.I, Apostolidis E., Shetty K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology* 101, 4676–4689.

Gamboa, J. (2010). Ensayo clínico patogenésico sobre los cálices de *Physalis peruviana* L. Tesis de Maestría en Medicina Alternativa. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

Gao, H., Kawabata, J. (2005). α -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoylcontaining flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13, 1661–1671.

Gao H., Huang Y.N., Gao B., Xu P.Y. Inagaki C., Kawabata J. (2008). α -glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry*. 106, 1195–1201.

García, A.T., Sua S. (1997). Evaluación de la actividad hipoglicemiante de algunas fracciones obtenidas de frutos de *Physalis peruviana* L.. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 21-23.

García, M.C., Lozano, A.A. (2002). Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de los cálices de *Physalis peruviana* L. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Griffiths G., Trueman L., Crowther T., Thomas B., Smith B. (2002). Onions a global benefit to health. *Phytother. Res*. 16, 603–615.

Gholamhoseiniana A., Fallaha H., Sharififarb F. (2009). Inhibitory effect of methanol extract of *Rosa damascena* Mill. flowers on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. *Phytomedicine*. 16, 935–941

Heiner L. (2002). Acarbose: an update of its therapeutic use in diabetes treatment. *Clin Drug Invest*. 22 (3), 151-156.

Hamdan I.I., Afifi F.U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 93, 117–121.

Hamdan I.I, Afifi F. U., Kasabri V. (2011). In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 133,888–896.

Hansawasdi C., Kawabata J., Kasai T. (2000). α -amylase inhibitor from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 64, 1041–1043.

Hermans M. M. P, Kroos M. A., Vas Beeumen J, Ben A. Oostra B.A , Reuser A.J.J. (1991). Human lysosomal α -glucosidase. Characterization of the catalytic site. *Biological Chemistry J*. 266(21), 13507-13512.

Hoefsloot L. H., Hoogeveen W. M., Reuser A.J., Oostra B.A. (1990). Characterization of the human lysosomal α -glucosidase gene. *Biochem. J*. 272, 493-497.

Hoffmann J., Spengler M. (1997). Efficacy of 24-week monotherapy with acarbose, metformin, or placebo in dietary-treated NIDDM patients: the Essen-II study. *Am J Med*. 103, 483–490.

Hogan S., Zhang L., Li J., Sun S., Canning C., Zhou K. (2010). Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & Metabolism*. 7, 71-80

Holt .P. R., Atillasoy E., Lindenbaum J., Ho S. B., Lupton J. R., McMahon D., Moss S. F. (1996). Effects of acarbose on fecal nutrients, colonic pH, and short-chain fatty acids and rectal proliferative indices. *Metabolism*. 145(9), 1179-1187.

Ji-Youn Y., Hyo-Young P., Kyung-Hea C. (2004). Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L. inhibition of α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 66S, S149–S155.

Jo S-H, Ka E-H, Lee H-S, Apostolidis E, Jang H-D, Kwon Y-I. (2009). Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 2(4), 52-60.

Jo S-H., Ha K-S., Moon K-S., Lee O-H., Jang H-D., Kwon Y-I. (2011). *In vitro* and *in vivo* anti-hyperglycemic effects of omija (*Schizandra chinensis*) Fruit. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1359-1370.

Kawamura M., Heinecke J.W., Chait A. (1994). Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by superoxide-dependent Pathway. *J. Clin. Invest.* 94(2), 771–778.

Kim Y.M., Jeong Y.K., Wang M.H., Lee W.Y., Rhee H.I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*. 21, 756–761.

Kim K.Y., Nama K.A., Kurihara H., Kim S.M. (2008). Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*. 69, 2820–2825.

Kim S.H, Jo S-H., Kwon Y.I., Hwang J.K. (2011). Effects of Onion (*Allium cepa* L.) Extract administration on intestinal α -glucosidases activities and spikes in postprandial blood glucose levels in SD rats model. *International Journal of Molecular Sciences*. 12, 3757-3769.

Kimura A., Lee J.H., Lee I.S., Lee H.S. Park K.H. Chiba S., Kim D. (2004). Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II. *Carbohydrate Research*. 339, 1035–1040.

Kumar S., Kumar V., Rana M., Kumar D. (2012). Enzymes inhibitors from plants: an alternate approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Communications*. 2 (2) 18-33.

Kuriki T., Imanaka T. (1999). The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. 87 (5), 557-565.

Kwon Y.I., Apostolidis E., Shetty K. (2008). In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*. 99, 2981–2988.

Lee D.S., Lee S.H. (2001). Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *FEBS Letters*. 501, 84-86.

Li Y., Wen S, Kota B. P., Peng G., Qian Li G., Yamahara J., Roufogalis B. D. (2005). *Punica granatum* flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 239–244.

