



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE
DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS Y FRUTO
DE *Synsepalum dulcificum* EN RATONES (*Mus musculus*) CON
DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA”.

Trabajo de titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: SEGUNDO APOLINARIO BUENO PÉREZ

DIRECTOR: BQF. GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA

RIOBAMBA – ECUADOR

2020

© 2020 Segundo Apolinario Bueno Pérez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho del autor.

Yo, Segundo Apolinario Bueno Pérez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 31 de agosto del 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Segundo Bueno Pérez', is written over a light blue rectangular background.

Segundo Apolinario Bueno Pérez

060497714-0

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; tipo: Trabajo experimental, “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS Y FRUTO DE *Synsepalum dulcificum* EN RATONES (*Mus musculus*) CON DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA”., realizado por el señor: SEGUNDO APOLINARIO BUENO PÉREZ, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FECHA	FIRMA
Licda. Karen Lisseth Acosta León., M.Sc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: KAREN LISSETH	2020-08-31
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla., M.Sc. DIRECCOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 Firmado electrónicamente por: GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA	2020-08-31
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia., M.Sc. DELEGADO DEL DECANO	 Firmado electrónicamente por: DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA	2020-08-31

DEDICATORIA

A mis padres, María Lucinda Pérez y Segundo José Bueno por su apoyo incondicional y sus consejos durante el transcurso de esta etapa académica permitieron brindarme el aliento necesario para la culminación de mi carrera llegando a convertirme en Bioquímico Farmacéutico.

Para mis hermanos Francisca, Alfonso, Enrique por estar ahí a mi lado en los momentos de dificultad.

A mi madrina Norma Arellano gracias a sus consejos de sabiduría que siempre me ha estado brindando su apoyo absoluta para seguir avanzado en mis objetivos y metas.

Segundo B.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por hacer posible que cada escalón haya sido alcanzado, por darme sabiduría en los momentos de angustia y fuerza inquebrantable en las noches de desvelo.

A mis padres por ser el pilar fundamental en mi formación tanto educativo como de vida y a mis hermanos por ser mi fuerza e inspiración para que este sueño hoy sea una realidad. Por haber sido el cimiento para la construcción de mi vida profesional, inculcando responsabilidad y deseos de superación, por su amor de familia que ha sido mi soporte.

A Isabelita, Adelita, Cecilita, Osquítar, Dieguito por su gran cariño y amor que me brindaron ayuda siempre y estar ahí en los momentos difíciles.

A la BQF. Gisela Pilco por el gran apoyo y aporte brindado en la elaboración del presente trabajo de titulación, su paciencia y conocimientos han sido indispensable; además por enseñarnos a no limitarnos y seguir adelante.

Un agradecimiento especial al BQF Diego Vinueza por haber colaborado en el presente estudio a través de su amplio conocimiento de ser un excelente maestro sobre todo investigador.

A mis amigos Carmita, Kathy, Dennys, Jenny por estar ahí siempre en las buenas y en las malas ayudando en cada momento.

A mi alma Máter. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a la Escuela de bioquímica y farmacia, por haber sido un segundo hogar donde conocí a personas incomparables y docentes que impartieron su conocimiento para contribuir con mi formación profesional.

Segundo B.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE GRÁFICOS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
SUMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	
xvii	
Planteamiento del problema.....	1
Justificación del estudio	2
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Marco conceptual	6
1.2.1. Especie en estudio	6
1.2.2. Clasificación taxonómica	6
1.2.3. Familia Sapotaceae	7
1.2.4. Género <i>Synsepalum</i>	7
1.2.5. Descripción botánica	8
1.2.6. Propiedades medicinales.....	9
1.3. Composición química de la fruta (<i>synsepalum dulcificum</i>)	9
1.3.1. Composición química	9
1.3.2. Composición aminoácidica	10
1.3.3. Composición mineral en las hojas de la fruta milagrosa	11
1.4. Distribución Geográfica a nivel mundial.....	12

1.4.1. Localización de los cultivos en Ecuador	13
1.5. Metabolitos secundarios	14
1.5.1. Polifenoles.....	14
1.5.2. Flavonoides	15
1.5.3. Actividad antioxidante.....	16
1.5.4. Actividad biológica.....	17
1.6. Diabetes.....	18
1.6.1. Fisiopatología	19
1.6.2. Diabetes mellitus tipo I (DM-1).....	19
1.6.3. Diabetes mellitus tipo II (DM-2)	19
1.6.4. Tratamiento de la diabetes	23
1.7. Insulina y receptores de la insulina.....	24
1.7.1. Mecanismo de secreción de insulina	25
1.8. Modelo de inducción de diabetes mediante administración de fármacos.....	27
1.8.1. Estreptozotocina.....	28
1.8.2. Alloxano	29
1.9. Acarbosa	30
1.10. Nicotinamida.....	31

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.....	33
2.1. Tipo de investigación	33
2.2. Diseño de la investigación.....	33
2.2.1. Diseño experimental de diabetes mellitus tipo 2 (DM-2)	33
2.3. Identificación de variables.....	34
2.3.1. Variables independientes.....	34
2.3.2. Variables dependientes.....	34
2.4. Planteamiento de la hipótesis	34
2.5. Localización del estudio	34
2.5.1. Población del estudio	34
2.5.2. Tamaño de la muestra	35
2.6. Selección de la muestra	36
2.7. Recolección del material vegetal.....	36
2.8. Reactivo biológico	36

2.9. Técnicas de recolección de datos.....	37
2.10. Equipos, materiales y reactivos	37
2.10.1. Equipos.....	37
2.10.2. Materiales	38
2.10.3. Reactivos	39
2.11. Métodos y técnicas	41
2.11.1. Acondicionamiento de la materia vegetal.....	41
2.11.2. Obtención del extracto hidroalcohólico	41
2.11.3. Control de calidad del extracto hidroalcohólico	41
2.11.4. Tamizaje fitoquímico	41
2.11.5. Cromatografía en capa fina (TLC).....	43
2.11.6. Evaluación de la actividad hipoglucemiante	43
2.11.7. Inducción de diabetes en ratones (<i>Mus musculus</i>).....	44
2.11.8. Análisis estadístico	44
CAPÍTULO III	
3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIONES.....	45
3.1. Tamizaje fitoquímico	45
3.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	48
3.3. Actividad hipoglucemiante <i>in vivo</i>	50
3.4. Análisis estadístico	53
3.5. Discusión.....	58
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Composición química nutricional de las bayas de <i>Synsepalum dulcificum</i>	10
Tabla 2-1: Composición de aminoácidos de la fruta <i>Synsepalum dulcificum</i> en porcentajes.	10
Tabla 3-1: Contenido mineral de las hoja de <i>Synsepalum dulcificum</i>	12
Tabla 4-1: Distribución Mundial de la fruta milagrosa	12
Tabla 5-1: Clasificación de hipoglucemiantes y sus mecanismos de acción	23
Tabla 1-2: Distribución de los grupos de estudio según esquema de tratamiento.....	35
Tabla 1-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de hojas de <i>S. dulcificum</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de <i>Syns. dulcificum</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3-3: Compuestos identificados en los extractos de hojas y fruto de <i>Syn. dulcificum</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4-3: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de <i>S. dulcificum</i>	50
Tabla 5-3: Glucosa sanguínea posterior a la administración de los tratamientos.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 6-3: Test de ANOVA para los tratamientos en función del tiempo.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 7-3: Análisis estadístico test de Tukey de la medición 6 (glucosa en horas).....	54
Tabla 8-3: Medias entre tratamientos con diferencias significativas en función del tiempo.....	56
Tabla 9-3: Test de ANOVA para los tratamientos en función de los días de medición	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 10-3: Análisis de medias que son significativamente diferentes en tratamiento días.	¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Concentración de nivel de glucosa en diferentes horas de medición.....	52
Gráfico 2-3: Concentración de niveles de glucosa en diferentes días.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Ilustración botánica de <i>Synsepalum dulcificum</i>	8
Figura 2-1: Estructura dimérica de la miraculina	11
Figura 3-1: Distribución Geográfica a nivel mundial (<i>Synsepalum dulcificum</i>).....	13
Figura 4-1: Ubicación de la fruta milagrosa <i>Synsepalum dulcificum</i> en Ecuador.....	14
Figura 5-1: Estructura de los flavonoides	16
Figura 6-1: Quelación de metales de transición con flavonoides	17
Figura 5-1: Estructura de la Insulina	25
Figura 6-1: Síntesis y liberación de insulina	27
Figura 7-1: Estructura química de la estreptozotocina	28
Figura 9-1: Estructura química de Nicotinamida	31
Figura 1-2: Ensayo a realizar en el extracto etéreo	42
Figura 2-2: Ensayo a realizar en el extracto alcohólico.....	42
Figura 3-2: Ensayo a realizar en el extracto acuoso	43
Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de extractos hidroalcohólicos <i>Synsepalum dulcificum</i> (izquierdo hojas derecho fruto).....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Acondicionamiento del material vegetal

ANEXO B: Tamizaje fitoquímico de *Synsepalum dulcificum* de hojas y fruto

ANEXO C: Preparación de los Extractos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*

ANEXO D: Cromatografía en capa fina de los extractos hidroalcohólicos hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*

ANEXO E: Inducción de la diabetes con administración de Estreptozotocina (STZ) y administración de tratamientos

ANEXO F: Medición de niveles de glucosa

ABREVIATURAS

STZ	Estreptozotocina
ALX	Alloxano
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la salud
WHO	World Health Organization
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
°C	Grados Celsius
BALB/c	Cepa de ratones albinos
DM	Diabetes mellitus
GLUT2	Transportador de glucosa
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
GCK	Glucoquinasa
β	Beta
α	Alfa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad

ECV	Enfermedades Cardiovasculares
ACV	Accidente cerebrovascular
ID	Intestino delgado
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema nervioso simpático
BHE	Barrera Hematoencefálica
OPS	Organización Panamericana de la Salud
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
AOX	Antioxidantes
NO	Óxido Nítrico
kD	Kilo Dalton
mL	Mililitros
mg/dL	Miligramos por decilitros
mg	Miligramos
Rf	Factor de retardo
TLC	Cromatografía en capa fina

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa) en ratones *Mus musculus* con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). Para la obtención de los extractos se dejó macerar el material vegetal en etanol al 70% por 72 horas. Seguido de lo cual se concentró en rotavapor. El análisis *in vivo* se realizó induciendo la diabetes con estreptozotocina de 150 mg/kg. Los animales fueron distribuidos al azar sesenta y tres ratones en nueve grupos de siete animales cada uno, considerando un primer grupo blanco normoglicémicos, el segundo grupo positivo (acarbosa), tercer grupo control negativo estreptozotocina y el cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo y noveno grupo se administró extractos hidroalcohólicos de hojas y fruto de 30 -60 mg/kg respectivamente, se midieron los niveles de glucosa en horas y en días después de la administración de los tratamientos; posteriormente se realiza el análisis estadístico de los datos en el programa MiniTab19, aplicando un ANOVA y el test Tukey para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos administrados. Los ensayos *in vitro* que se realizaron, determinaron en el tamizaje fitoquímico la presencia de los flavonoides, taninos y quinonas que fue corroborado con la cromatografía de capa fina la presencia de posibles flavonoides. Dando como resultados para que las dos dosis administradas tengan la actividad hipoglucemiante casi en su totalidad en un tiempo de 5 horas la hiperglucemia inducida, siendo la dosis de 30 y 60 mg/kg en

hojas las más efectivas que el control positivo acarbose. Se puede concluir que las hojas podrían ser empleado como un potencial antidiabético, y debido a la presencia de flavonoides presentaría importantes efectos antioxidantes lo que evitaría posteriormente en el paciente el desencadenamiento del síndrome metabólico.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <PRODUCTOS NATURALES>, <*Synsepalum dulcificum*>, <FLAVONOIDES>, <FENOLES>, <ANTIOXIDANTES>, <ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE>, <RATÓN (*Mus musculus*)>, <DIABETES>.

**LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**

Firmado digitalmente por
LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Nombre de
reconocimiento (DN):
c=EC, I=RIOBAMBA,
serialNumber=060276697
4, cn=LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Fecha: 2020.09.21
10:28:10 -05'00'



0306-DBRAI-UPT-2020

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the hypoglycemic activity of the hydroalcoholic extract of leaves and fruit of *Synsepalum dulcificum* (miracle fruit) in *Mus musculus* mice with streptozotocin-induced diabetes (STZ). To obtain the extracts, the plant material was macerated in 70% ethanol for 72 hours. Followed by which he concentrated on rotary evaporation. In vivo analysis was performed by inducing diabetes with 150 mg / kg streptozotocin. Sixty-three mice were randomly distributed into nine groups of seven animals each, considering a first normoglycemic white group, the second positive group (acarbose), third negative control group streptozotocin and the fourth, fifth, sixth, seventh, eighth and ninth group was administered hydroalcoholic extracts of leaves and fruit of 30-60 mg / kg respectively, glucose levels were measured in hours and in days after the administration of the treatments; Later, the statistical analysis of the data is carried out in the MiniTab19 program, applying an ANOVA and the Tukey test to verify the existence of significant differences between the treatments administered. The in vitro tests that were carried out determined the presence of flavonoids, tannins and quinones in the phytochemical screening, which was corroborated with thin layer chromatography the presence of possible flavonoids. Giving as results so that the two doses used have the hypoglycemic activity

almost in its entirety in a time of 5 hours the induced hyperglycemia, being the dose of 30 and 60 mg / kg in leaves the most effective than the acarbose positive control. It can be concluded that the leaves could be used as a potential antidiabetic, and due to the presence of flavonoids it would present important antioxidant effects, which would subsequently prevent the triggering of the metabolic syndrome in the patient.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <NATURAL PRODUCTS>, <*Synsepalum dulcificum*>, <FLAVONOIDS>, <PHENOLS>, <ANTIOXIDANTS>, <HYPOGLYCEMIANTE ACTIVITY>, <MOUSE (*Mus musculus*)>, <DIABETES>.

INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

La Diabetes Mellitus Tipo II (DM2) es una enfermedad metabólica crónica no transmisible, caracterizada por la hiperglucemia crónica y la alteración de procesos metabólicos de los carbohidratos, lípidos y proteínas (Joshi 2015, p. 1965). La DM2 ocasiona alteraciones multiorgánicas que incluyen la insulinoresistencia en el músculo y tejido adiposo, con un progresivo deterioro de la función y daño estructural de las células betas pancreáticas (Reinehr, Reinehr y Jugendklinik, 2013, p. 271).

A nivel mundial, en el 2016 la diabetes fue la causa directa de 1,5 millones de fallecimientos, además de un cofactor importante en la muerte de otras 2,2 millones de personas según reportes elaborados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2045 se estima que afectará aproximadamente a 700 millones de personas (Oms, 2016, p. 12). En cuanto al diagnóstico, en el 2014 se calculó que el 8,5% de personas adultas padecía diabetes, estas cifras están relacionadas con factores de riesgo como: la edad, sexo, sobrepeso, obesidad, antecedentes, hipertensión arterial, desorden alimenticio, falta de actividad física, tabaquismo, origen étnico, inadecuada nutrición durante el embarazo que afecta al niño en desarrollo, entre otros (Rivera, Joyc y Pedraza, 2018).

En el Ecuador la DM2 representa actualmente un problema de Salud Pública, debido al número creciente de personas que la padecen, junto a las complicaciones y discapacidad que puede desarrollar, esto representa un alto costo social y económico para el paciente, la familia y el Estado. En el año 2017 se presentaron un total de 4895 defunciones a causa de la DM, 2289 hombres y 2606 mujeres, del número total de afectados el 90,3% presentó DM2 (Zavala 2018, p. 37).

Actualmente para el tratamiento de la diabetes se usa insulina y agentes orales hipoglucemiantes como biguanidas, tiazolidinedionas, glinidas, glitazonas, sulfonilureas e inhibidores de α -glucosidasa (Insulina humana (acción rápida), Insulina humana NPH (acción intermedia), Tolbutamida, Glipizida, Metformina, Glibenclamida, acarbosa). El problema principal con estos últimos son los efectos secundarios graves que presentan algunos pacientes, siendo lo más peligroso el apareamiento de accidentes vasculares y la muerte (Nidia, Patricia y Juan, 2017, pp. 204–206).

Las terapias alternativas son opciones cada vez más aceptada para el tratamiento de la diabetes. La razón se debe a que un sinnúmero de, especies vegetales presentan compuestos con gran actividad biológica tales como: alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas y terpenoides; estas sustancias actúan a través de varios mecanismos para disminuir la cantidad de insulina en sangre, estimulan la secreción de insulina, inhiben enzimas que participan en el metabolismo de hidratos de carbono y favorecen la regeneración de las células betas (Castro, 2014, pp. 108–114).

Diferentes estudios han demostrado que especies como: *Justicia chlorostachya* (insulina), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Urtica dioica* (ortiga), *Oreocallis grandiflora*, *Opuntia ficus-indica* (tuna) y *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa) poseen fitosntituyentes hipoglicemiantes (García y Días, 2015, p. 73).

La fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*), es una planta originaria de África occidental, su fruto ha sido utilizado como saborizante de alimentos debido al gran dulzor que otorga (Chen, Liu y Cheng, 2006, p. 7); este producto y sus beneficios son poco conocidos en el Ecuador. Por lo que, el cultivo de esta especie se encuentra de manera esporádica en sectores específicos del país como la Amazonía y Santo Domingo de los Tsáchila.

La presente investigación pretende comprobar si los extractos hidroalcohólicos del fruto y hojas de *Synsepalum dulcificum* cultivadas en el país poseen actividades hipoglucemiantes. En África y China es común la utilización de esta planta para tratamiento de diferentes enfermedades, entre las que se encuentra la Diabetes, patología considerada como un crecimiento problema de Salud Mundial.

Justificación del estudio

El género *Synsepalum* de la familia Sapotaceae son de especial interés debido a la bioactividad de sus componentes fitoquímicos. Investigaciones de África, China y EEUU han mostrado que los responsables del efecto son los metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas y terpenoides (Wakeford *et al.*, 2018, p. 102). Sin embargo, en América del Sur, son pocos los estudios de esta especie como inhibidor de la actividad hipoglucemiante. Razón por la cual se plantea dar a conocer algunas de las propiedades y beneficios que puede ofrecer la planta y el fruto.

Estadísticamente, en Ecuador se evidencia un incremento significativo de la mortalidad en los últimos años a causa de la DM2, con un total de 4895 defunciones en el año 2017, se prevé que estas cifras podrían incrementar de forma alarmante debido al aumento de factores de riesgo. Por lo que es vital importancia buscar alternativas terapéuticas a partir de fuentes naturales (Zavala-calahorrano 2018, p. 35).

Las plantas han sido y continúan siendo la fuente primaria de los medicamentos en el mundo. Actualmente, el 50% de todos los fármacos en uso clínico se derivan de productos naturales; las plantas superiores contribuyen al 25% del total (García y Días 2015, p. 45). En los países en desarrollo, el 80% de las personas utilizan la medicina tradicional debido a su asequibilidad y la aceptabilidad cultural (González, 2011, p. 98).

A pesar de los problemáticos efectos secundarios de la insulina y otros agentes hipoglucemiantes orales, estos siguen siendo los fármacos de elección primaria en el tratamiento clínico de diabetes y trastornos relacionados (García y Días, 2015, p. 25). En la actualidad, se desea hallar compuestos que puedan compararse con la seguridad y el perfil de eficacia de los agentes hipoglucemiante tradicionales, se busca además que posean poder antioxidante para lograr de esta forma palear patologías relacionadas como afecciones isquémicas, enfermedades inflamatorias y las diversas formas de lesión orgánica (Navaro y María, 2015). En los últimos años, más de 649 tratamientos naturales con plantas para la DM han sido registrados, pero solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para su eficacia (Castro, 2014, p. 109).

El género *Synsepalum* incluye alrededor de 450 especies, distribuidas desde el sur de EEUU hasta América del Sur. En Ecuador existe cerca de 10 géneros y 98 especies de familias, principalmente localizadas en bosques secos y bosques húmedos tropicales a ambos lados de los Andes (Mendoza, Ayala y Mendoza, 2015, p. 207).

En América Latina y Ecuador son muchas especies que sin ser descubiertas y estudiadas, por ende es importante investigarlas y contribuir de esta forma lo estipulado en el Plan Nacional de desarrollo Todo una Vida en el inciso d15, que menciona: “Impulsar programas de investigación, formación y actualización que respondan a las potencialidades y necesidades territoriales, promoviendo la inserción laboral de manera eficiente”(“PLAN ESTRATÉGICO INSTITUCIONAL”, 2018, p. 26).

De igual forma, el estudio de *Synsepalum dulcificum* supone el fortalecimiento de saberes ancestrales que han sido mermados por la cultura acelerada, la pérdida de bosques primarios y el

paso inclemente del tiempo no solo en Ecuador si no en todas partes del mundo. A través de la etnobotánica ha sido posible el rescate de conocimientos milenarios para el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad vegetal y sobre todo su devolución a los pueblos indígenas en armonía con las nuevas generaciones científicas y académicas.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

- ✓ Determinar la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa) en ratones *Mus musculus*.

Objetivos específicos

- ✓ Identificar cualitativamente la presencia de los metabolitos secundarios de *Synsepalum dulcificum* a través de tamizaje fitoquímico.
- ✓ Evaluar el efecto hipoglucemiante a diferentes dosis del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto de la fruta milagrosa en animales de experimentación con hiperglucemia inducida por estreptozotocina.
- ✓ Comparar el efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *Synsepalum dulcificum* con la acarbosa en una hiperglucemia inducida con estreptozotocina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

Existen varios estudios de especies vegetales con actividad hipoglicemiante, como la investigación realizada por la Universidad Nacional Cheng Kung (China) en 2006, en el cual menciona que el empleo del polvo liofilizado de *Synsepalum. dulcificum* tiene efecto sobre la resistencia de insulina en ratas alimentadas con fructosa, por ende, sugieren que se puede usar como un coadyuvante para el tratamiento de pacientes diabéticos (Chen, Liu & Cheng 2006, p. 4).

La miel de agave (*Agave americana* L) a 70° C presenta de igual forma actividad antidiabética, comparable a la obtenida con el control positivo (metformina) (Liliana 2013, p. 10). Otra especie interesante es *Oreocallis grandiflora* la cual al parecer podría actuar inhibiendo la alfa-amilasa (David 2014, p. 65). Se considera que los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica podrían ser los flavonoides; para la estimación de su cantidad se utilizan técnicas analíticas espectrofotométricas y métodos de extracción específicos para purificar los componentes activos (David, 2014, p. 67).

