

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS ENZIMAS α y β
GLUCOSIDASA EN FRUTOS DE LA SIERRA SUR ECUATORIANA”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

AUTORES:

Edgar Vinicio Herrera Dutan

C.I. 1724771272

Natali Estefanía Poveda Tapia

C.I. 0105476477

DIRECTORA:

Dra. María Elena Cazar Ramírez PhD

C.I. 0602243800

CUENCA – ECUADOR

2018



RESUMEN

Este estudio se enfocó en la evaluación de la actividad inhibitoria de las enzimas α y β glucosidasa sobre sustratos acuosos provenientes de los frutos de: *Physalis peruviana*, *Malus communis* y *Solanum betaceum*, comercializados en tres mercados de la ciudad de Cuenca. Para el efecto se aplicó un ensayo “in vitro” de inhibición de actividad enzimática, mediante la técnica de microdilución en placas de 96 pocillos. La evaluación de resultados permitió establecer que el extracto acuoso de *Physalis peruviana* (uvilla), inhibió la actividad de las enzimas en estudio en mayor porcentaje (65.70 % para α glucosidasa y 68.89 % para β glucosidasa). *Solanum betaceum* (tomate de árbol) presentó un nivel intermedio de acción inhibitoria, (47.4 % para α glucosidasa y 57.83 % para β glucosidasa). *Malus communis* (manzana) presentó la actividad inhibitoria más baja, (35.17 % para α glucosidasa y 35.52 % para β glucosidasa). Se evaluaron posibles diferencias entre la actividad enzimática de los frutos, en relación a sus lugares de expendio mediante un análisis de varianza de un factor. Este análisis evidenció que no existen diferencias significativas en la actividad enzimática de las especies estudiadas ($p \geq 0,05$).

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten señalar el potencial de los frutos en estudio por su actividad inhibitoria de las enzimas α y β glucosidasa. Estos hallazgos implicarían el desarrollo de estudios posteriores para su valoración como nutracéuticos, incluidos en una dieta saludable.

PALABRA CLAVE: A-GLUCOSIDASA, B-GLUCOSIDASA, *MALUS COMMUNIS*, *SOLANUM BETACEUM*, *PHYSALIS PERUVIANA*



ABSTRACT

The present research is focused on the assessment of the inhibition capacity of aqueous extracts from *Physalis peruviana*, *Malus communis* and *Solanum betaceum*, on the enzymes α and β glucosidase. The fruits under study were available in three Cuenca city markets. An "in vitro" assay of inhibition enzymatic activity was applied by means of the microdilution technique in 96-wells plates. In this assay, *Physalis peruviana* (uvilla) displayed the highest inhibitory activity towards the enzymes α and β glucosidase (65.70% and 68.89%, respectively). *Solanum betaceum* (tree tomato) presented medium inhibitory level (47.4% for α -glucosidase and 57.83% for β -glucosidase). *Malus communis* (apple) displayed a modest inhibitory activity towards α and β glucosidase (35.17% and 35.52%, respectively). Significant differences between the enzymatic activity of the fruits were evaluated, related to the place of commercialization, by means of a one-way Analysis of Variance. The fruits under study, gathered a three markets in Cuenca city, present similar enzymatic activity ($p \geq 0.05$).

The results obtained in this study highlight the potential of the fruits included as a source of bioactive inhibitors of α and β glucosidase. These findings might imply a further study as nutraceutical supplements for a healthy diet.

KEY WORDS: A-GLUCOSIDASE, B-GLUCOSIDASE, *MALUS COMMUNIS*, *SOLANUM BETACEUM*, *PHYSALIS PERUVIANA*



ÍNDICE

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
LISTA DE TABLAS	5
LISTA DE ANEXOS.....	6
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	10
DEDICATORIA	11
AGRADECIMIENTO	13
INTRODUCCIÓN	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
CAPÍTULO 1	22
1. GENERALIDADES SOBRE LAS GLUCOSIDASAS	22
1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS GLUCOSIDASAS.....	22
1.1.1 Enzima α -glucosidasa.....	22
1.1.2 Enzima β -glucosidasa.....	24
1.3 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS	25
1.3.1 Inhibidores de α -glucosidasa:.....	25
1.3.2 Inhibidores de β -glucosidasa:	25
1.4 ANTECEDENTES BOTÁNICOS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO	26
1.4.1 <i>Physalis peruviana</i>	26
1.4.1.2 Taxonomía.....	26
1.4.1.3 Metabolitos secundarios del género <i>Physalis</i>	27
1.4.1.4 Actividad biológica de metabolitos del género <i>Physalis</i>	28
1.4.2 <i>Malus communis</i>	28
1.4.2.2 Taxonomía.....	28
1.4.2.3 Metabolitos secundarios del género <i>Malus</i>	29



1.4.2.4 Actividad biológica de metabolitos del género <i>Malus</i>	29
1.4.3 <i>Solanum betaceum</i>	29
1.4.3.2 Taxonomía.....	30
1.4.3.3 Metabolitos secundarios del género <i>Solanum</i>	30
1.4.3.4 Actividad biológica de metabolitos del género <i>Solanum</i>	31
CAPÍTULO II.....	20
1. METODOLOGÍA	20
2.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	20
2.2 TRABAJO EXPERIMENTAL	20
2.3 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MATERIAL VEGETAL	20
2.4 PARTE EXPERIMENTAL	20
2.4.1 Obtención de extractos acuosos	20
2.4.2 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa	21
2.4.2.1 Procedimiento.....	21
2.4.3 Ensayos de inhibición de la enzima β -glucosidasa.....	23
2.4.3.1 Procedimiento.....	23
2.4.3.2 Cálculo de la actividad inhibitoria de β -glucosidasa.	25
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS:.....	25
CAPÍTULO III	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1. Actividad inhibitoria del extracto acuoso de los frutos en estudio sobre las enzimas α y β glucosidasa.	32
3.3 Comparación de la actividad inhibitoria de los tres frutos estudiados para los tres sitios de comercialización.	37
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS.....	48



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de la enzima α -glucosidasa según la especificidad por el sustrato. .	23
Tabla 2: Clasificación de la enzima β -Glucosidasa según el punto inicial del hidrolisis....	25
Tabla 3: Clasificación taxonómica: <i>Physalis peruviana</i>	27
Tabla 4: Metabolitos secundarios reportados en el fruto de <i>Physalis peruviana</i>	27
Tabla 5: Clasificación taxonómica: <i>Malus communis</i>	28
Tabla 6: Metabolitos secundarios reportados en el fruto de <i>Malus communis</i>	29
Tabla 7: Clasificación taxonómica: <i>Solanum betaceum</i>	30
Tabla 8: Metabolitos secundarios reportados en el fruto de <i>Solanum betaceum</i>	30
Tabla 9: Esquema para la determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa.....	22
Tabla 10: Distribución de las muestras en la microplaca para evaluar la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, controles positivo y negativo.....	22
Tabla 11: Esquema utilizado en la determinación de la actividad inhibitoria d la enzima β -glucosidasa.	24
Tabla 12: Ubicación de las muestras en la microplaca para evaluar la actividad inhibitoria de la enzima β -glucosidasa y los controles positivo y negativo.	25
Tabla 13: Actividad inhibitoria de las enzimas α y β glucosidasa presentes en los frutos de <i>Malus communis</i> , <i>Solanum betaceum</i> y <i>Physalis peruviana</i> , obtenidos en tres lugares de comercialización.....	33
Tabla 14 Resumen de promedios de actividad inhibitoria de los frutos de <i>M. communis</i> , <i>S. betaceum</i> y <i>P. peruviana</i> sobre las enzimas α y β glucosidasa.	34
Tabla 15: ANOVA a una vía de la actividad inhibitoria de enzimas α y β glucosidasa	38



LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Physalis peruviana</i>	27
<i>Figura 2: Malus communis</i>	28
<i>Figura 3: Solanum betaceum</i>	30

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Identificación taxonómica de los frutos en estudio.....	48
Anexo 2: Preparación de los reactivos para β -glucosidasa.....	49
Anexo 3: Materiales, reactivos y equipos utilizados en los ensayos de inhibición de β -glucosidasa.....	50



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Edgar Vinicio Herrera Dutan en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS ENZIMAS α y β GLUCOSIDASA EN FRUTOS DE LA SIERRA SUR ECUATORIANA", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de septiembre de 2018

Edgar Vinicio Herrera Dutan

C.I: 1724771272



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Natali Estefania Poveda Tapia en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS ENZIMAS α y β GLUCOSIDASA EN FRUTOS DE LA SIERRA SUR ECUATORIANA", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de septiembre de 2018



Natali Estefania Poveda Tapia
C.I: 0105476477

CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Edgar Vinicio Herrera Dutan, autor del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS ENZIMAS α y β GLUCOSIDASA EN FRUTOS DE LA SIERRA SUR ECUATORIANA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de septiembre de 2018



Edgar Vinicio Herrera Dutan

C.I: 1724771272



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Natali Estefania Poveda Tapia, autora del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS ENZIMAS α y β GLUCOSIDASA EN FRUTOS DE LA SIERRA SUR ECUATORIANA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de septiembre de 2018

Natali Estefania Poveda Tapia
C.I: 0105476477



DEDICATORIA

A Dios, por darme fuerzas cuando ya no las tenía, ayudarme cuando más lo necesitaba y por enseñarme que somos personas capaces de cumplir cada meta propuesta por nosotros mismo.