Licodiedoff S., Koslowski A.D., Hoffmann Ribani R. (2013). Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit at two maturity stages. *Acta Scientiarum. Technology*. 35(2), 393-399.

Mai T.T., Chuyen N.V. (2007). Anti-Hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.). Merr and Perry. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71(1), 69-76.

Martinez W., Ospina L.F., Granados D., Delgado G. (2010). *In vitro* studies on the relationship between the anti-inflammatory activity of *Physalis peruviana* extracts and the phagocytic process. *Immunopharmacol and Immunotoxicol*. 32(1), 63-73.

Mayur B., Sandesh S., Shruti S., Sung-Yum S. (2010). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L.. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(15), 1547-1553.

McCue P., Kwon Y.I. Shetty K. (2005). Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I converting enzyme potential of selected foods. *Journal of Food Biochemistry*. 29, 278–294.

Medina D.P. (2012). Implementación de una metodología para la obtención de marcadores de frutos de *Physalis peruviana* L., y evaluación de actividad hipoglicemiante. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Mertes G. (1998). Efficacy and safety of acarbose in the treatment of type 2 diabetes: data from a 2-year surveillance study. *Diabetes Res Clin Pract*; 40, 63-70.

Mertes G. (2001). Safety and efficacy of acarbose in the treatment of type 2 diabetes. Data from a 5-year surveillance study. *Diabetes Res Clin Pract*. 52, 193-204.

Montero C. A. (2007). Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*. Supl H., H3-H11.

Mora, A. C. (2008). Evaluación del efecto de los frutos de *Physalis peruviana* sobre el estrés oxidativo sobre un modelo de diabetes experimental. Tesis para optar el título de Magister en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia.

Mukherjee P. K., Maiti K., Mukherjee K., Houghton Peter J. (2006). Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology*. 106, 1–28.

Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W. (2004). Harper: Bioquímica ilustrada. 16ª ed. Mexico D.F. Editorial El manual moderno. Capítulo 8, Enzimas: cinética, Pp 69-80.

NC-IUBMB Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular en la nomenclatura y clasificación

de enzimas por las reacciones que cataliza. Última actualización 08-05-2013. [Internet]. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Consultado el 12 de Mayo de 2013.

Negri G. (2005) Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41 (2), 121-142.

Nguyen H.T., Kim S.M. (2009). Three compounds with potent α -glucosidase inhibitory activity purified from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *SPISE Symposium of Food Consumer Insights in Asia*. 112-122.

NICE National Institute for Health and Clinical Excellence, 2009. The Management of type 2 diabetes. NICE clinical guideline 97. <http://www.nice.org.uk/guidance/CG97>. Consultado el 10 de mayo de 2013.

Nishio T., Hakamata W., Kimura A., Chiba S., Takatsuki A., Kawachi R., Oku.T. (2002) Glycon specificity profiling of α -glucosidases using monodeoxy and mono-O-methyl derivatives of *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside. *Carbohydrate Research*. 337, 629–634.

Nushin A., Feller G., Gerday C., Hase R. (1998). Crystal structures of the psychrophilic α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Science*, 7, 564-572.

Nushin A., Feller G., Gerday C., Hase R. (2002). Structural basis of α -amylase activation by chloride. *Protein Science*. .11, 1435–1441.

Oboh G., Ademiluyi A.O., Akinyemi A.J., Henle T., Saliu J.A., Schwarzenbolz U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*. *Journal of functional foods*. 4, 450-458.

Organización Mundial de la Salud. (2012). Nota descriptiva N°312. Actualizado septiembre 2012 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>. Consultado 9 Marzo 2013.

Organización Panamericana de la Salud. (2001). La diabetes en las américas. Boletín epidemiológico. 22 (2), 1-5.

Ospina L.F., Pinzon R. (1995). Plantas usadas como antidiabéticas en la medicina popular Colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 23, 81–94.

Pistia-Brueggeman G., Hollingsworth R.I. (2001). A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. *Tetrahedron*. 57, 8773-8778.

Ramadan M, Morsel J. (2003). Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51, 969-974.

Rigelsky J.M., Sweet B.V. (2002). Hawthorn, pharmacology and therapeutic uses. *Am J Health Syst Pharm.* 59, 417–422.

Rinderknecht H., Wilding P., Haverback B.J. (1967). A new method for the determination of alpha-amylase. *Experientia*. 23(10), 805.

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

Rye C. S., Withers S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4, 573–580.

Shai L. J., Magano S. R., Lebelo S. L., Mogale A.M. (2010). Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African Journal of Botany*, 76, 465–470.

Shai L. J., Magano S. R., Lebelo S. L., Mogale A. M. (2011). Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(13), 2863-2867.