Otro estudio realizado fue por Catacumán, S. en 2015, el cual evaluó la actividad hipoglucemiante de las hojas de *Jungia rugosa*, para lo cual se administró la fracción flavónica en ratones con diabetes grave y leve; el extracto disminuyó los niveles de glucosa en ambos grupos de ratones diabéticos. Este estudio indicó que la actividad está relacionada con la presencia de luteolina y apigenina identificadas mediante análisis HPLC (Sonia, 2015, p. 9).

En Perú, Talavera 2017 menciona que la actividad hipoglucemiante del fruto de *Physalis peruviana* L. “flavonoides aguaymanto”, se debe a los flavonoides aislados. En el estudio se indujo diabetes con aloxano en ratas, el compuesto responsable del efecto son las isoflavonas (Medina 2017, p. 75).

El extracto hexánico, metanólico y el obtenido con acetato de etilo de *Clusia latipes* han presentado actividad inhibitoria de la alfa-glucosidasa, siendo los extractos de acetato de etilo y metanólico los de mayor potencia. *Clusia latipes* contiene alcaloides, flavonoides, quinonas, saponinas y taninos. La inhibición más alta sobre la alfa-glucosidasa se presentó con la fracción de acetato de etilo de

hojas con CI_{50} de 0,90 ug/mL, mostrando ser 270 veces más eficaz que la acarbosa (control positivo). La actividad antioxidante más potente se evidenció con las fracciones de hojas y tallos de acetato de etilo en DPPH (SC_{50} : 4,70 ug/mL y 3,58 ug/mL) y ABTS (SC_{50} : ug/mL y 2,27 ug/mL) (Rivas Silva 2017, p. 52).

En 2017, la Universidad de Ibadán Nigeria, Olabisi y Clement se refieren al potencial antidiabético de los extractos de *Synsepalum dulcificum* administrados a ratas albinas diabéticas tipo II, a estos animales de experimentación se administró en distintas dosis los extractos, obteniendo resultados significativamente óptimos (Obafemi & Akinmoladum Obafemi y Akinmoladum, 2017, p. 1).

Finalmente, la última investigación elaborada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en 2018, demostró la actividad hipoglucemiante y antioxidante del extracto alcohólico del fruto de *Morinda citrifolia* (noni) siendo efectivo en ratas inducidas con diabetes mellitus tipo 2 por aloxano (Nakamura, Demarini & Whu 2018, p. 12).

1.2. Marco conceptual

1.2.1. Especie en estudio

Synsepalum dulcificum “Fruta milagrosa”.

1.2.2. Clasificación taxonómica

TAXONOMÍA

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Sapotaceae
Género	<i>Synsepalum</i>
Especie	<i>Synsepalum dulcificum</i>
Nombre Vulgar	Fruta milagrosa

Fuente: Global Biodiversity Information Facility, 2019

Nombres comunes

Fruta milagrosa, baya milagrosa, fruta mágica, milagrosa o fruta del sabor.

A nivel mundial se la reconocen como: Miracle Berry, Miraculous Berry, Miracle fruit, Baya milagrosa, Baya mágica, (Wakeford *et al.*, 2018).

1.2.3. Familia Sapotaceae

1.2.3.1. Características

En América se encuentra aproximadamente 450 especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta América del Sur (León 2011, p. 18). En Ecuador, esta familia está representada por 10 géneros y 98 especies (León, Yáñez 2011, p. 28). La característica relevante de la Sapotaceae es que son árboles maderables cuyo fruto abayado sirve de alimentos a los mamíferos, especialmente roedores y en algunas ocasionalmente para el hombre.

Cabe recalcar que, debido a la tala indiscriminada y aumento de terrenos para la agricultura, este tipo de especie se ve en peligro de extinción, sobre todo en las regiones subtropicales del Ecuador. Sin embargo, no sería de sorprenderse si nuevas especies y nuevos registros de Sapotaceae se encuentran en un futuro cercano, como es el caso de cultivos de la fruta milagrosa *Synsepalum dulcificum*.

El espécimen vegetal más conocido de la familia Sapotaceae es el sapote fruta comestible y de uso ancestral; algunos géneros de estos árboles también producen una cantidad importante de látex, en tanto que las semillas son fuentes de aceites (Burkat & Hill 1979, p. 307).

1.2.4. Género Synsepalum

1.2.4.1. Características

Synsepalum es un género de plantas de la familia Sapotaceae y comprende aproximadamente 35 especies de arbustos de hojas perennes (Rokni & Darbyshire 2019, p. 115). Dentro de este género se encuentra la Fruta milagrosa. El origen del género data de hace miles de años en África, se ha determinado que el ancestro común más antiguo pertenece al periodo del Mioceno, pero se cree que su origen es mucho más antiguo, en cuanto al estudio fitofarmacológico cabe indicar que la fruta

milagrosa posee metabolitos secundarios tales como: flavonoides, antioxidantes, taninos, quercetina, tocoferoles, β -sitoesterol, catequinas, ácido clorogénico entre otros (Chen y Cheng 2006, p. 79).

Las raíces de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) contiene ácido vanílico, que inhibe las células cancerosas de la piel y posee una alta actividad antioxidante, mientras que el tallo, contiene β -sitosterol y estigmas terol, compuestos con efecto antiinflamatorio, antineoplásico, antipirético, e inmunomodulador (Fandohan & Chadare 2017, p. 18). A diferencia de los edulcorantes artificiales como el ciclamato (ciclohexilsulfamato) y la sacarina, la miraculina previene el riesgo de carcinogénesis (Fandohan & Chadare 2017, p. 19).

1.2.5. Descripción botánica

Synsepalum dulcificum (Fruta milagrosa) es un árbol o arbusto de 3 a 4 metros de altura pueden llegar hasta los 10 metros (Carmen & Manuel 2016, p. 37). Crecen en climas cálidos y húmedos, y sobre suelos ácidos (pH <5,8). Posee hojas perennes que miden de 5–10 cm de largo, 2–3,7 cm de ancho, mientras que las flores son de color blanco. La frutas milagrosa madura es de color rojo brillante, mide aproximadamente entre 3 a 4 cm de longitud y están agrupadas en los extremos de las ramas figura 1-1. Cada fruto contiene una capa delgada de pulpa comestible, con un sabor leve a cerezo, en la parte interior de la carne contiene una sola semilla marrón negruzca brillante con forma ovoide de 1,5 cm. Su componente principal es la “miraculina”, una glicoproteína que se enlaza en las papilas gustativas y enmascara completamente los sabores ácidos y amargos durante un tiempo prolongado, entre 30 a 60 minutos (Carmen & anuel 2016, p. 89).



Figura 1-1: Ilustración botánica de *Synsepalum dulcificum*

Fuente: Tropical plants 2020.

1.2.6. Propiedades medicinales

En la medicina popular se utiliza todas las partes de la planta (*Synsepalum dulcificum*), principalmente con fines medicinales, alimenticios y espirituales, ya sea esta cruda o procesada (polvo, infusión o coccción) (Fandohan 2017, p. 19). Las hojas se usaban para el tratamiento de los trastornos del sistema urogenital (debilidad sexual, enuresis) e infecciones (malaria, ictericia). Los tallos por su parte como antiinflamatorio, antineoplásico, antipirético e inmunomodulador en animales, mientras que el extracto de la raíz, por el contenido de ácido clorogénico, se utiliza para inhibir las células cancerosas de la piel (Fandohan & Chadare 2017, p. 29), en cuanto a la fruta no hay registro que indiquen que cura el cáncer, lo que si hace, es aliviar los terribles efectos secundarios de la quimioterapia de una manera real e inmediata (Naivy & Elio 2011, p. 97). La fruta afecta los receptores de la lengua, después de ingerir una sola baya, el sabor de la comida que la persona consume en la siguiente hora cobra un potencial inesperado (Naivy & Elio 2011, p. 109).

1.3. Composición química de la fruta (*synsepalum dulcificum*)

1.3.1. Composición química

La composición química de la “fruta milagrosa” se ha determinado por diversos métodos. La parte comestible de esta fruta es muy pequeña, debido al gran tamaño de su semilla. La cantidad de agua que contiene la pulpa es elevada, siendo esta de 65.33%, carece de grasa y el contenido de azúcares simples es bajo tabla 1-1, por lo que la fruta posee un gran potencial para ser usada en pacientes con diabetes y obesidad (Matínez & Navaro 2016, p. 21), la presente determinación fue realizado en Vietman en la que especifica que la temperatura óptima para preserva la fruta *Synsepalum dulcificum* es de 1-4 °C.

Tabla 1-1: Composición química nutricional de las bayas de *Synsepalum dulcificum*

Contenido nutricional de la “fruta milagrosa”	Contenido g/100g del peso fresco
Agua	65,33
Grasa	0,2

Proteína	0,10
Carbohidrato	22,5
Monosacáridos	5,6
Fibra dietética	12,5
Vitamina A	37,3
Vitamina C	40,1
Cenizas	0,99
Compuestos fenólicos totales	625,57

Fuente: Trần Danh Thê, 2010. Composición química de la baya *Synsepalum dulcificum*

1.3.2. Composición aminoácidica

La variedad y combinación de aminoácidos presente en un alimento afecta las características organolépticas, es decir influye el sabor, aroma y color. Linskens 1988, indica que la cantidad de aminoácidos sirve para determinar la autenticidad del jugo de un producto, y justamente, es este parámetro que se aprovecha para identificar la fruta milagrosa basándose en su alto contenido aminoacídico tabla 2-1, de igual forma, esta característica química sugiere que podría ser empleada como materia prima para la producción de diversos productos alimenticios, farmacéuticos o suplementos de dieta (Carmen & Manuel 2016, p. 81).

Tabla 2-1: Composición aminoacídica de la fruta *Synsepalum dulcificum* en porcentajes.

Aminoácidos	Porcentaje (%)	Aminoácidos	Porcentaje (%)
Triptófano	8,055%	Isoleucina	0,7%
Fenilalanina	1,35%	Metionina	1,05%
Prolina	0,4%	Valina	0,69%
Treonina	1,1%	Histidina	0,4%
Alanina	0,5%	Glutamina	1,02 %
Ácido glutámico	1,6%	Glicina	0,7%
Serina	0,3%	Arginina	1%
Acido aspártico	0,1%	Asparagina	1,23%
Lisina	0,6%	Leucina	0,6%

Fuente: Nutrición comunitaria 2016. Composición aminoacídica

1.3.2.1. *Miraculina*

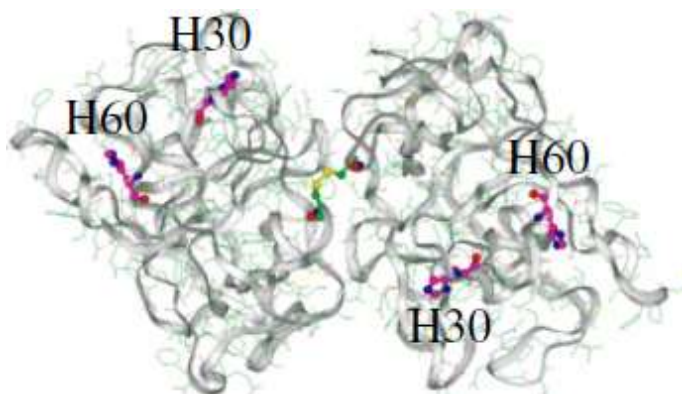


Figura 2-1: Estructura dimérica de la miraculina
Fuente: ScienceDirect 2007

La miraculina como se observa en la figura 2-1, es un glicoproteína de origen vegetal, en su caracterización se indica que es una N-glicoproteína básica con un peso molecular de 42.000 Da, termolábil, estable en rangos amplios de pH de 3 a 12 y sensible a pH iguales o inferiores a 2 (Rosa y Navarrete 2016, p. 20). Siendo empleada para modificar el sabor de ácido a dulce en alimentos ricos en ácidos orgánicos, aunque es insípida; la adición de (100 µg) de este compuesto puede neutralizar, con una persistencia de 1- 2 h, la sensación ácida de los alimentos, como el zumo de limón (Rosa y Navarrete 2016, p. 23).