A mis padres, por darme su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado y enseñarme que no hay satisfacción más grande que el trabajo de uno mismo. A todos mis hermanos, que son mi ejemplo a seguir.

A mis tan apreciados y locos amigos, que estuvieron alegrándome los días de la universidad: Yes, Ara, Kari, Caro y Adrián. Y todas aquellas personas que me ayudaron a seguir creciendo; Antonio.

A mi directora de tesis, Dra. María Elena Cazar Ramírez, por su valiosa colaboración en la dirección del trabajo de titulación.

Edgar Herrera.

Posdata.....



DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este trabajo a DIOS, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida, por permitirme culminar la carrera profesional, por llenarme de fortaleza en los momentos de gran dificultad, por enseñarme a ser perseverante y a confiar en sus palabras, que todo lo pedido se hará en el tiempo justo.

A mi madre por ser un pilar fundamental de mi vida, sin ella, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora he logrado, su tenacidad y su lucha insaciable han hecho que sea mi gran ejemplo a seguir y destacar.

A mi hijo por los momentos sacrificados en nuestra vida como familia, que requirió el cumplimiento de esta meta, gracias hijo mío por ser la fuente de mi esfuerzo y todas las energías requeridas en este, la recompensa a cada sacrificio que realizamos tú y yo, vendrán y el tiempo será el mejor juez.

A mi hermano por ser un gran amigo, por ser un apoyo y fortaleza en mi vida a quien le deseo el mejor de los éxitos en sus estudios.

A mi padre por su apoyo incondicional en mis logros, aunque estando lejos siempre lo llevo en mi corazón.

A mi directora de tesis, Dra. María Elena Cazar Ramírez, agradezco su apoyo incondicional para que este trabajo de investigación culminara con éxito.

Natali Poveda Tapia.



AGRADECIMIENTO

A nuestra Directora de tesis Dra. María Elena Cazar Ramírez, un agradecimiento muy especial por su paciencia, dedicación, motivación y aliento, ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda, en el desarrollo y culminación de este trabajo

De igual manera agradecer a todos nuestros docentes quienes nos formaron a lo largo de nuestra carrera para cumplir nuestra meta profesional.

Finalmente agradecemos a Dios el ser supremo que nunca nos abandona, por darnos la fuerza, sabiduría y paciencia para la realización de este trabajo, quien nos ha permitido lograr metas maravillosas en nuestras vidas.

Edgar Herrera

Natali Poveda



*Cuando he decidido plenamente que el resultado vale la pena, lo que
hago es ir por él, y hacer prueba tras prueba hasta que lo consigo.
(Thomas Edison)*



INTRODUCCIÓN

En la medicina tradicional, en la agricultura y el campo ambiental, las plantas han formado parte fundamental en el tratamiento de diversas patologías, y con los avances tecnológicos en las últimas décadas se han logrado obtener compuestos de extractos vegetales con propiedades terapéuticas (Escalona, 2011).

El estudio de los mecanismos enzimáticos ha proporcionado el descubrimiento de nuevos fármacos, aplicaciones en el campo de la medicina y en el campo ambiental, dentro del cual, las enzimas tienen gran importancia farmacológica, así como también en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Komatsu, Hanaoka, Adibekian, Yoshioka, & Terai, 2013).

En particular, las enzimas α y β glucosidasa, conocidas también como carbohidrasas, son las responsables del hidrólisis de polisacáridos. (Simões-Pires, Hmicha, Marston, & Hostettmann, 1990).

Los inhibidores de estas enzimas son de gran interés terapéutico ya que están relacionados con el mecanismo de diferentes actividades biológicas: anti-cáncer y anti-metastásica, anti-alimentaria en animales herbívoros, anti-hiperglucemia, y anti-viral. Las enzimas en estudio se convierten en objeto de investigación por su aplicación en estudios farmacológicos y ambientales. A esto se une una falta de información que existe por parte de la población de la región, en cuanto al efecto beneficioso del consumo de productos naturales con actividad inhibitoria de estas enzimas, por la importancia que supone el conocimiento de una buena alimentación (Kuntz, Tarling, Withers, & Rose, 2012).

La exploración de fuentes naturales de inhibidores enzimáticos se convertirá en un campo de investigación promisorio de plantas y frutos (Bernal, H & Correa, J. 2015).

El presente estudio se enfoca en tres frutos tradicionalmente consumidos en la Sierra Sur Ecuatoriana, y plantea evaluar su actividad inhibitoria sobre las enzimas α y β glucosidasa. A continuación, se presentan la hipótesis y objetivos planteados para el desarrollo de la investigación.



HIPÓTESIS

En la Sierra Sur Ecuatoriana existen frutos con potencial inhibitorio sobre las enzimas α y β glucosidasa, por lo tanto, se espera que en los frutos *Malus communis*, *Solanum betaceum* y *Physalis peruviana*, provenientes de esta región, estén presentes dichas propiedades inhibitorias.

Para someter a prueba esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad inhibitoria de las enzimas α y β glucosidasa en frutos de la Sierra Sur ecuatoriana: *Physalis peruviana*, *Malus communis* y *Solanum betaceum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el potencial de los frutos en estudio como posibles inhibidores de las enzimas α y β glucosidasa.
2. Relacionar los resultados obtenidos con el potencial uso de los frutos en estudio como nutraceuticos recomendados en la alimentación.
3. Generar información relevante sobre la bioactividad de frutos de alto consumo en la ciudad de Cuenca.



CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES SOBRE LAS GLUCOSIDASAS

Son una clase de las enzimas hidrolasas, las cuales están involucradas en la catálisis de reacciones hidrolíticas de diferentes tipos de sustrato como ácidos fosfóricos, esteres de ácidos carboxílicos, éteres, péptidos y carbohidratos mediante la utilización de agua en su proceso. Las glucosidasas son enzimas de importancias en la industria alimentaria, química y farmacéutica. (Bernal Rodríguez, C. A, 2012)

Las glucósido hidrolasas pertenecen a la subclase de las hidrolasas, la cual actúa sobre los enlaces α y β glucosídicos de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos con la finalidad de obtener varias unidades de monosacáridos de menor peso molecular, las enzimas glucósido hidrolasas también se encuentran relacionadas en los múltiples procesos biológicos como reconocimiento viral y la degradación de la biomasa (Chen, W., Xie, T., Shao, Y., & Chen, F, 2012).

1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS GLUCOSIDASAS

1.1.1 Enzima α -glucosidasa

Las α glucosidasas se encuentran presentan en una gran variedad de seres vivos, como animales, plantas, bacterias y hongos. Tanto la propiedades de la enzima como el sustrato va depender de gran medida del origen donde haya sido obtenido (Van de Laar et al., 2005).

En los seres humanos, las α glucosidasas se encuentran presente en dos isoformas: EC 3.2.1.3 y EC 3.2.1.20, las dos son codificadas por el gen GAA. La función principal de estas isoformas es hidrolizar los enlaces α (1,4 y 1,6) de oligosacáridos y disacáridos dejando en libertan una unidad de α D-glucosa como producto de su acción (Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., & Meza, V, 2011)

La isoforma EC 3.2.1.3 se encuentran presentes en la mayoría de las células del organismo cumpliendo funciones específicas del catabolismo; por otra parte, la isoforma EC 3.2.1.20 se presentan en las vellosidades del intestino delgado, es una de las enzimas clave involucradas en el metabolismo y digestión de los carbohidratos, en la última etapa de la digestión en los seres humanos. (Avellaneda, I, 2013).