Shankar D.K., Dnyaneshwar M.N. (2013). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of *Pithecellobium dulce* bark and leaves. *Phytopharmacology*. 4(1), 123-130.

Shihabudeen S, Priscilla D.H., Thirumurugan K.T. (2011). Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. *Nutrition & Metabolism*. 8, 46.

Shim Y.J., Doo H.K., Ahn S.Y., Kim Y.S., Seong J.K., Park I.S., Min B.H. (2003). Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *J Ethnopharmacol*. 85(2-3), 283-7.

Shin K.H., Kang S.S., Seo E.A., Shin S.W. 1995. Isolation of aldose reductase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum boreale*. *Arch. Pharm. Res.* 18(2). 65-68.

Shinde J., Taldone T., Barletta M., Kunaparaju N., Hu B., Kumar S. Placido J. Zito W. (2008). α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto–Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Research*. 343, 1278–1281.

SIB Instituto Suizo de Bioinformática. Sistema Experto de Análisis de Proteínas (ExpASy). Alfa Glucosidasa. <http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.20>. Consultado el 12 de Mayo de 2013.

SIB (2) Instituto Suizo de Bioinformática. Sistema Experto de Análisis de Proteínas (ExpASy). Alfa Amilasa. <http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.1>. Consultado el 12 de Mayo de 2013.

Sigma Aldrich. 1994. Enzymatic Assay of maltase. [Internet]. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/alpha_glucosidase_sed.Par.0001.File.tmp/alpha_glucosidase_sed.pdf. Consultado el 30 de octubre de 2013.

Sigma Aldrich. 1995 Enzymatic Assay of α -amilase. [Internet]. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>. Consultado el 29 de octubre de 2013.

Sigma Aldrich. 1996 Enzymatic Assay of α -glucosidase. [Internet]. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/alpha_glucosidase_sed.Par.0001.File.tmp/alpha_glucosidase_sed.pdf. Consultado el 29 de octubre de 2013.

Sridhar R.A., Ramesh D., Ramchander M., Sreenivasulu B., Madhusudana R.J. (2012). New icetexane diterpenes with intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical scavenging activity isolated from *Premna tomentosa* roots. *Fitoterapia*. 83, 88–92.

Stryer L., Berg J.M, Tymoczko J.L. Bioquímica. 6ta Edición. Editorial Reverté. Barcelona España 2008. Pp 217-221

Subramanian R., Asmawi M. Z., Sadikun A. (2008). *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta biochimica polonica*. 55 (2), 391–398.

Sudha S., Kumar S.P. (2012). Evaluation of alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory properties of selected seaweeds from gulf of mannar. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(8) 128-130.

Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 52(2), 149-53.

Trinder P. J. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Clin. Path.* 22, 158-161.

Universidad de los Andes, Corporación Colombia Internacional (CCI), Departamento de Planeación Nacional. (1994). Análisis internacional del sector hortofrutícola para Colombia. Bogotá.

Wang H., Dub Y.J., Song H.C. (2010). α -glucosidase and a-amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*. 123, 6–13.

Wongsa P., Chaiwarit J., Zamaludien A. (2012). In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against a-amylase and a-glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*. 131, 964–971.

Worthington K., Worthington V. (1993). Enzymatic Manual. Worthington. [Internet]. <http://www.worthington-biochem.com/MALT/default.html> Consultado el 12 de Mayo de 2013.

Worthington (2) K., and Worthington, V. (1993). Enzymatic Manual. Worthington. [Internet]. <http://www.worthington-biochem.com/AA/default.html>. Consultado el 12 de Mayo de 2013.

Wu, S.J., Ng, L.T., Huang Y.M., Lin, D.L., Wang, S.S., Huang S. N., Lin C.C. (2005). Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(6), 963-966.

Wu, S.J., Chang, S.P., Lin, D.L., Wang, S.S., Hou, F.F., Ng, L.T. (2006). Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1132-1138.

Wu X.Q., Xu H., Yue H., Liu K.Q., Wang X.Y. (2009). Inhibition kinetics and the aggregation of alpha-glucosidase by different denaturants. *Protein J.volumen.* 28(9-10), 448–56.

Ye X.P, Song C.Q, Yuan P., Mao R.G. (2010). α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity of common constituents from traditional chinese medicine used for Diabetes mellitus. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 8(5), 349–352.

Youn J.Y., Park H.Y., Cho K.H. (2004). Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 66S, S149–S155.

Zavala, D., Mauricio, Q., Pelayo, A., Posso, M., Rojas, J., Wolach, V. (2006). Citotoxic effect of *Physalis peruviana* (capuli) in colon cancer and chronic myeloid leukemia. *Anales de la Facultad de Medicina de Lima*, 67, 283–289.