Cabe recalcar que, la proteína miraculina es muy sensible a la temperatura al someterla al calor se inactiva perdiendo así la propiedad de enmascarar los sabores ácidos, condiciones que se debe considerar al trabajar en el laboratorio (Matinez & Periago 2016, p. 41).

1.3.3. *Composición mineral en las hojas de la fruta milagrosa*

Las hojas de *Synsepalum dulcificum* contienen una gran cantidad de minerales como se indica en la tabla 3-1, estas determinaciones han sido realizadas mediante la utilización de un espectrómetro de absorción atómica, en Fitomedicina, Unidad de Toxicología y Metabolismo de fármacos, Departamento de Bioquímica, Universidad Federal de Tecnología, Akure, Nigeria (Obafemi & Akinmoladun 2017, p. 113).

Tabla 3-1: Contenido mineral en hoja de *Synsepalum dulcificum*

Metales	mg/100g
Cobre	1,10
Zinc	4,16
Magnesio	291,0
Plomo	0,01
Manganeso	8,70
Calcio	830,0
Hierro	26,30
Sodio	102,0
Potasio	1850,0

Fuente: (Obafemi y Akinmoladun 2017, p. 116)

1.4. Distribución Geográfica a nivel mundial

Los países donde se ha localizado el cultivo y la producción del árbol o arbusto de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*), se detalla en la tabla 4-1 (Dc y Daniell, 2020).

Tabla 4-1: Distribución Mundial de la fruta milagrosa

País	Fecha de introducción
EE.UU	8/1988
Nigeria	1/1996
Costa rica	4/1982
Taiwán	9/2009
Australia	6/1999
Gabón	1/2004
Honduras	8/1065
Brasil	11/2005
Ecuador	2/1994
Panamá	4/1972
Ghana	6/1970

Fuente: GBIF (Global biodiversity information facility-2020)

La distribución geográfica de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) a nivel mundial se presenta en la figura 3-1. La información se encuentra disponible en la base de datos de plantas el Departamento de agricultura de los Estados Unidos, en la cual se detalla toda la información acerca del espécimen (EE.UU, 2020).

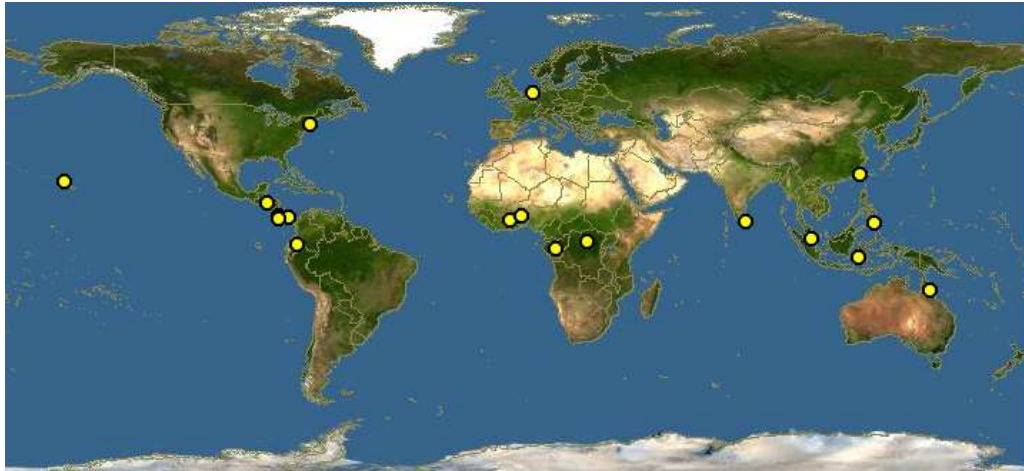


Figura 3-1: Distribución Geográfica a nivel mundial (*Synsepalum dulcificum*)

Fuente: (Discovery Life, 2020)

1.4.1. Localización de los cultivos en Ecuador

En el país el mayor cultivo de este arbusto se da en la zona trópica húmeda, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, figura 4-1, en la parroquia rural Luz de América; a una altura de 655 msnm, con una temperatura promedio de 22,9°C. Se localizan dos hectáreas de cultivos con aproximadamente 800 mil plantas, las cuales pertenecen a la empresa “EQUAFORESTAR”. Se ha observado además, que existen pequeñas jardineras en otras zonas aledañas del Ecuador.



Figura 4-1 Ubicación de la fruta milagrosa *S. dulcificum* en Ecuador

1.5. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos que se originan de fuentes biológicas como plantas, animales o microorganismos de origen terrestre o marino (Neivy & Elio 2011, p. 196), estas sustancias químicas no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo del organismo, pero, a menudo son exclusivos de especies que ofrecen bioactividades estructuralmente únicas y selectivas (Lankatillake & Días 2019, p. 35). Las estrategias modernas en la investigación de productos naturales se centran en la bioactividad e implican inicialmente la selección de especies basadas en el conocimiento etnofarmacológico, el uso tradicional o información quimiotaxonómica; posteriormente se procede con el aislamiento guiado por bioensayo y la identificación de compuestos. (Lankatillake & Días 2019, p. 37).

1.5.1. Polifenoles

Las plantas con polifenoles o compuestos fenólicos presentan de un 30-60% de fenoles totales. Químicamente, los compuestos fenólicos poseen como molécula principal al fenol, este a su vez se compone de un anillo aromático denominado fenil sustituido con un grupo hidroxilo (OH). A partir de esta molécula base pueden presentar diversos grupos en las cadenas laterales permitiendo su clasificación en: fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y por último los flavonoles en donde destacan las quercetinas y mercuritina (Prakash & Gupta 2012, p. 25).

Debido a su estructura química son considerados importantes antioxidantes para la dieta del ser humano y se encuentran presentes en diferentes productos, como frutas, hortalizas, raíces y cereales. Muchos de los compuestos fenólicos participan en el desarrollo de la planta, protección contra patógenos y exposición de las radiaciones UV mediante generación de polifenoles. Además, estos polifenoles son responsables del color y sabor de las plantas (pueden dar astringencia).

1.5.1.1. Efectos de los compuestos fenólicos

La característica principal de los compuestos fenólicos es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación, modifican los pasos metabólicos de las prostaglandinas, inhiben la activación de carcinógenos, son antioxidantes y como tales atrapan radicales libres y previenen que estos se unan y dañen a las moléculas de DNA (paso crítico en la iniciación de procesos carcinogénicos) y evitan la peroxidación lipídica. El daño estructural en las membranas de las células normales alteran el transporte de molécula través de estas afectando el crecimiento y proliferación celular (Prakash & Gupta 2012, p. 30).

1.5.2. Flavonoides

Los Flavonoides son responsables de color de las flores y del fruto de diversas especies vegetales. Estructuralmente los flavonoides figura 5-1, constan de tres anillos; un anillo benzopirano 2-fenil junto a un anillo fenólicos dihidroxilados en las posiciones 5-7, un segundo anillo que puede contener O-CH₃ y que generalmente es mono-hidroxilado, orto-hidroxilado o victrihidroxilados, y el tercer anillo que puede ser un anillo heterocíclico. Los flavonoides por sus características estructurales pueden clasificarse en cuatro grupos: flavanos (catequina), flavanoles (quercetina), flavonas, antocianidinas e isoflavonas (Praka & Gupta 2012, p. 26).

Por numerosos estudios se han logrado identificar más de 5 mil tipos de flavonoides, los cuales se pueden hallar en diferentes tipos de alimentos consumidos por el ser humano tales como: cereza, vino, té verde o negro, soja, entre otros.

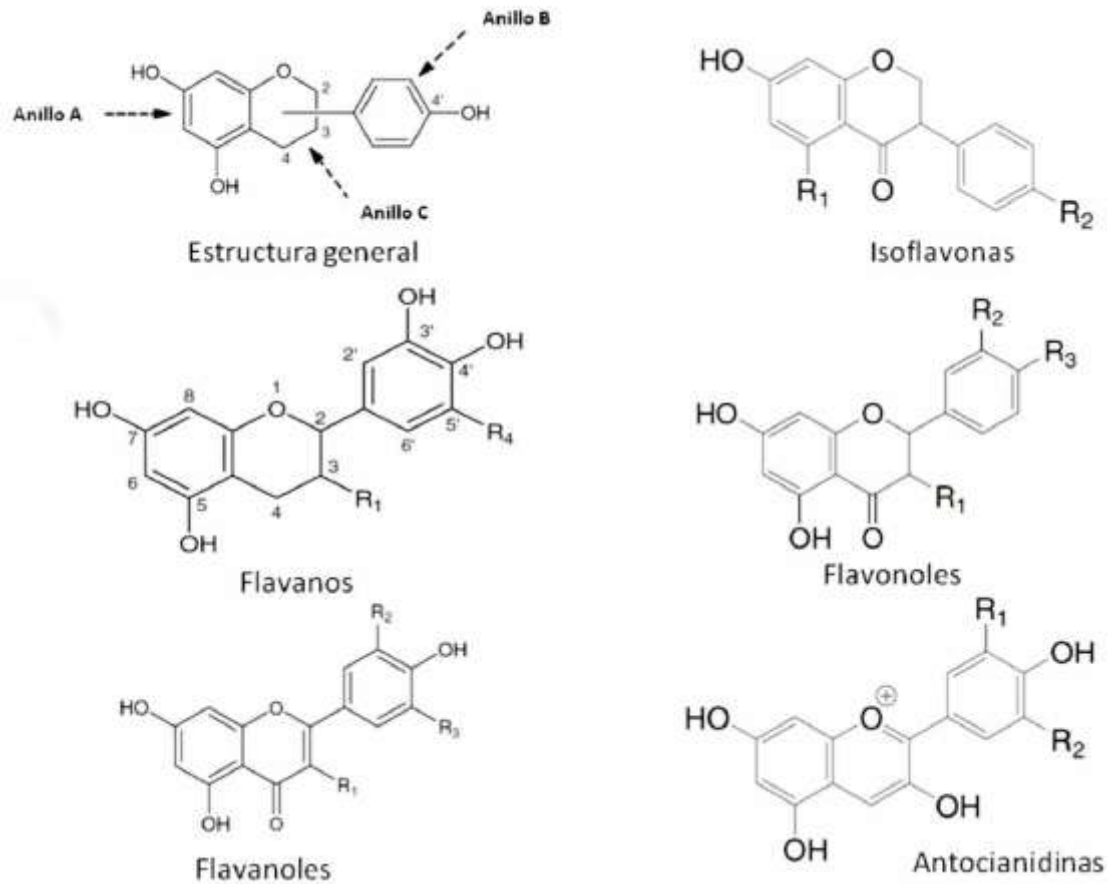


Figura 5-1 Estructura de los flavonoides

Fuente: (Research Gate. 2010)

Antioxidantes

En los diferentes mecanismos de protección celular, intervienen estructuras moleculares conocidas como antioxidantes que previenen o evitan la oxidación; las concentraciones empleadas con bajas con respecto al sustrato oxidado y actúan estabilizando las ROS, transformando a moléculas menos activas, bloqueando la unión al oxígeno o capturando los radicales libres (Prakash & Gupta 2012, p. 29).