En las plantas, la enzima α glucosidasa son encargadas de la degradación e hidrolisis del almidón actuando de forma sinérgica conjuntamente con la enzima α amilasa. (Dembinska, A., Mykkänen, O., Kiec, B., & Mykkänen, H, 2008).

En los insectos, la enzima α -glucosidasa se encuentran presente a nivel de las glándulas hipofaringue, secreciones salivares y tubo digestivo, puesto que su principal alimentación es de celulosa y lleva a cabo la digestión mediante la α -glucosidasa de tipo II (Garzón, G. (2008).

En los hongos y las bacterias, la α -glucosidasa se encarga en el mecanismo de degradación de disacáridos y oligosacáridos, obteniendo como resultado de este proceso, energía necesaria para realizar sus funciones vitales (Garzón, G, 2008).

1.1.1.1 Clasificación de las enzimas α glucosidasa

a. Clasificación según la Unión Internacional de Bioquímica (UIB)

EC 3. Hidrolasa

EC 3.2. Glucósido hidrolasa

EC 3.2.1. Capaz de hidrolizar enlaces - O glicosídicos

EC 3.2.1.20. α -Glucosidasa

b. Clasificación según la especificidad por el sustrato.

Tabla 1: Clasificación de la enzima α -glucosidasa según la especificidad por el sustrato.

TIPOS DE α -GLUCOSIDASA	ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO
α Glucosidasa I	Hidroliza los sustratos heterogéneos como aril-glucosidos e hidratos de carbono, como la sacarosa.
α Glucosidasa II	Presenta una alta especificidad enzimática de sustratos homogéneos como di y oligosacáridos.
α -Glucosidasa III	Tiene especificidad enzimática al hidrolizar sustratos homogéneos: glucógeno y almidón soluble.

Fuente: autores



1.1.2 Enzima β -glucosidasa

Las β -glucosidasas, proceden de la familia de las β -glucanasas, estas enzimas son las encargadas del catabolismo de una amplia variedad de hidratos de carbono, mediante el mecanismo de hidrolisis (Kou, M., Yen, J., Hong, J., Wang, C., Lin, C., & Wu, M., 2009).

En los seres humanos, tres enzimas β -glucosidasa han sido identificadas, dos de ellas formando parte de las membranas biológicas con un alto grado de afinidad al sustrato, mientras que la tercera se localiza a nivel del citosol de las células hepáticas y en el intestino de los mamíferos (María Arévalo, 2006).

En insectos la enzima β -glucosidasas, se relaciona con la hidrolisis de los oligosacáridos y disacáridos procedentes de la hemicelulosa y celulosa (Alamino, D. A., 2011)

En las plantas, las β -glucosidasa forman parte de diversas rutas metabólicas relacionándose con la defensa de patógenos y herbicidas e hidrolisis de fitohormonas (Alamino, D. A., 2011).

En las bacterias, las β -glucosidasa es considerada una fuente importante de enzimas, cuyas funciones principales son: degradación de materia orgánica, liberación aromática en vinos y frutas y degradación de celulosa hasta glucosa y etanol (Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., & Meza, V., 2011).

1.1.2.1 Clasificación de las enzimas β glucosidasa

a. Clasificación según la Unión Internacional de Bioquímica (UIB)

EC 3. Hidrolasa

EC 3.2. Glucósido hidrolasa

EC 3.2.1. Capaz de hidrolizar enlaces - O glicosídicos

EC 3.2.1.21. β -Glucosidasa



b. Clasificación según el punto inicial del hidrolisis

Tabla 2: Clasificación de la enzima β -Glucosidasa según el punto inicial del hidrolisis.

TIPOS DE β -GLUCOSIDASA	punto inicial del hidrolisis
Endoglucanasa a (endo-1,4- β-glucanasa)	Hidroliza al azar cualquier punto al interior del polisacárido dejando en libertad una moléculas de menor tamaño
Exoglucanasa (exo-1,4- β- glucanasa)	Actúa ordenadamente partiéndose desde los extremos no reductores de la molécula, liberando unidades residuales de celobiosa

Fuente: autores

1.3 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

En general, los inhibidores enzimáticos son sustancias que interfieren sobre una determinada enzima y enlentecen su actividad, disminuyendo de manera total o parcial su actividad. (Dembinska, Mykkänen, Kiec, & Mykkänen, 2008).

La actividad de una enzima puede ser disminuida o eliminada completamente por la acción de ciertas sustancias a las cuales se las conoce con el nombre genérico de inhibidores enzimáticos. (Kiec et al., 2012).

1.3.1 Inhibidores de α -glucosidasa: La presencia de inhibidores de α -glucosidasa puede contribuir con el retraso y prolongamiento en el tiempo de la digestión de los carbohidratos a nivel intestinal (Li et al., 2011). El efecto metabólico consiste en retardar la absorción de hidratos de carbono (Van de Laar et al., 2005).

La inhibición de algunas de estas enzimas reduce la formación de monosacáridos. Es importante destacar que estos agentes actúan sobre los enlaces α 1,4 y 1,6 de oligosacáridos de forma inhibitoria. (Derek et al., 2004).

1.3.2 Inhibidores de β -glucosidasa: De igual manera, los inhibidores de β -glucosidasa son de tipo hidrolíticas, pero ejercen su acción sobre los enlaces β -glucosídicos de oligosacáridos.



El grado de especificidad de esta enzima disminuye directamente al aumentar el grado de polimerización (Sánchez, García, May-Pat, & Peña, 2001).

La β -glucosidasa es una enzima que contribuye a la degradación de la celulosa y otros beta-1,4 glucanos. La función principal de β -glucosidasa es la hidrólisis de la celobiosa para glucosa, pero muchas de estas enzimas son activas contra otros sustratos, como, la liberación de compuestos del aroma en frutas y vinos y la degradación de la materia orgánica en el suelo y en ecosistemas marinos (Lebovitz, 1997).

1.4 ANTECEDENTES BOTÁNICOS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO


Las especies vegetales originarias del Ecuador se han usado en diferentes campos desde tiempos inmemorables. En la actualidad se ha demostrado que las plantas tienen un rol muy importante (Rey, 2013), debido a su importante actividad biológica, el cual está dada por su alto contenido de metabolitos (Sarango, 2009).

1.4.1 *Physalis peruviana*

1.4.1.1 Descripción morfológica y características botánicas: Es una planta herbácea que puede llegar a medir hasta un metro de alto, crece en lugares sombreados. En el Ecuador se desarrolla en alturas entre 1800 y 2800 m.s.n.m. (Alamino, 2011). Sus hojas son alternas, tiene flores acampanadas de color amarillo, posee raíces de característica fibrosas y se encuentran generalmente a unos 10 y 15 cm de profundidad. Sus frutos son color amarillo de forma globoso u ovoide, que miden 3 cm de diámetro con un peso de 4-5 gramos (Bernal, 2012).

1.4.1.2 *Taxonomía*

Tabla 3: Clasificación taxonómica: *Physalis peruviana*.

	<p>Especie: <i>Physalis peruviana</i></p> <p>Familia: Solanaceae</p> <p>Orden: Solanales</p> <p>Nombre Común: Uvilla, Uchuva.</p>
<p>Figura 1: <i>Physalis peruviana</i></p>	

Fuente: Herbario Azuay.

1.4.1.3 Metabolitos secundarios del género *Physalis*

Estudios fitoquímicos que se han realizado al género *Physalis*, han reportaron la existencia de varios metabolitos secundarios que resultan de interés, desde el punto de vista farmacológico.

Tabla 4: Metabolitos secundarios reportados en el fruto de *Physalis peruviana*.

Witaesteroides	witanólidos, hidroxiwitanólido, vitafisalin, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas y fisalinas (Alamino, 2011) .
Alcaloides	calisteginas a3, b1, b2, y c1. (Alamino, 2011)
Fitoesteroles	Campesterol, ergosterol, lanosterol, estigmasterol, sitosterol, avenasterol (Lock & Rojas, 2005).
Flavonoides	Rutinósido, canferol, quercetina di glicosido, quercetina tri glicosido, rutina, miricetina (Medina, Aviña, & García, 2007).
Cumarinas	6,7 furanocumarinas, 7, 8 piranocumarinas (Salcedo et al., 2015).

1.4.1.4 Actividad biológica de metabolitos del género *Physalis*

En el año 2012 se realizó una investigación de metabolitos con actividad inhibitoria, donde se encontraron compuestos fitoesteroles como beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol y además witaesteroides (Medina, 2012).