1.5.3. Actividad antioxidante

Los flavonoides actúan como agentes antiinflamatorios, antiulcerosos, antitumorales y anticancerígenos. La utilidad terapéutica de los flavonoides se ha demostrado frente a hemorragias gastrointestinales, reacciones a la radiación, eritroblastosis, cistitis hemorrágica, tuberculosis, hemofilia, enfermedades periodontales y trastornos oftálmicos.

Los flavonoides al ser potente quelantes se unen con metales de transición (hierro y cobre), inhiben la formación de radicales libres catalizados por metales de transición figura 6-1. Los puntos probables de unión de metales a flavonoides son los grupos o-difenólicos, en posición 3,4 dihidroxi del anillo B y el 5-hidroxi en el anillo C. Por esta razón, los metales de transición quelados no estarían disponibles para interactuar con otros compuestos e iniciar reacciones biológicamente perjudiciales (Prakash & Gupta 2012, p. 29).

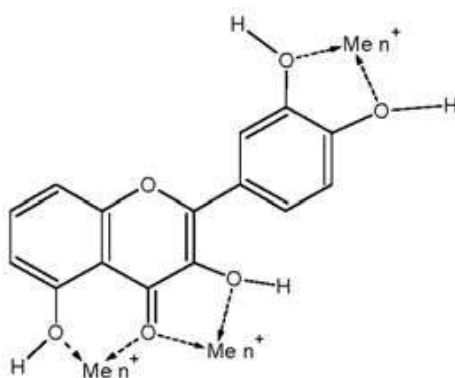


Figura 6-1: Quelación de metales de transición con flavonoides

[Meⁿ⁺ = iones de metales de transición Fe⁺², Cu⁺]

Fuente: (The Open Nutraceutical Journal, 2009)

1.5.4. Actividad biológica

Los efectos biológicos de los fenoles son de gran interés, se han encontrado evidencia de que ofrecen protección contra la patogénesis gastroduodenal, el envejecimiento prematuro, la inflamación, la disfunción metabólica, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares.

Los polifenoles inhiben la oxidación del LDL *in vitro* parámetro que se considera como mecanismo clave en la aterosclerosis. Cabe indicar que, ciertos estudios han demostrado que el consumo de bebidas y alimentos ricos en polifenoles da como resultado una susceptibilidad reducida de LDL a la oxidación inducida *ex vivo* por Cu⁺². Los flavonoides son carroñeros efectivos de radicales libres, responsables del daño del ADN y promoción tumoral (Inglett & Chen 2011, p. 142). Su actividad anticancerígena se expresa mediante múltiples mecanismos como la activación y mejora de las actividades de las enzimas antioxidantes o la inhibición de ciertas enzimas como P-450 encontradas en el hígado (Inglett & Chen 2011, p. 144).

Además, se ha informado que los flavonoles y la flavona inhiben las enzimas del citocromo P-450 mientras que la genisteína y la quercetina inhiben la proteína tirosina quinasa involucrada en los

procesos proliferativos de la célula. Las catequinas afectan la señalización celular y la progresión del ciclo celular al inhibir favorablemente las vías de transducción de señales mediadas por factores de crecimiento epidérmicos y derivados de plaquetas. Se han demostrado que la apigenina, luteolina y quercetina causan paro del ciclo celular y apoptosis por mecanismo dependiente de p53 (Prakash & Gupta 2012, p. 29).

1.6. Diabetes

La diabetes es una patología crónica de gran importancia en la salud pública y es considerada como la epidemia silenciosa de la siglo XXI (García 2018, p. 206) (Joshi 2015, p. 109). La enfermedad avanza progresiva y paulatinamente, los síntomas de afectación a los diferentes órganos aparecen varios años después del inicio de la enfermedad. Durante este periodo, emergen las complicaciones graves e irreversibles propias de la hiperglucemia (Zavala & Fernández 2018, p. 76).

En el Ecuador la DM2 representa un problema de Salud Pública, debido al número creciente de personas que la padecen, junto a las complicaciones y discapacidad que puede desarrollar (Mortality diabetes 2016, p. 1), causa cambios individuales lo que representa un alto costo social y económico para el paciente, la familia y el Estado (Navaro & Beatriz 2015, p. 98). Además, se evidencia un incremento significativo de la mortalidad en los últimos años a causa de la DM2 en el país, con un total de 4895 defunciones en el año 2017 y con proyecciones poco favorables para el futuro (Zavala & Fernandez 2018, p. 4). En 2017, la Federación Internacional de Diabetes, expresa que la incidencia de esta patología ha tenido un incremento significativo a nivel mundial en las últimas décadas, de 108 millones de adultos entre 20 y 79 años en 1980, a 422 millones en 2014 (López & Marguello 2018, p. 117). Por otra parte en 2016 la OMS indica que ocurre a nivel mundial aproximadamente 1.5 millones de muertes por año a causa de la DM2 y se estima que afectará aproximadamente a 700 millones de personas para el año 2045 (Zavala & Fernández 2018, pp. 4–5). Datos poco alentadores ofrecen los 318 millones de adultos que presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa, y que podrían en un gran porcentaje de desarrollar DM2 en los próximos años. La enfermedad cardiovascular aterosclerótica en personas menores de 70 años, es la principal causa de muerte como comorbilidad en pacientes con DM2 en Ecuador y el mundo, llegando a 16 millones de muertes por año (37%). Por ende la Salud Pública se ve afectada a nivel mundial y local, debido a los gastos económicos directos e indirectos que varían de \$1000 a \$10000 por paciente en un año; sin embargo, estas cifras dependen de la localización, complicaciones y tratamiento de las mismas (Lankatillake & Huynh 2019, p. 3).

1.6.1. Fisiopatología

Como ya se mencionó, la diabetes, es una condición patológica en la que predomina un aumento del nivel de glucosa en sangre lo que conlleva a un desorden metabólico que tiene consecuencias sobre diferentes órganos, siendo estas las complicaciones de la enfermedad con difícil tratamiento. Existen dos tipos de diabetes mellitus que son: DM-1 o insulino-dependiente y DM-2 o No insulino-dependiente.

1.6.2. Diabetes mellitus tipo I (DM-1)

Este tipo de diabetes es una enfermedad inflamatoria crónica causada por la destrucción de las células β del páncreas; la función primordial de estas células es la secreción de insulina en respuesta al incremento de glucosa en la sangre, debido a esta patología las personas con este tipo de diabetes necesitan una inyección diaria de insulina para regular la glucemia (OMS, 2015, p. 11). Se sabe que en la actualidad existe distintas causas por las cuales puede ocurrir la destrucción de los islotes como: virus, agentes químicos, autoinmunidad cruzada o incluso, alteraciones genéticas. Sin embargo la mayor susceptibilidad para desarrollar DM-1 se halla en los genes del antígeno leucocitario humano (HLA clase II) del cromosoma 6, lo cual contribuye con el 50% del riesgo (Cervantes y Prenso 2017, p. 101). Los síntomas de un elevado nivel de glucosa en el torrente circulatorio son: poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia, alteraciones de la vista y cansancio (Álvares & Peralta 2019, p. 16).

1.6.3. Diabetes mellitus tipo II (DM-2)

La DM-2 o insulino-dependiente surge debido al uso ineficaz de la insulina en el cuerpo. Este tipo de diabetes es la más común en todo el mundo, y en gran parte es resultado del exceso de peso corporal y la inactividad física (WHO, 2018, p. 2), se asocia a enfermedades cardiovasculares (ECV) y resistencia a la insulina en la periferia de los tejidos y defecto secretor de insulina de las células β (WHO, 2018, p. 2). La DM-2 suele ser más común en mujeres con historial de diabetes gestacional. Cabe indicar que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, puesto que inicialmente es leve y no provoca síntomas y pasa desapercibida durante años. Entre el 30% y 50% de los pacientes con DM-2 desconocen que son diabéticos al momento del diagnóstico, pero lamentablemente a esas alturas

ya han desarrollado complicaciones crónicas (Álvarez & Peralta 2019, p. 17). A menudo la DM-2 forma parte del síndrome metabólico, junto con alteraciones como obesidad, hipertensión arterial, dislipemia e incremento en el riesgo cardiovascular (Álvarez & Peralta 2019, p. 17).

1.6.3.1. Complicaciones de la diabetes

Retinopatía.

La retinopatía es una patología diabética que afecta la vista y causada un deterioro de los vasos sanguíneos que lleva al tejido sensible a la luz lo cual se encuentra en retina. Al principio puede no haber síntomas, pero a lo largo de plazo puede causar pérdida de la visión (OMS 2015, p. 13).

Existen dos tipos de retinopatía que son; no proliferativa y proliferativa.

La retinopatía no proliferativa se caracteriza en que las paredes de los vasos sanguíneos se debilitan, provocando la microaneurisma en la pared de los vasos pequeños y en ocasiones derraman líquido y sangre de la retina. Además las fibras nerviosas de la retina pueden inflamarse (Kantharidis & Carew 2011, p. 1834).

Retinopatía proliferativa, esto consiste en que los vasos sanguíneos dañados se cierren, lo que ocasiona, el crecimiento de nuevo vaso sanguíneos anormales en la retina que pueden perder sangre en la sustancia clara y gelatinosa que ocupa el centro del ojo (vítreo) (Kantharidis y Carew 2011, p. 1834).

La retinopatía se relaciona con la duración de la diabetes, la edad, la HbA_{1c}, la presión arterial muy alta y desventajas socioeconómicas (Soiza & Donaldson 2018, p. 2).

Hipertensión.

La hipertensión es un factor de riesgo de complicaciones microvasculares, incluidas la nefropatía diabética y la retinopatía, y debe someterse a un examen de detección al menos anualmente, y preferiblemente en cada visita. Además la hipertensión puede aumentar la presión de la pared capilar, disminuir la síntesis de óxido nítrico (NO), y disminuir la autorregulación del flujo sanguíneo (Soiza & Donaldson 2018, p. 4).

Albuminuria.

La presencia de albuminuria (microalbuminuria), es un factor de riesgo de nefropatía diabética, enfermedades cardiovasculares y mortalidad. Los valores normales de la albumina/creatinina en

hombres deben ser de 30-300 mg/g, y en las mujeres de 43-300 mg/g. Si los valores sobrepasan se denomina proteinuria (macroalbuminuria) (Soiza & Donaldson 2018, p. 4).

Neuropatía.

La neuropatía diabética puede afectar el sistema nervioso somático y autónomo. El tipo más relevante es la polineuropatía sensoriomotora, esto inicialmente produce una pérdida sensorial, seguida de una pérdida de la función motora. El entumecimiento puede progresar a dolor persistente. Los factores de riesgo en la DM-1 son edad avanzada, progresión de la diabetes, tabaquismo, aumento de la presión arterial diastólica, obesidad, colesterol, y niveles altos de LDL y bajos de HDL. Mientras que en DM-2 son edad avanzada, sexo masculino, duración de la diabetes, tabaquismo, bajo nivel de colesterol HDL (Soiza & Donaldson 2018, p. 5).

Enfermedades macrovasculares.

Es una de las causas importantes de morbi-mortalidad entre los individuos de DM-2. La aterosclerosis prematura en la diabetes presenta numerosos factores que contribuyen, como la hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, HDL bajo, la oxidación de las lipoproteínas, las consecuencias vasculares de la glucosilación avanzada y la alterada función endotelial. Las placas fibrosas de la aterosclerosis son el resultado de la proliferación del músculo liso sub-endotelial en la pared arterial (Soiza & Donaldson 2018, p. 5).

Cardiopatía isquémica.

La lesión anatomopatológica no es, en nada diferente, a las lesiones ateroscleróticas que aparecen en individuos no diabéticos. Sin embargo los pacientes con DM presentan ciertas predisposiciones a una forma más extensa y grave de aterosclerosis, siguiendo un curso más activo, lo que ha sido especialmente apreciado en las arterias coronarias (Soiza y Donaldson 2018, p. 5). Existe evidencia clara que las complicaciones de la cardiopatía coronaria, entre las que se incluyen angina de pecho, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva y muerte súbita, representan una complicación importante de la DM-1 y DM-2. Los pacientes con DM-2 suele desarrollar la cardiopatía coronaria en la quinta o sexta semana, a menudo tras un periodo relativamente corto

desde el diagnóstico de la intolerancia a la glucosa, suele asociar disfunción endotelial generalizada, así como anomalías de los vasos de pequeño calibre (Soiza & Donaldson 2018, p. 6).

Insuficiencia cardíaca.

Es una enfermedad muy prevalente, sobre todo en ancianos, como la cardiopatía hipertensiva y la cardiopatía isquémica. La presencia de DM multiplica varias veces el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Más de la mitad de los pacientes con DM-2 pueden presentar disfunción ventricular y acelerar la progresión hasta fallo sistólico. Además, se han descrito múltiples alteraciones del corazón diabético, como la presencia de la fibrosis intersticial y perivascular, edema intersticial, lesiones microvasculares, aneurisma y engrosamiento de la membrana basal. Todos estos factores hacen que el corazón del diabético sea muy propenso a padecer insuficiencia cardíaca (Soiza & Donaldson 2018, p. 6).

Enfermedad cerebrovascular.

Es una de las patologías estrechamente relacionadas con la presión arterial sistólica alta, por lo cual se aconseja un control sistémico de la tensión en los diabéticos. La presencia de hipertrofia del ventrículo izquierdo, es un factor predisponente para tener un accidente cerebrovascular (ACV) (Soiza & Donaldson 2018, p. 6).

Pie diabético.

Es una alteración anatómica o funcional determinada por una anomalía neurológica en pacientes diabéticos, que le confiere a éste una mayor susceptibilidad de presentar infecciones, ulceraciones del tejido del pie y destrucción del tejido profundo, en ocasiones requieren amputación de las extremidades. Se caracteriza por la acumulación de la glucosa en los vasos sanguíneos que irrigan la zona del pie y que además se convierte en un gran sustrato para el desarrollo de microorganismos, llegando a producir necrosis tisular en el área de afección, por lo cual es importante un control y seguimiento exhaustivo de los pies en pacientes diabéticos (Mishra 2017, p. 3).

1.6.4. Tratamiento de la diabetes

1.6.4.1. Tratamiento farmacológico

Para el tratamiento de la DM-2 se encuentra disponible varias terapias farmacológicas tabla 5-1, con diferentes mecanismos de acción como: los secretagogos (sulfonilureas, meglitinidas), que estimulan la secreción de la insulina por las células β pancreáticas, los sensibilizadores de la insulina (biguanidas, tiazolidinedionas), los inhibidores de la α - glucosidasa (acarbossa), que retrasan la digestión y absorción de los carbohidratos de la dieta, por ende alivia la hiperglucemia postprandial (Lankatillake & Días 2019, p. 34).

Actualmente, los secretagogos y sensibilizadores de la insulina son las clases de terapias antidiabéticas más ampliamente prescritas. De las biguanidas, la metformina, es el medicamento para la DM2 más común y se prescribe como una terapia de primera línea para pacientes con diabetes con sobrepeso u obesidad (Lankatillake & Días 2019, p. 36).

Al existir una amplia gama de agentes antihiper glucémicos disponibles, los médicos pueden seleccionar una terapia o coterapias apropiadas según los requisitos del paciente, teniendo en cuenta los efectos secundarios que presentan los diversos medicamentos, por lo que es indispensable contar con terapias alternativas y efectivas con efectos secundarios lo menos dañinos posibles.

Tabla 5-1: Clasificación de hipoglucemiantes y sus mecanismos de acción

CLASIFICACIÓN		MODO DE ACCIÓN	EFECTOS
Sulfonilureas:	Tolbutamida, Glipizida, Gliburida, Glimepirida.	Aumenta la secreción de insulina pancreática.	Hipoglucemia Aumento de peso Mayor riesgo de ECV
Meglitinidas	Repaglinida, nateglinida	Aumenta la secreción de insulina pancreática	Según las sulfonilureas
Biguanidas	Metformina	Aumenta la sensibilidad a la insulina Reduce la producción de glucosa hepática	Problemas gastrointestinales Sabor metálico Posible deterioro de la absorción de vitamina B12 y B9 Acidosis láctica Riesgo de hipoglucemia en terapia combinada
Tiazolidinedionas (glitazonas)	Pioglitazona, Rosiglitazona	Aumentar la sensibilidad a la insulina	Hepatotoxicidad Aumento de peso. Retención de líquidos Insuficiencia cardíaca congestiva Fracturas óseas
Inhibidores de la α- glucosidasa	Acarbosa	Reduce la absorción de carbohidratos en la dieta.	Trastornos gastrointestinales: flatulencia,

			diarrea
Incretin miméticos / agonistas de GLP-1R	Exenatida, Liraglutida	Retraso de vaciado gástrico	Náuseas, Vómitos, Diarrea
Inhibidores de la DPP-4 potenciadores de la incretina	Sitagliptina, Vildagliptina.	Retraso de vaciado gástrico	Mayor riesgo de infección Dolor de cabeza
Inhibidores de SGLT-2	Dapagliflozina, Empagliflozina, Ertugliflozina	Reduce la reabsorción de glucosa en los riñones	Mayor riesgo de infecciones del tracto urinario Riesgo de cetoacidosis
Co-inhibidores de SGLT-1/2	-----	Reduce la reabsorción de glucosa en los riñones. Retrasa la absorción intestinal de glucosa.	Mayor riesgo de infecciones del tracto urinario Riesgo de cetoacidosis Diarrea

Fuente: Hipoglucemiantes Springer 2020)

Elaborado por: Bueno P, Segundo 2020

1.6.4.2. Tratamiento no farmacológico

Las principales medidas no farmacológicas implicadas en el tratamiento de la diabetes incluyen el control en la dieta y el ejercicio; estas dos medidas aplicadas apropiadamente son suficientes durante las primeras etapas de la enfermedad. La dieta adecuada para los pacientes diabéticos se basa en una disminución en la ingesta de grasas y carbohidratos, lo cual se logra adoptando dietas bajas en calorías. Mientras que la actividad física contribuye a regular el consumo de glucosa del cuerpo, disminuye la resistencia a la insulina logrando una mejor respuesta de las células a esta hormona.

1.7. Insulina y receptores de la insulina

La insulina es una hormona peptídica anabólica, cuya estructura consiste en un heterodímero de dos cadenas compuesto por una cadena A de 21 residuos y una cadena B de 30 residuos unidas entre sí con dos enlaces disulfuro formados entre los residuos de cisteína A7-B7 y A20 -B19. En la figura 7-1, se puede observar **a.** Insulina humana: secuencia de aminoácidos, **b.** estructura tridimensional, **c.** estructura simplificada del receptor de insulina.

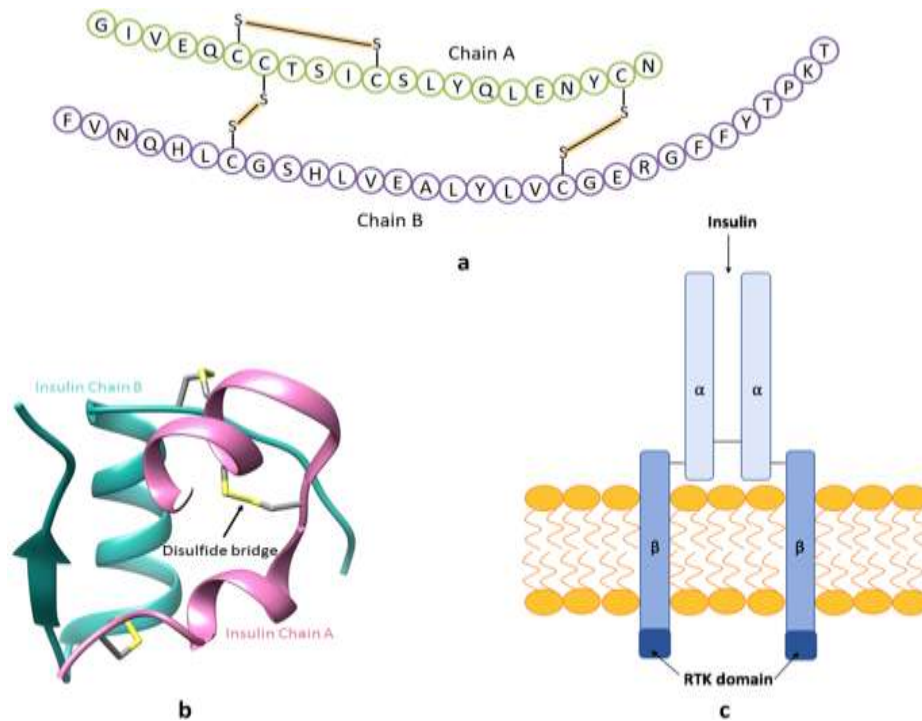


Figura 7-1: Estructura de la Insulina

Fuente: (Lankatillake, Huynh y Dias, 2019)

Cabe indicar que la insulina produce efectos celulares cuando se une al receptor específico en la superficie celular, e inicia la cascada de transducción de señales intracelulares. El receptor de insulina (INS-R) pertenece a la superfamilia de receptores de tirosina quinasa (RTK) de proteínas transmembrana y está compuesto por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana unidas mediante enlaces disulfuro para formar un heterodímero $\alpha_2\beta_2$ (Lankatillake & Días 2019, p. 35).

1.7.1. Mecanismo de secreción de insulina

- La glucosa entra en las células β pancreáticas a través de los transportadores GLUT2.
- El metabolismo intracelular de la glucosa aumenta la cantidad de ATP, se inhibe el flujo de K^+ . Éste despolariza las células β y abre los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje.
- El flujo de Ca^{2+} estimula la secreción de insulina y péptido C hacia la sangre.

Además de la glucosa en sangre, las incretinas derivadas del intestino (GIP) y el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) junto con los aminoácidos sanguíneos, ácidos grasos, y la acetilcolina, estimulan la secreción de insulina figura 5-1 (b). Un factor común la ingesta de alimentos que actúa como un estímulo para el aumento de la producción y secreción de insulina. Posteriormente, el glucagón puede estimular también la secreción de insulina mediante el incremento del Ca^{2+} intracelular (vía fosfolipasa C), ésta molécula modula los efectos hiperglucémicos del glucagón (Lankatillake & Huynh 2019, p. 39).

La secreción de insulina se suprime cuando la concentración de glucosa en sangre es baja, de igual forma cuando el SN simpático es estimulado (noradrenalina y adrenalina elevadas), y cuando la somatostatina local está elevada (Lankatillake & Huynh 2019, p. 40).