En un estudio realizado en la Universidad Nacional de Colombia, se demostró la actividad antioxidante de extractos del fruto de *Physalis peruviana*, como inhibidor de la enzima glucosidasa (Mora, 2008).


1.4.2 *Malus communis*

1.4.2.1 Descripción morfológica y características botánicas: Es un árbol ancho que tiene una copa en forma de globo, el tronco mide de 2 a 2,5 m. de altura, la corteza es lisa. Los frutos son grandes medianamente esféricos, achatados en los polos, su peso varía entre 140 g y 200 g (Silva, 2014).

El cultivo en el Ecuador, se localiza principalmente en las zonas templadas altas de la sierra ecuatoriana (Rosero, 2014).

1.4.2.2 Taxonomía

Tabla 5: Clasificación taxonómica: *Malus communis*

	<p>Especie: <i>Malus communis</i></p> <p>Familia: Rosaceae</p> <p>Orden: Rosales</p> <p>Nombre común: manzana.</p>
<p>Figura 2: <i>Malus communis</i></p>	

Fuente: Herbario Azuay.



1.4.2.3 Metabolitos secundarios del género *Malus*

Estudios fitoquímicos que se han realizado reportaron la existencia de varios compuestos activos con actividad farmacológica.

Tabla 6: Metabolitos secundarios reportados en el fruto de *Malus communis*.

Flavonoides	Flavonoles, catequinas, procianidinas (Silva, 2014), además quercetina y floretina (Hidalgo et al., 2016).
Taninos	Proantocianidinas, catecol, pirogalol (Hidalgo et al., 2016).
Vitaminas	A, K, E y C (García & Serrano, 2014).
Ácidos	Glutaminico, Linoleico, malico, oleico, palmítico (García & Serrano, 2014).

1.4.2.4 Actividad biológica de metabolitos del género *Malus*


Estudios recientes muestran que la quercetina encontrada en la especie *Malus communis* pueden inhibir la enzima glucosidasa. Debido a que estas enzimas están implicadas directamente en la degradación de los carbohidratos complejos en azúcares simples (Francini & Sebastiani, 2013).

1.4.3 *Solanum betaceum*

1.4.3.1 Descripción morfológica y características botánicas: Es una planta arbustiva de rápido crecimiento, puede desarrollarse en zonas andinas del Ecuador, primordialmente en los valles subtropicales de la Sierra y Amazonía, el tallo puede tener una altura entre 1 y 1,50 m, sus frutos tienen una forma ovoide y su tamaño varía entre los 4 a 10 cm de longitud (Acosta, 2011).

1.4.3.2 Taxonomía

Tabla 7: Clasificación taxonómica: *Solanum betaceum*.

	<p>Especie: <i>Solanum betaceum</i></p> <p>Familia: Solanaceae</p> <p>Orden: Solanales</p> <p>Nombre común: Tomate de árbol.</p>
<p><i>Figura 3: Solanum betaceum</i></p>	

Fuente: Herbario Azuay.

1.4.3.3 Metabolitos secundarios del género *Solanum*

Estudios fitoquímicos que se han realizado al género *Solanum* reportaron la existencia de varios compuestos activos con actividad farmacológica.

Tabla 8: Metabolitos secundarios reportados en el fruto de *Solanum betaceum*.

<p>Flavonoides</p>	<p>Antocianinas, flavonas, flavonoles. (Mei-Chun et al., 2009)</p>
<p>Carotenoides</p>	<p>β-criptoxantina, β-caroteno, y β-criptoxantina (Mertz, Brat, Caris, & Gunata, 2010).</p>
<p>Alcaloides</p>	<p>alcaloides esteroidales del tipo de los espirosolanos, solasodina y tomatideno (Amaya & Julca, 2006).</p>
<p>Vitaminas</p>	<p>vitamina A, vitamina B6, vitamina C, vitamina E (Amaya & Julca, 2006).</p>



1.4.3.4 Actividad biológica de metabolitos del género *Solanum*

El principal componente inhibitorio que presenta los frutos de la especie *Solanum betaceum*, lo constituyen los compuestos polifenólicos, especialmente las antocianinas, estas poseen propiedades farmacológicas ejerciendo efectos terapéuticos como efectos anticancerígenos, antitumorales y antiinflamatorio, entre otras (Kou et al., 2009; Garzón, 2008).

Varios estudios señalan que las antocianinas presentes en este fruto posee propiedades farmacológicas y terapéuticas se considera un fruto con propiedades hipoglucémicas (Aguilera, Reza, Chew, & Meza , 2011), debido a que participa en la inhibición de la actividad enzimática de α -glucosidasa y esto genera que en el cuerpo humano, no se puedan catalizar los polisacáridos en azúcares más simple (Krentz & Bailey, 2005).



CAPÍTULO II

1. METODOLOGÍA

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, y los frutos de las especies incluidas fueron adquiridos en tres sitios de comercialización (mercados): Mercado 12 de Abril, Mercado 10 de Agosto y Mercado 9 de Octubre.

2.2 TRABAJO EXPERIMENTAL

El tratamiento de material vegetal, obtención de extractos y evaluación de la actividad enzimática sobre β -glucosidasa se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca (Campus Balzaín), con el asesoramiento de Dra. María Elena Cazar Ramírez. La actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa se evaluó en el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el asesoramiento de la Dra. Claudia Cruz Erazo.

2.3 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MATERIAL VEGETAL

Los frutos recolectados de los tres mercados fueron sometidos a un reconocimiento taxonómico a fin de verificar sus características botánicas. Ejemplares voucher fueron llevados al Herbario Azuay, de la Escuela de Biología del Medio Ambiente, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay. La clasificación botánica fue realizada por el Blgo. Danilo Minga Ochoa, Curador Herbario Azuay. (Anexo 1)

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1 Obtención de extractos acuosos

Los extractos acuosos se prepararon a partir de frutos previamente seleccionados, descartando aquellos que presentaban lesiones visibles debidas a contaminación microbiana o maltrato post-cosecha. Para preparar los extractos acuosos se pesaron 50 g de pulpa de fruta, picada en aprox. 0,5 cm. Estas porciones fueron mezcladas con 100 ml de agua destilada y licuadas por 30 segundos. La solución obtenida se colocó en tubos cónicos de



15 ml y se procedió a centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se recogió el sobrenadante de la solución y se colocó cada extracto acuoso en tubos eppendorf de 1,5 ml, debidamente etiquetados. Se conservaron las muestras en congelación (-16 a -18° C) para las posteriores pruebas de ensayo (López et al., 2014).

2.4.2 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa

El ensayo de inhibición de α -glucosidasa se basa en la liberación de una molécula de p-nitrofenol como producto del sustrato utilizado p-nitrofenil α -D-glucósido en presencia de la enzima α -glucosidasa. Se realizaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 400 nm y una temperatura de 37 °C (Naik & Kokil, 2013).

El principio químico del método es el siguiente:



2.4.2.1 Procedimiento

La cuantificación de la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa se realizó a partir de la técnica planteada por Matsui et al., (1996) y Komatsu et al., (2013). La solución de la enzima fue elaborada con 5,7 U por ensayo, en 3,22 ml de volumen de agua destilada fría, sabiendo que una unidad de α -glucosidasa libera 1 mol de α -D-glucosa y p-nitrofenil (PNP) a partir de p-nitrofenil α -D-glucosidasa (PNP-G), por minuto a un pH de 6,8 y a 37 °C (Matsui et al., 1996; Komatsu et al., 2013).

En este bioensayo se empleó una microplaca de 96 pocillos con una capacidad máxima de 300 μ l: 5 μ l de la solución enzimática fueron añadidos a 5 μ l de inhibidor (muestra), conservándose luego a una temperatura de 37°C por 5 minutos para alcanzar el equilibrio. La reacción química se dio inicio al agregar 140 μ l de p-nitrofenil α -D-glucosidasa (PNP-G) (0,914 mM en 2500 μ l de PBS 67 mM). Toda la solución fue incubada a 37°C por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de la muestra, se agregó a cada microplaca 150 μ l de solución TRIS (0,5 M) para detener por completo la reacción química. El volumen final de los pocillos fue 300 μ l. Esta microplaca posteriormente fue transferido a un espectrofotómetro lector de microplacas EPOCH. Las absorbancias fueron registradas a una longitud de onda de 400 nm (Matsui et al., 1996; Sarango, 2009).



Tabla 9: Esquema para la determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa.