Glucagón

Hormona peptídica de 29 aminoácidos producida como una prohormona en las células α de los islotes de Langerhans. Como con la insulina, el procesamiento intracelular da lugar a una vesícula de moléculas de glucagón activo con un núcleo de gránulos densos (Joshi & Standl 2015, p. 1970).

El glucagón actúa movilizandando la glucosa hacia la sangre (acción opuesta a la insulina); la secreción de glucagón es estimulada principalmente por una baja concentración de glucosa en sangre. La insulina inhibe la secreción de glucagón en un mecanismo paracrino (Joshi & Standl 2015, p. 1971).

Somatostatina

Es un péptido de 14 aminoácidos producido en las células δ de los islotes y actúa de forma paracrino para suprimir tanto la insulina como el glucagón; ésta añade un mecanismo más de control en la modulación de las concentraciones de glucosa. La somatostatina producida en el páncreas es la misma hormona que se produce en el cerebro y el intestino, y como en estos tejidos, actúa localmente sobre las células adyacentes (Joshi & Standl 2015, p. 1971).

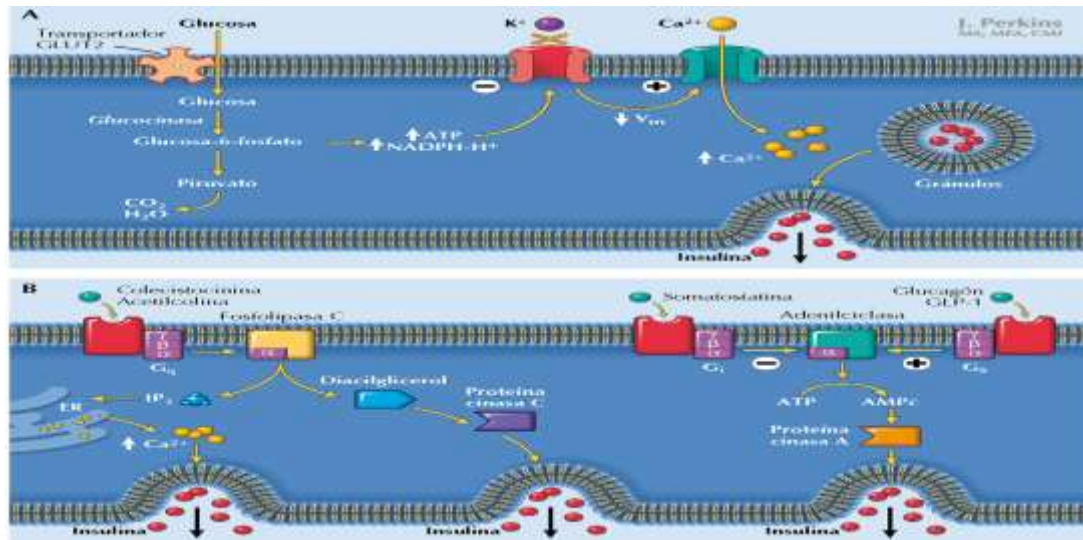


Figura 8-1: Síntesis y liberación de insulina

Fuente: Springer 2019. Liberación de Insulina

La glucosa es el factor regulador más importante para la síntesis y secreción de insulina, aunque los péptidos gastrointestinales, el glucagón y la somatostatina local también contribuyen a la modulación y la liberación. En la figura 8-1: A representa la acción de la glucosa al aumentar el flujo de Ca^{2+} , el cual estimula la secreción de insulina. B ilustra la estimulación de la secreción de insulina, mediada por el receptor, por el glucagón local, los péptidos intestinales (CCK y GLP-1), y la ACh, y la inhibición de la insulina por la somatostatina local. Siendo ACh: acetilcolina; CCK: colecistocinina; GLP: péptido similar al glucagón (Joshi & Standl 2015, p. 1971)

1.8. Modelo de inducción de diabetes mediante administración de fármacos

Modelos in vivo son imprescindibles en los distintos estudios e investigaciones en medicina, para entender los diferentes mecanismos que se producen, trata y previene un sin número de enfermedades que éticamente no se puede experimentar en humanos. Es complicado de obtener resultados óptimos al extrapolar clínicamente en humanos, pero proporciona información muy importante sobre el tema estudiado.

El empleo de animales de experimentación ha sido registrado a través de la historia de la ciencia, ya que son muchas enfermedades y los mecanismos de los fármacos que han sido esclarecidos en modelos con anatomía similar al humano. El uso de estos presenta grandes ventajas, por la facilidad de manipulación e inducción a enfermedades en investigación; lo cual es dificultoso realizar en

humanos. Además los modelos animales con diabetes inducida químicamente son los modelos más utilizados para seleccionar plantas y productos naturales en busca de la actividad antihiper glucémica (Lankatillake & Huynh 2019, p. 34).

1.8.1. Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ) figura 9-1, ha sido aislada a finales de la década de 1950 de una cepa bacteriana del suelo (*Streptomyces achromogenes*), patentada e inicialmente desarrollada como antibiótico y después como agente anticancerígeno. Hasta hoy en día, se utiliza de forma esporádica en la terapia junto con múltiples medicamentos para el tratamiento de tumores neuroendocrinos raros (Grieb 2016, p. 1744).

La STZ, es un compuesto glucosamina-nitrosourea, derivado de las bacterias y desarrollado originalmente como agente anticancerígeno, en 1963 se descubrió que induce diabetes en animales de experimentación. Desde entonces, la aplicación sistémica de STZ se convirtió en el modelo experimental más frecuentemente estudiado de diabetes insulino dependiente (DM-1) (Grieb 2016, p. 1742).

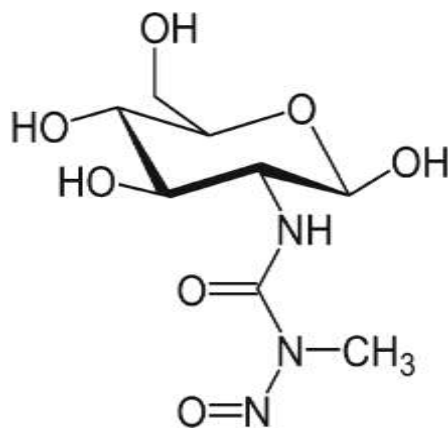


Figura 9-1: Estructura química de la estreptozotocina

Fuente: Springer, 2019. Estreptozotocina

Cabe indicar que a diferencia de otras nitrosoureas que son lipófilas y son absorbidas rápidamente por las células, la STZ debido a la sustitución de hexosa es menos lipofílica y requiere un transportador de glucosa particular, GLUT2, para atravesar las membranas celulares (Grieb 2016, p. 1744). La selectividad de STZ hacia las células β productora de insulina en el páncreas se explica por la presencia de GLUT2 en las membranas de las células vulnerables (Grieb 2016, p. 1744).

Actúa intracelularmente resto de STZ alquila ADN; la muerte celular, que ocurre por necrosis, es debido la activación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) con el consiguiente agotamiento de NAD⁺ y finalmente el agotamiento de las reservas de ATP (Lankatillake-Hunynh 2019, p. 35). Además de las células β pancreáticas productoras de insulina, la STZ es tóxica para otros órganos que expresan el transportador GLUT2, particularmente el riñón y el hígado. El cerebro no se ve afectado directamente porque STZ no puede penetrar la barrera hematoencefálica (BHE) que carece de transportador GLUT2 (Lankatillake & Huynh 2019, p. 35).

1.8.1.1. Mecanismo de acción

En la actualidad, se han propuesto diferentes mecanismos de acción para la estreptozotocina (STZ), tales como:

- ✓ Alquilación del ADN, dado que la STZ opera como donador de óxido nítrico (NO) en los islotes pancreáticos, induciendo la muerte de las células β .
- ✓ Destrucción autoinmune de las células β .
- ✓ Inhibición de las enzimas N-acetil-beta-D-glucosaminidasa que cataliza la ruptura de N-acetilglucosamina unida a una proteína de 135 kD enlazada por un oxígeno (O-glicosilación). Comparadas con otras células, las β producen más cantidad de esta enzima por lo que puede ser particularmente sensible a los efectos del compuesto (Amaya & Chávez 2007, p. 6).

1.8.2. Alloxano

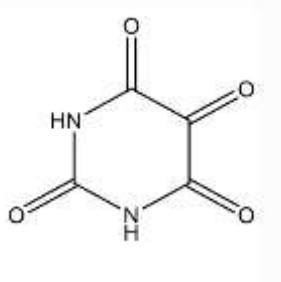


Figura 10-1: Estructura química de Alloxano

Fuente: Springer, 2019. Alloxano

El alloxano (ALX) figura 10-1, es una sustancia química utilizada con el mismo fin que la STZ, inducir la diabetes en modelos experimentales, principal problema del uso de estos compuestos químicos es la falta de la selectividad. La diabetes inducida por ALX es insulino dependiente, ya que este compuesto produce especies reactivas del oxígeno (ROS) en presencia de tioles que resultan en la muerte necrótica de las células β . Esto hace que los modelos animales inducido por ALX sean útiles para el estudio de la citotoxicidad mediada por ROS en las células β . La inhibición de la glucoquinasa por el alloxano inhibe la secreción de la insulina estimulada por glucosa en las células β pancreáticas. Por lo tanto, es adecuado para investigar agentes antidiabéticos en los que mecanismo de acción es independiente a la actividad de las células β .

1.9. Acarbosa

La figura 11-1 indica la estructura de la acarbosa, la cual es un inhibidor de la α -glucosidasa, corresponde a una familia de enzimas responsables de la hidrólisis de los carbohidratos en el aparato digestivo, dichas enzimas están localizadas principalmente en el borde de las vellosidades del intestino delgado (ID), y su inhibición produce un retraso en la digestión de los carbohidratos cuya absorción se extiende. Esto significa que la elevación postprandial de la glucemia se reduce y se prolonga, pues no produce su malabsorción. La colisión que esta disminuya en la glucosa postprandial tiene sobre el control metabólico de la DM ha sido bastante controvertido, y aunque es admitida su efectividad, no está totalmente determinado en qué instante y en qué tipo de diabetes debe ser empleado. Además hay autores que indican que la acarbosa no lleva a tener los valores hipoglucemia. Cabe indicar que los efectos secundarios que provocan por la ingesta de este fármaco es el meteorismo por ende ha limitado de una forma sustancial su utilización (Calle & Charro 2001, p. 232).

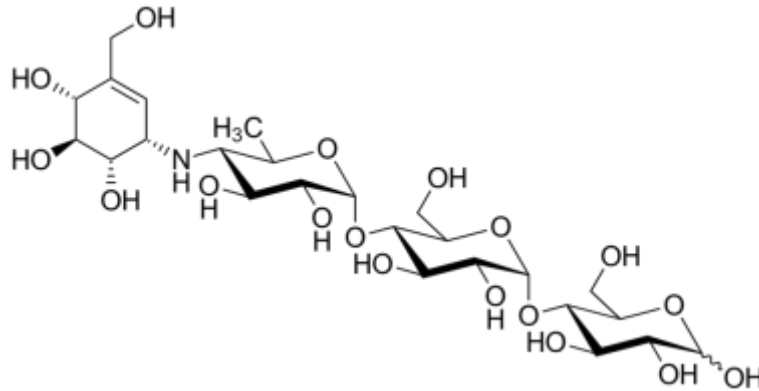


Figura 11-1: Estructura química de la Acarbosa

Fuente: BioMed Research International 2013 Acarbosa

En forma de medicamento se administra por vía oral y es un antihiper glucemiante, produce una mejoría del control metabólico de la DM disminuyendo así la respuesta glucémica postprandial. Dosis empleados varia de 25, 50, 100 y hasta 200 mg según el requerimiento del paciente (Calle & Charro 2001, p. 232).