Ensayo de inhibición de α -glucosidasa				
Soluciones	Muestra	Blanco	Control 1	Control 2
INHIBIDOR	5 μ l	5 μ l	-	-
ENZIMA	5 μ l	-	5 μ l	-
H2O	-	5 μ l	5 μ l	10 μ l
Mezclar e incubar a 37°C por 5 minutos				
SUSTRATO	140 μ l	140 μ l	140 μ l	140 μ l
Mezclar e incubar a 37°C por 15 minutos				
TRIS	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
Mezclar y realizar la lectura en el espectrofotómetro a 400 nm				

Fuente: (Matsui et al,1996; Sarango, 2009).

Tabla 10: Distribución de las muestras en la microplaca para evaluar la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, controles positivo y negativo.

	Mercado 12 de Abril			Mercado 10 de Agosto			Mercado 9 de Octubre			Control Positivo		Control Negativo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Physalis peruviana	A	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Light Purple	White	Light Green
	B	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Light Purple	White	Light Green
	C	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Dark Purple	Light Purple	White	Light Green
Solanum betacea	D	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Purple	White	Light Green
	E	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Purple	White	Light Green
	F	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Purple	White	Light Green
Malus communis	G	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Light Purple	White	Light Green
	H	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Light Purple	White	Light Green

La actividad inhibitoria (INH) Fuente: Autores sado en porcentaje (%), se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:



$$\%INH = 100 \left\{ 1 - \left(\frac{B - D}{A - C} \right) \right\}$$

Dónde:

B: absorbancia de la muestra.

D: absorbancia del blanco sin enzima.

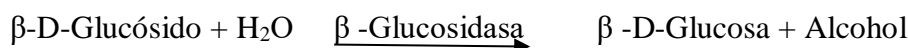
A: absorbancia del control 1 sin inhibidor

C: absorbancia del control 2 sin inhibidor y sin enzima. (Matsui et al., 1996; Komatsu et al., 2013).

2.4.3 Ensayos de inhibición de la enzima β -glucosidasa

El ensayo de inhibición de la enzima β -glucosidasa se basa en la liberación de una molécula de β -D-glucosa + alcohol como producto, del sustrato utilizado; p-nitrofenil β -D-glucósido en presencia de la enzima β -glucosidasa. Se realizaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 410 nm (Sánchez et al., 2001).

El principio químico del método es el siguiente:



2.4.3.1 Procedimiento

Previa preparación de la muestra, la cuantificación de la actividad inhibidora de la enzima β -glucosidasa se realizó a partir de la técnica planteada por Sánchez et al., (2001), sabiendo que una unidad de enzima β -glucosidasa deja en libertad 1 mol de β -D-glucosa más 1 alcohol, a partir de una molécula de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido de sustrato, a pH igual a 5, y al 37 °C. En este bioensayo se empleó una microplaca de 96 pocillos con una capacidad máxima de 300 ul. Se adicionó a los pocillos: 50 ul de sustrato (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, Sigma Chemical Co., 2 mg/ml), 25 ul de muestra y 25 ul de solución tampón pH 5, y se incubó a una temperatura de 37 °C durante 10 minutos, posteriormente se



añadieron 25 ul de solución de enzima (β -glucosidasa Sigma Chemical Co., 20 mg/ml). Toda la mezcla se incubó durante 30 minutos adicionales, a una temperatura de 37 °C. Después de este lapso de tiempo se detuvo la reacción al agregar 175ul de solución tampón pH 10, dando como resultado un volumen final de 300 ul. En caso del control positivo, se adicionó una mezcla de solventes en lugar del extracto, en cuanto que, en el control negativo, se adicionó solución tampón pH 10 en el inicio de la prueba con el fin de bloquear la actividad de la enzima (Sánchez et al, 2001).

Tabla 11: Esquema utilizado en la determinación de la actividad inhibitoria d la enzima β -glucosidasa.

Ensayo de inhibición de β-glucosidasa			
Solución	Muestra	Control positivo	Control negativo
Sustrato	30 ul	30 ul	30 ul
Muestra	15 ul	-	15 ul
Búfer pH 5	30 ul	30 ul	30 ul
Solventes	-	15 ul	-
Incubar por 10 minutos a 37 °C			
Enzima	15ul	15 ul	15 ul
Búfer pH 10	-	-	210 ul
Incubar por 30 minutos a 37 °C			Final de la reacción
Búfer pH 10	210ul	210ul	
Mezclar y leer en el espectrofotómetro a 410 nm			

Fuente: (Sánchez et al, 2001).



Tabla 12: Ubicación de las muestras en la microplaca para evaluar la actividad inhibitoria de la enzima β -glucosidasa y los controles positivo y negativo.

		Mercado 12 de Abril			Mercado 10 de Agosto			Mercado 9 de Octubre			Control Positivo		Control Negativo
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Physalis peruviana	A												
	B												
	C												
Solanum betacea	D												
	E												
	F												
Malus communis	G												
	H												

Fuente: Autores.

2.4.3.2 Cálculo de la actividad inhibitoria de β -glucosidasa.

La actividad inhibitoria se calculó usando la siguiente ecuación: (Sánchez et al., 2001)

$$\% \text{ inhibicion enzimatica} = 100 - \left[\frac{\text{Abs test} - \text{Abs negativa control}}{\text{Abs positivo control}} \times 100 \right]$$

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS:

Los datos fueron organizados en una hoja de cálculo, utilizando el software Microsoft office con el programa Excel ®. Se realizó un análisis descriptivo para cada fruta y para cada mercado en estudio. Para evaluar posibles diferencias de actividad inhibitoria de cada fruto en relación a sus tres lugares de expendio, se realizó un análisis de varianza de una sola vía, para el efecto se utilizó el subprograma Análisis de Datos de Excel ®.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Actividad inhibitoria del extracto acuoso de los frutos en estudio sobre las enzimas α y β glucosidasa.

Los resultados de los ensayos de inhibición de las enzimas α y β glucosidasas en extractos acuosos de los frutos de las tres especies vegetales se muestran de manera general en la Tabla 13.

Se observa que los tres frutos presentaron en mayor o menor grado acción inhibitoria sobre estas enzimas, lo cual proporciona evidencias para dar apoyo a la hipótesis sobre la que se basó la presente investigación. Es decir, que se demuestra que en los extractos de los frutos de las especies *Malus communis*, *Solanum betaceum* y *Physalis peruviana*, provenientes de la región de la Sierra Sur Ecuatoriana, existen propiedades que inhiben la acción de las enzimas α y β glucosidasas.

En la Tabla 13 igualmente se observa que hubo relativamente poca variación entre las muestras de cada fruto provenientes de los tres centros de comercialización. Para *Malus communis* (manzana) la actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasas ocurrió en un rango de 34,01–36,11%, mientras que su acción sobre la enzima β -glucosidasa fue entre 34,74% y 36,09%. Para *Solanum betaceum* (tomate de árbol), la actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa estuvo en un rango de valores más altos (46,35–48,04%), en tanto que, para β -glucosidasa los valores estuvieron entre 56,04% y 59,02%. Por su parte para la uvilla (*Physalis peruviana*), la actividad inhibitoria sobre estas enzimas se presentó en niveles mayores, pero igualmente en un rango estrecho: 64,89–66,74% para la enzima α -glucosidasa, y 69,36–69,97% para la β -glucosidasa. Esta relativa poca variación en la actividad inhibitoria dentro de cada fruto hace presumir que las muestras respectivas, adquiridas en sitios diferentes de la ciudad de Cuenca, provienen de la misma variedad, entre las distintas variedades de estas especies vegetales que se cultivan en la Sierra Sur Ecuatoriana (Barriga, 2010; Mera, 2013; Zak, 2016).

Tabla 13: Actividad inhibitoria de las enzimas α y β glucosidasa presentes en los frutos de *Malus communis*, *Solanum betaceum* y *Physalis peruviana*, obtenidos en tres lugares de comercialización..

Frutos	Lugar de comercialización	Actividad inhibitoria (%)*	
		α -glucosidasa n=16	β -glucosidasa n=16
<i>Physalis peruviana</i> (Uvilla)	Mercado 12 de Abril (M1)	64,89 \pm 2.04	69,36 \pm 1.62
	Mercado 10 de Agosto (M2)	66,74 \pm 2.04	69.47 \pm 2.14
	Mercado 9 de Octubre (M3)	65,46 \pm 2.49	67.97 \pm 1.70
<i>Solanum betaceum</i> (Tomate de árbol)	Mercado 12 de Abril (M1)	47,81 \pm 2.77	59,02 \pm 3.62
	Mercado 10 de Agosto (M2)	46,35 \pm 2.08	58,42 \pm 4.33
	Mercado 9 de Octubre (M3)	48,04 \pm 1.45	56,04 \pm 3.27
<i>Malus communis</i> (Manzana)	Mercado 12 de Abril (M1)	35,39 \pm 1.87	36,09 \pm 1.63
	Mercado 10 de Agosto (M2)	36,11 \pm 2.27	35,74 \pm 1.84
	Mercado 9 de Octubre (M3)	34,01 \pm 3.13	34,74 \pm 1.80

* Promedio de 16 repeticiones, en tres ensayos independientes y desviación estándar
Fuente: Autores.

Los valores de actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa encontrados para *Physalis peruviana* en promedio fue de 65,70%, (Tabla 14) con lo que se demuestra una actividad inhibitoria parecida a la encontrada por Rey (2013) para el mismo fruto y la misma enzima, quien afirma: que el extracto de *P. peruviana* ejerce un efecto inhibitor sobre la enzima α -glucosidasa. De igual forma, resultados muy cercanos a los aquí encontrados, tanto para la enzima α -glucosidasa (65,70%) como para la enzima β -glucosidasa (68,89%), fueron dados por Moncayo (2014): 64,5% para la enzima α -glucosidasa; y de 62,8% para la enzima



β -glucosidasa. Estos valores el autor lo calificó en general como una actividad inhibitoria promisorio en este fruto (Moncayo, 2014).

Tabla 14 Resumen de promedios de actividad inhibitoria de los frutos de *M. communis*, *S. betaceum* y *P. peruviana* sobre las enzimas α y β glucosidasa.

FRUTAS DE ESTUDIO	ACTIVIDAD INHIBITORIA	
	α -glucosidasa n=3	β -glucosidasa n=3
<i>Physalis peruviana</i>	65,70 %	68,89 %
<i>Solanum betaceum</i>	47,4 %	57,83 %
<i>Malus communis</i>	35,17 %	35,52 %

Fuente: Autores.

Rey et al.,(2015) basándose en sus resultados sugirieron que: “la inhibición de carbohidrasas intestinales es uno de los modos de acción de los frutos de *P. peruviana* como agente inhibitorio de carbohidrasas intestinales que pueden contribuir con el retraso y prolongamiento en el tiempo de la digestión de los carbohidratos” (p. 73). Otros estudios farmacológicos, realizados en animales, también demostraron la acción inhibitoria de extractos de frutos de *P. peruviana* (Rodríguez y Rodríguez, 2007; Avellaneda, 2013).

Los resultados de la presente investigación contribuyen por lo tanto a destacar la importancia que tendrían los extractos del fruto de *P. peruviana* dado el alto porcentaje de inhibición (> 60%) que dicho fruto tuvo sobre las dos enzimas estudiadas (Rey, 2015).

En la Universidad Nacional de Colombia, Mora (2008) demostró experimentalmente la actividad antioxidante que tienen los extractos de los frutos de *P. peruviana*. Este trabajo de Mora (2008), según lo afirma Rey (2013), contribuyó de manera importante al conocimiento sobre las propiedades antioxidantes de los frutos de esta especie.



El potencial inhibitorio evidenciado en este estudio para los frutos de las tres especies estudiadas, especialmente para *Physalis peruviana*, podría atribuirse a su alto contenido de antioxidantes, entre los cuales los más importantes son fenólicos y flavonoides, que han sido claramente detectados en esta especie (Douglas, 2011; Medina, 2012).

Los antioxidantes presentan importantes propiedades, ya que son capaces de mitigar el daño causado por los radicales libres (Rodríguez y Rodríguez, 2007), los cuales son considerados como la causa fundamental de diferentes enfermedades (Venereo, 2002; Rodríguez y Rodríguez, 2007).

Un estudio realizado por Rodríguez y Rodríguez (2007): reporto que el consumo de frutos de *Physalis peruviana*, pueden contribuir con el retraso y prolongamiento en el tiempo de la digestión de los carbohidratos a nivel intestinal, atribuyendo su actividad biológica a su elevado contenido de flavonoides.

La inhibición de la enzima α -glucosidasa por flavonoides fue particularmente reportada por Kumar, Shah, Ghosh, & Pal, (2013), quienes demostraron la actividad inhibitoria de seis grupos de flavonoides.

Los compuestos fenólicos igualmente desempeñan un papel importante en la inhibición de enzimas como α glucosidasa y α amilasa (Rey, 2013). Según lo reseña este autor, en un estudio realizado en ratas se demostró que un extracto de *Centratherum anthelminticum* (L.), enriquecido en polifenoles (conteniendo compuestos fenólicos y flavonoides como ácido gálico, ácido cafeíco, ácido elágico, ácido ferúlico, quercetina y caempferol), inhibió significativamente las enzimas glucosidasas intestinal. Estos hallazgos, según lo afirma Rey (2013), también fueron observados en otros estudios para otros compuestos polifenólicos.

La presencia de alcaloides en extractos de *P. peruviana* también fue demostrada por Medina (2012), quien además proporciona evidencias en su revisión bibliográfica de que estos compuestos presentan una potente actividad inhibitoria sobre la enzima β -glucosidasa.

Para la especie *Solanum betaceum* (tomate de árbol), no se tienen datos precisos sobre su potencial como inhibidor de las enzimas α y β glucosidasa. Sin embargo, es sabido que el fruto de esta especie se caracteriza por su alto contenido de compuestos antioxidantes como:



antocianinas, compuestos fenólicos, vitamina A, vitamina C, carotenoides, etc., cuyo consumo está relacionado con un menor riesgo de sufrir enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Mertz et al., 2010; Ávila y Ruales, 2016).

Salazar (2016), en un estudio realizado en Ecuador, evaluó el efecto de la ingesta de jugo de tomate de árbol sobre diversos parámetros bioquímicos y nutricionales. Sus resultados demostraron que los valores hipoglucémicos disminuyeron de forma significativa después de ingerir el jugo. Basándose en estos resultados, el autor sugirió que el consumo por seis semanas de jugo de tomate de árbol, contribuyó con el retraso y prolongamiento en el tiempo de la digestión de los carbohidratos a nivel intestinal, indicando que posee inhibidores de carbohidrasas intestinales, demostrando que *C. betacea* es uno de los frutos andinos con un alto potencial nutracéutico.

Es importante advertir que Salazar, (2016) refieren al tomate de árbol como *Cyphomandra betacea*, que corresponde con una sinonimia para la especie, la cual anteriormente se ubicaba en el género *Cyphomandra*, pero luego fue trasladada al género *Solanum*.

Otro dato importante es que en el estudio realizado por Ávila y Ruales (2016) se evidenció que los frutos de esta especie presentan un alto contenido de polifenoles (expresados como equivalente de ácido gálico), los cuales, según se señaló anteriormente, tienen capacidad inhibitoria sobre las enzimas glucosidasas.

En cuanto a *Malus communis*, se ha evidenciado que su consumo provoca una mejoría en la mayoría de los trastornos metabólicos (Cestari et al., 2002; Chen, Xie, Shao, & Chen, 2012). Se ha demostrado también dichos frutos poseen alto contenido de floretina, lo cual es un tipo de fenol natural y que esto a su vez actúa de forma inhibitoria sobre las enzimas glucosidasas (Francini & Sebastiani, 2013).

Igualmente, se ha reportado que esta especie tiene un efecto en el retraso y prolongamiento en el tiempo de la digestión de los carbohidratos a nivel intestinal, por lo tanto, es posible



que *Malus communis* posea propiedades inhibitorias importantes de estas enzimas en sus frutos (Ahmad, Aslam, & Sheikh, 2014).

Cabe destacar que en los extractos de otra especie de manzana (*Malus domestica*), se ha encontrado alto contenido de flavonoides y de polifenoles, sugiriéndose además sus propiedades preventivas del estrés oxidativo, antiinflamatorias, antitumorales y antialérgicas (Navarro-Hoyos et al., 2017). Por tratarse de especies congéneres, y por lo tanto muy cercanas filogenéticamente, es posible por lo tanto que *Malus communis* también posea compuestos antioxidantes con propiedades inhibitorias importantes en sus frutos, al igual que lo sugirieron Ahmad, Aslam, & Sheikh (2014) para *Malus doméstica*.

3.3 Comparación de la actividad inhibitoria de los tres frutos estudiados para los tres sitios de comercialización.

Para establecer posibles diferencias entre la actividad inhibitoria de las especies en estudio de los frutos, en relación a sus lugares de comercialización, se realizó un análisis de varianza a una vía (ANOVA). La hipótesis nula planteó que no existen diferencias significativas entre la bioactividad de los frutos, en relación a su lugar de acopio. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12

Este análisis estadístico evidenció que, tanto para las tres especies estudiadas, como para las dos enzimas, no hay diferencias significativas en la actividad inhibitoria de los frutos de la misma especie expendidos en los tres sitios de comercialización ($p \geq 0,05$). Las muestras de los frutos de las tres especies adquiridas en tres mercados distintos presentaron el mismo comportamiento en cuanto a su actividad inhibitoria. Estos resultados sugieren que para cada especie la muestra analizada fue homogénea y no hubo variabilidad dentro de la misma e indican que los frutos adquiridos en los distintos centros de comercialización provienen de la misma variedad y del mismo cultivar.



Tabla 15: ANOVA a una vía de la actividad inhibitoria de enzimas α y β glucosidasa de los frutos en estudio, en relación a su lugar de acopio

α glucosidasa (n:16)						
Fruto	Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	de Cuadrados Promedio	Estadístico F	Valor p	
<i>Physalis peruviana</i>	Entre grupos	28.76	14.38	2.96	0.062	
	Intra grupos	218.60	4.85			
<i>Solanum betaceum</i>	Entre grupos	26.87	13.44	2.85	0.068	
	Intra grupos	212.05	4.71			
<i>Malus communis</i>	Entre grupos	36.53	18.26	2.96	0.062	
	Intra grupos	277.66	6.17			
β glucosidasa (n:16)						
<i>Physalis peruviana</i>	Entre grupos	18.48	9.24	2.67	0.08	
	Intra grupos	145.21	3.45			
<i>Solanum betaceum</i>	Entre grupos	79.68	39.84	2.80	0.071	
	Intra grupos	640.09	14.22			
<i>Malus communis</i>	Entre grupos	15.80	7.90	2.53	0.09	
	Intra grupos	140.00	3.11			

* Valor crítico de F = 3.20 (0.05, 2, 45) Fuente: autores



CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo de investigación nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- La evaluación del potencial de los frutos en estudio como posibles inhibidores de las enzimas α y β glucosidasa evidenció una importante actividad inhibitoria de sus extractos acuosos sobre estas enzimas, sugiriendo la presencia de metabolitos de interés terapéutico en la industria farmacéutica.
- El fruto que presentó mayor actividad frente a las enzimas α y β glucosidasa fue *Physalis peruviana*, el que presentó una actividad intermedia, *Solanum betaceum*, mientras que *Malus communis*, es el fruto que presentó menor actividad inhibitoria sobre estas enzimas.
- Los valores obtenidos del porcentaje de inhibición para el caso de α -glucosidasa son: para *Physalis peruviana* (65,70%), *Solanum betaceum* (47,40) y *Malus communis* (34,17%); estos resultados nos sugieren, que estos frutos podrían ser recomendados en una alimentación, debido a que presenta compuestos antioxidantes (polifenoles) de interés reportados en la literatura .
- El presente trabajo de investigación constituye un aporte al conocimiento del potencial inhibitorio de las especies *Physalis peruviana*, *Solanum betaceum* y *Malus communis*, sobre las enzimas α y β glucosidasa generando información relevante sobre la bioactividad de cada uno de los frutos y constituyendo un medio de apoyo para futuras investigaciones.



RECOMENDACIONES

1. Plantear nuevos estudios fitoquímicos de los frutos de *Malus communis*, *Solanum betaceum* y *Physalis peruviana*, orientados a identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria observada en el presente trabajo.
2. Estudiar nuevas especies vegetales usadas en la medicina tradicional como inhibidores enzimáticos, a fin de potenciar el aprovechamiento y el desarrollo sustentable de los recursos naturales en beneficio de la salud y el bienestar de la población.



BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, P. (2011). Caracterización morfológica y molecular de tomate de árbol, *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae). Recuperado de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1174/1/T-SENESCYT-000302.pdf>
- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., & Meza, V. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13(2), 16. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Ahmad, R., Aslam, N., & Sheikh, A. (2014). *Malus communis* as an Inhibitor of Glycation. *Scholars Academic Journal of BiosciencesOnline) Sch. Acad. J. Biosci*, 2(1), 2321–68831. Recuperado de www.saspublisher.com
- Alamino, D. A. (2011). Características agronômicas de *Physalis peruviana* producida por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos. Recuperado de <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/234>
- American Diabetes Association. (2011). Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*, 34 Suppl 1(Supplement 1), S11-61. <https://doi.org/10.2337/dc11-S011>
- Avellaneda, I. (2013). Evaluación de la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa in vitro por extractos vegetales. Recuperado de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3825>
- Balan, K., Ratha, P., Prakash, G., Viswanathamurthi, P., Adisakwattana, S & Palvannan, T. (2017). Evaluation of invitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(5), 732–738. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2014.07.002>
- Bernal, H & Correa, J. (1998). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. (Guadalupe, Ed.). Bogotá, Colombia: Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello. Recuperado de https://books.google.com.ec/books/about/Especies_vegetales_promisorias_de_los_pa.html



- Bernal Rodríguez, C (2012). Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9016/1/192546.2012.pdf>
- Bustos Rocio. (2009). Mecanismos moleculares del efecto hipoglucemiante de plantas usadas tradicionalmente como antidiabéticos. Recuperado de <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/698/3/TMIPICYTZ3M42009.pdf>
- Cestari, A., Vieira, E., Nascimento, A., Santos Filha, M & Airoidi, C. (2002). Factorial Design Evaluation of Some Experimental Factors for Phenols Oxidation using Crude Extracts from Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(2), 260–265. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000200019>
- Chen, W., Xie, T., Shao, Y & Chen, F. (2012). Phylogenomic Relationships between Amylolytic Enzymes from 85 Strains of Fungi. *plos one*, 7(11), e49679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049679>
- Dembinska, A., Mykkänen, O., Kiec, B & Mykkänen, H. (2008). Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 99(E-S1), ES109-117. <https://doi.org/10.1017/S000711450896579X>
- Escalona, J. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* como premisa para su introducción en la medicina complementaria. Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales. Recuperado de https://books.google.com.ec/books/about/Evaluación_de_la_actividad_antioxidante.html?id=HmojnQAACAAJ&redir_esc=y
- Francini, A & Sebastiani, L. (2013). Phenolic Compounds in Apple (*Malus communis*): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 2(3), 181–193.



<https://doi.org/10.3390/antiox2030181>

- Franco, L., Matiz, G., Calle, J., Pinzón, R & Ospina, L. (2007). Antiinflammatory activity of extracts and fractions obtained from *Physalis peruviana* calyces. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 27(1), 110–115. <https://doi.org/S0120-41572007000100010>
- Garzón, G. (2008). Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds, 13, 27–36. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n3/v13n3a2.pdf>
- Herbario Azuay. (2018). Identificación taxonómica de los frutos en estudio: *Malus communis* (manzana), *Solanum betaceum* (tomate de árbol) y *Physalis peruviana* (uvilla), Universidad del Azuay.
- Hidalgo, R., Ugarte, M., Escalera, D., Rojas, P., Moya, V., Delgado, P & Mamani, C. (2016). Apple (*Malus Communis*) Health Benefits. *Revista Bolivianas de Investigación e Información En Salud*, 11. Recuperado de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2075-61942016000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Isla, P. (2012). Chronic complications of diabetes mellitus. Recommendations from the American Diabetes Association 2011. Prevention and management. *Revista de Enfermería (Barcelona, Spain)*, 35(9), 46–52. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066569>
- Komatsu, T., Hanaoka, K., Adibekian, A., Yoshioka, K., Terai, T., Ueno, T & Nagano, T. (2013). Diced Electrophoresis Gel Assay for Screening Enzymes with Specified Activities. *Journal of the American Chemical Society*, 135(16), 6002–6005. <https://doi.org/10.1021/ja401792d>
- Kou, M; Yen, J; Hong, J; Wang, C; Lin, C & Wu, M. (2009). *Cyphomandra betacea* Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 458–463. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2008.09.010>



- Krentz, A & Bailey, C. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65(3), 385–411. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15669880>
- Kumar, D., Shah, V., Ghosh, R., & Pal, B. C. (2013). A new triterpenoid saponin from *Glinus oppositifolius* with α -glucosidase inhibitory activity. *Natural Product Research*, 27(7), 624–630. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.686907>
- Kuntz, D., Tarling, C., Withers, S & Rose, D. (2008). Structural Analysis of Golgi α -Mannosidase II Inhibitors Identified from a Focused Glycosidase Inhibitor Screen. *Biochemistry*, 47(38), 10058–10068. <https://doi.org/10.1021/bi8010785>
- Lebovitz, H. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 26(3), 539–551. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70266-8](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70266-8)
- Li, H., Zhou, P., Yang, Q., Shen, Y., Deng, J., Li, L., & Zhao, D. (2011). Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* ‘edulis’ and *Passiflora edulis* ‘flavicarpa.’ *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 1085–1090. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.039>
- Lieberman, M., Marks, A., & Peet, A. (2017). *Bioquímica médica básica : un enfoque clínico*. Madrid: Lippincott Williams & Wilkins. Recuperado de <http://www.worldcat.org/title/bioquimica-medica-basica-un-enfoque-clinico-4a-edicion/oclc/892217854>
- Lock, O., & Rojas, R. (2005). Química y Farmacología de *Physalis peruviana* L. (‘Aguaymanto’). *Revista de Química*, 19(2), 65–70. Recuperado de <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/18733>
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., & Jameson, J (2012). *Harrison’s principles of internal medicine*. (J. L. A. S. F. D. L. K. S. L. H. J. Larry Jameson, Ed.). McGraw-Hill. Recuperado de <https://www.casadellibro.com/libro-harrison-s-principles-of-internal-medicine-18th-edition/9780071748896/2372613>



- López, L., Cisneros, L., & Dublán, O. (2014). Actividad antioxidante e inhibidora de a-glucosidasa y a-amilasa de tres variedades de cebolla. *Nova Scientia (México) Num.12 Vol.6*. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/40161>
- Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., & Osajima, Y. (1996). In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(12), 2019–2022. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.2019>
- Medina, D. (2012). Implementación de una metodología para la obtención de marcadores de frutos de *Physalis peruviana L.*, y evaluación de actividad hipoglicemiante. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/11056950.pdf>
- Medina, J., Aviña, G., & García, J. (2007). Revisión de flavonoides identificados en el género *Physalis* (Solanaceae), su capacidad antioxidante e importancia como marcadores químicos. *Centro Interdisciplinario de Investigación Para El Desarrollo Integral Regional*, 12, 16–23. Recuperado de https://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol12num1/nyd_vol12_num1_2014_art2.pdf
- Mertz, C., Brat, P., Caris-Veyrat, C., & Gunata, Z. (2010). Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum Cav.*). *Food Chemistry*, 119(2), 653–659. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.009>
- Moncayo, A. (2014). Evaluación del potencial inhibidor de las enzimas glucosidasa en algunos frutos nativos del Ecuador. Recuperado de <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/3605>
- Mora, A. (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 Colombia., Magister en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia.
- Naik, S., & Kokil, G. (2013). Development and Discovery Avenues in Bioactive Natural Products for Glycemic Novel Therapeutics. *Studies in Natural Products Chemistry*, 39, 431–466. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62615-8.00012-6>



- Rey, D., Ospina, L., & Aragón, D. (2015). Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 44(1), 72–89. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n1.54281>
- Rey D. (2013). Evaluación in vitro del efecto de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/58053/1/1014182296.2014.pdf>
- Robles, J., & Hashimoto, J. (2006). Tomate de arbol (*Cyphomandra betacea*), 6–8. Recuperado de <http://www.regionlalibertad.gob.pe/web/opciones/pdfs/Manual de Tomate de árbol.pdf>
- Rodriguez, S., & Rodriguez, E. (2007). Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. *Rev. Med. Vallejana*, 43–53. Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n1/pdf/a05v4n1.pdf>
- Rojas, E., Molina, R., & Rodríguez, C. (2012). Revista venezolana de endocrinología y metabolismo. Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus (Vol. 10). Sociedad Venezolana de Endocrinología y Metabolismo. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102012000400003
- Rosero, L. (2014). Rescate de germoplasma de manzana emilia (*Malus Communis*) mediante cultivo de tejidos in vitro. Universidad central del Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3244/1/T-UCE-0004-101.pdf>
- Salazar, R. (2016). Efecto del consumo de jugo de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) sobre el perfil lipídico y las concentraciones de glucosa en adultos con hiperlipidemia, Ecuador. *Revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 121–128. Recuperado de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/3970>
- Salcedo, E., Arvizu, M., Vargas, J., Vargas, O., Bernabe, A., & Barrientos, L. (2015). Contenido mineral y tamizaje fitoquímico en *Physalis peruviana*. en condiciones de desarrollo Mineral content and phytochemical compounds in *Physalis peruviana* Lam.



- on two conditions of vegetal growth. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6, 58–73. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n28/v6n28a5.pdf>
- Sánchez, A., García, K., May, F., & Peña, L. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8(2), 144–151. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00020>
- Sarango, V. (2009). Determinación de la actividad antidiabética de los extractos totales de nueve especies vegetales nativas del sur del Ecuador Recuperado de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1856>
- Silva, M. (2014). Apple *Pyrus malus*. Recuperado de http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/plataforma_conocimiento/alimentos/fichas_de_alimentos/frutas/manzana.pdf
- Simões-Pires, C. A., Hmicha, B., Marston, A., & Hostettmann, K. (1990). A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts. *Phytochemical Analysis*, 20(6), 511–515. <https://doi.org/10.1002/pca.1154>
- Van de Laar, F., Lucassen, P., Akkermans, R., Van de Lisdonk, E., Rutten, G & Van Weel, C. (2005). Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003639.pub2>
- Villena, M. (2006). Estudio de la actividad β -glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. Universidad de Castilla La Mancha. Recuperado de https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/947/214_Estudio_de_la_actividad_beta-glucosidásica.pdf?sequence=1

ANEXOS

ANEXO 1: IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS FRUTOS EN ESTUDIO
POR PARTE DE LA UNIVERSIDAD DE AZUAY “HERBARIO AZUAY”

Cuenca, 08 de marzo de 2018

Por petición de la parte interesada:

Yo, **Danilo Minga Ochoa** curador del Herbario Azuay de la Universidad del Azuay,
luego de haber revisado el material botánico traído por su persona

CERTIFICO

Que el material botánico corresponde a los siguientes taxones:

Especie: ***Malus communis*** Desf
FAMILIA: ROSACEAE
ORDEN: ROSALESEspecie: ***Solanum betaceum*** Cav.
FAMILIA: SOLANACEAE
ORDEN: SOLANALESEspecie: ***Physalis peruviana*** L.
FAMILIA: SOLANACEAE
ORDEN: SOLANALESHerbario
Azuay

Atentamente,



Biólogo Danilo Minga Ochoa MSc.

Curador Herbario Azuay (HA)

Universidad del Azuay

Av. 24 de mayo 7-77

Cuenca, Ecuador

Tel. 07-4091000 ext. 443

E-mail: dminga@uazuay.edu.ec<http://uazuay.edu.ec/HerbarioAzuay/>



ANEXO 2: PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA β -GLUCOSIDASA

Para realizar los bioensayos se procedió a preparar los siguientes reactivos, basándose en la literatura de (Sarango, 2009; Moncayo, 2014):

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

Se preparó 100 ml de solución. Se pesaron 4.10 g de acetato de sodio y se aforó de forma paulatina a 100ml de agua destilada. Posteriormente se procedió a medir el pH en el pH-metro y en caso de ser necesario se ajusta el pH a 5.0 en 37°C con una solución 1 M HCl.

Solución tampón amoníaco pH 10 (20°C)

Se preparó 100 ml de solución. Se pesaron 6,75 g de NH_4Cl en 57 ml de Amoníaco concentrado y se afora se forma paulatina en 100ml de agua destilada. Posteriormente se procedió a medir el pH en el pH-metro y en caso de ser necesario se ajusta el pH a 10 en 37°C.

1% (p/v) de solución SDS

Se preparó 100 ml de solución. Se pesaron 1 g de dodecilsulfato sódico (SDS) en 100 y se aforo de forma paulatina en 100ml de agua destilada.

Solución de sustrato p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, 2mg/ml

Se preparó en 5 ml de solución; se pesaron 10 mg de sustrato p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside con en 5ml agua destilada. Al culminar cada ensayo la solución de salicina es refrigerada a 4°C para evitar la degradación del reactivo.

Solución de enzima β -glucosidasa

Se preparó una solución de 2.5 ml. Se pesaron 50 mg de la enzima β -glucosidasa en 2.5 ml agua destilada. Después de finalizar cada ensayo, la enzima se mantiene en congelación.



ANEXO 3: MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE INHIBICIÓN.

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