1.10. Nicotinamida

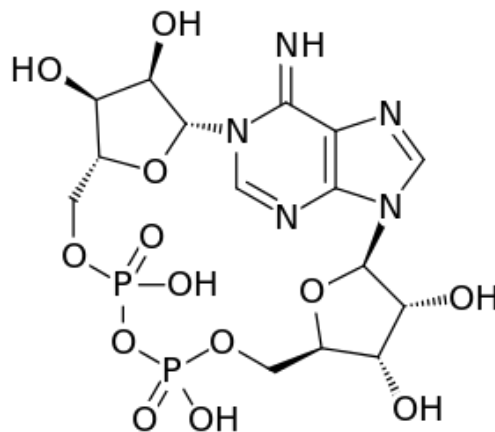


Figura 12-1: Estructura química de Nicotinamida

Fuente: Elsevier 2018. Nicotinamida

La nicotinamida (NAD) figura 12-1, es la vitamina B3 juega un papel importante durante la embriogénesis y en la diferenciación de la célula madre a varios fenotipos, incluidas las del sistema nervioso central (SNC) (Meng & Faxiang 2018, p. 1348). La nicotinamida regula la señalización en las células de mamíferos para que sobrevivan y proliferen adecuadamente con sus funciones. Se cree convencionalmente que los nutrientes actúan solo como cofactores enzimáticos o fuentes de

energía. También la NAD actúa como coenzima en múltiples procesos celulares, incluido en el metabolismo energético y la reparación del ADN (Meng & Faxiang 2018, p. 1348).

La ingesta de altas dosis de niacina, produce un bloqueo o disminución de la lipólisis en el tejido adiposo, alterando así los niveles de lípidos en sangre (Rodríguez & Cuatle 2017, p. 87).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

Dentro del experimento se aplicó los siguientes tipos de investigaciones:

- ✓ Experimental: porque se realizó comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control.
- ✓ Prospectivo: porque en el registro de la información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.
- ✓ Longitudinal: porque se estudiaron las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación (7 días).

2.2. Diseño de la investigación

2.2.1. *Diseño experimental de diabetes mellitus tipo 2 (DM-2)*

El ensayo pre-clínico se realizó con animales de experimentación *Mus musculus* de la cepa BALB/c machos, con peso corporal de 25-35 gramos, a los cuales se les administró estreptozotocina (STZ) para inducir diabetes, posteriormente se lo dividió en grupos y se trató con extractos hidroalcohólicos de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa) a dosis de 30 y 60 mg/kg de peso corporal durante 7 días, se utilizó grupo control positivo con acarbosa 100 mg/kg, un grupo control negativo STZ y un grupo blanco, las dos últimas no recibieron ningún tratamiento.

2.3. Identificación de variables

2.3.1. Variables independientes

Dosis efectiva de los extractos hidroalcohólicos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa)

2.3.2. Variables dependientes

Actividad hipoglucemiante en ratones (*Mus musculus*).

2.4. Planteamiento de la hipótesis

El extracto hidroalcohólico de las hojas y fruto *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa) presenta acción hipoglucemiante en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina (STZ).

2.5. Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio Productos Naturales y en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

2.5.1. Población del estudio

Población vegetal

Constituida por la planta entera de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa), empleó aproximadamente 1 kilogramo de material vegetal indicada anteriormente.

Población animal

Constituidas por ratones *Mus Musculus* de la cepa BALB/c machos, con peso promedio de 25-35 gr procedentes del INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA “DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ” (INSPI), de la ciudad de Guayaquil.

2.5.2. Tamaño de la muestra

Se empleó 63 ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c machos, con peso promedio de 25-35 gramos procedentes del INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA “DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ” (INSPI), de la ciudad de Guayaquil, con certificado de salud.

Muestra: se utilizaron 9 grupos de ratones de los cuales fueron distribuidos en 7 cada uno, con un total de 63 animales. La selección de espécimen se hizo al azar, como se detalla en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Distribución de los grupos de estudio según esquema de tratamiento

DIABETES TIPO II			
Grupos experimentales	Dosis ensayadas	N° de animales	Vía de administración
Blanco	NA	7	NA
Control (-) STZ	NA	7	NA
Control (+) Acarbosa	100 mg/Kg	7	Oral
Extracto fruto	30 mg/Kg	7	Oral
Extracto fruto	60 mg/Kg	7	Oral
Extracto hojas	30 mg/Kg	7	Oral
Extracto hojas	60 mg/Kg	7	Oral
Extracto S.S	30 mg/Kg	7	Oral
Extracto S:S	60 mg/Kg	7	Oral

Fuente: Esquema de tratamientos de los modelos biológicos

Elaborado por: Bueno P, Segundo, 2020

Dónde:

Vehículo: SSF solución salina fisiológica

Tratamiento: Extractos de hojas y fruto en distintas concentraciones (30-60 mg/kg).

SS: extracto de solución salina del fruto.

2.6. Selección de la muestra

Criterio de inclusión: Especie vegetal en mejores condiciones, vigorosidad, buen estado, frescas con superficies integrales de hojas y fruto. Plantas jóvenes de tamaño adecuado y accesible.

Criterios de exclusión: plantas que presentan daños por acción de los insectos y microorganismos o condiciones externas. Ejemplares que muestren deterioros por agua o viento, además plantas que presenten proceso de descomposición.

2.7. Recolección del material vegetal

El material vegetal fue proporcionado por el grupo de investigación GIADE, recolectada en los viveros de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

2.8. Reactivo biológico

Para la evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de *Syncepalum dulcificum* (fruta milagrosa) se empleó como reactivo biológico ratones albinos de laboratorio de la cepa BALB/c (*Mus musculus*).

Descripción de los animales de experimentación

- ✓ Peso: 25-35 g.
- ✓ Edad: 3-4 meses de vida
- ✓ Sexo: machos
- ✓ Lugar de nacimiento: Bioterio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

Condiciones ambientales

Temperatura: 25±2 °C

Humedad relativa: 45±5%

Fotoperiodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad

Agua y comida: *and libitum*

Cama con tamo esterilizado: Cambio cada 48 horas

Tiempo de ambientación 15 días

2.9. Técnicas de recolección de datos

Para evaluar la actividad hipoglucemiante se tomó las muestras de sangre de la vena caudal (cola del animal) en ayunas con ayuda de una lanceta después de 72 horas de haber inducido la diabetes con STZ, posteriormente se colocó una micro gota de sangre en un extremo de la tira reactiva marca ACCU-CHEK y se midió los niveles de la glucosa.

2.10. Equipos, materiales y reactivos

2.10.1. Equipos

- ✓ Balanza analítica Radwang S220. R2
- ✓ Molino Arthur H. Thomas
- ✓ Estufa RE 115
- ✓ Rotavapor BUCHI CH-9230 FLAWIL-SCHWEIZ
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Sonicador Cole-Parmer
- ✓ pH- metro (HANNA INSTRUMENT)
- ✓ Cámara UV
- ✓ Cámara fotográfica (Huawei)

✓ Computadora Lenovo

✓ Refrigeradora

2.10.2. Materiales

✓ Vasos de precipitación de 100, 250 y 500 mL

✓ Embudo de separación de 250 mL

✓ Balón de aforo de 10 mL

✓ Pinza universal

✓ Soporte universal

✓ Picnómetro

✓ Balón esmerilado de 500 mL

✓ Probeta de 50, 100 y 1000 mL

✓ Pipetas de 1, 5, 10 mL

✓ Pisseta

✓ Embudos

✓ Trípode

✓ Termómetro

✓ Espátula

✓ Pera de succión

✓ Varilla de vidrio

✓ Manguera para refrigerante

✓ Tubos de ensayo

✓ Gradilla

- ✓ Reverbero eléctrico
- ✓ Malla metálica
- ✓ Pinza para tubos
- ✓ Equipo de destilación
- ✓ Refrigerante
- ✓ Papel filtro
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Jeringuillas de 1 mL (NYPRO)
- ✓ Cánula dosificadora
- ✓ Franela
- ✓ Guantes de manejo
- ✓ Frascos de color ámbar 50 y 750 mL
- ✓ Filtro de 0,22 μ m
- ✓ Cofia
- ✓ Zapatones
- ✓ Mascarilla
- ✓ Lancetas
- ✓ Tiras reactivas ACCU-CHEK Instant

2.10.3. Reactivos

- ✓ Trisodio citrato dihidratado (Merck)
- ✓ Ácido cítrico monohidratado (Merck)
- ✓ Acarbosa (Sigma-Aldrich)

- ✓ Estreptozotocina (SANRUI_streptozotocin)
- ✓ Nicotinamida (Merck)
- ✓ Etanol al 96%
- ✓ Agua destilada
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Cloruro de aluminio
- ✓ Solución de ácido gálico
- ✓ Nitrato de sodio al 5%
- ✓ Tricloruro de aluminio al 10%
- ✓ Carbonato de sodio 20%
- ✓ Eter etílico
- ✓ Ácido acético
- ✓ Reactivo de dragendorff
- ✓ Reactivo de wagner
- ✓ Cloroformo
- ✓ Ácido sulfúrico
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Hidróxido de sodio
- ✓ Hidróxido de potasio
- ✓ Reactivo de baljet
- ✓ Reactivo de sudan III
- ✓ Cloruro férrico
- ✓ Cloruro de sodio

- ✓ Magnesio metálico
- ✓ Alcohol amílico
- ✓ Reactivo de fehling

2.11. Métodos y técnicas

2.11.1. Acondicionamiento de la materia vegetal

Se realizó la limpieza del material vegetal se descartó las hojas y fruto deteriorados, posteriormente se desecaron a una temperatura de 40°C en una estufa con circulación de aire durante 3 días. Se trituró la muestra en un molino de cuchillas, para la obtención de un tamaño de partícula aproximado de 2-3 mm. El material seco fue almacenado en fundas plásticas ziploc a temperatura ambiente.

2.11.2. Obtención del extracto hidroalcohólico

A 50 gramos de la muestra seca y molida de *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa) se añadió 500 mL de etanol al 70%, el extracto se realizó por duplicado y se maceró durante 48 horas con agitación de tres veces al día, el producto se conserva en un frasco de color ámbar.

La maceración obtenida se filtró al vacío, posteriormente la muestra se concentró en un rota-vapor a una temperatura no mayor de 50°C, se evaporó el exceso de alcohol y se obtuvo finalmente el concentrado del extracto hidroalcohólico.

2.11.3. Control de calidad del extracto hidroalcohólico

Para realizar el control de calidad del extracto hidroalcohólico se efectuó en base a las Normas Rames de Salud Pública de Drogas Crudas 312 de Cuba (CECMED, 2002), y se verificó las siguientes pruebas de requisitos Organolépticos como aspecto, turbidez, color y olor.

2.11.4. Tamizaje fitoquímico

Mediante el tamizaje fitoquímico se consiguió determinar e identificar cualitativamente los metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides/terpenoides, taninos y fenoles, quinonas, grasas,

lactonas y cumarinas, catequinas, azúcares reductores, resinas, aminoácidos, saponinas, flavonoides, mucílagos y principios amargos) presentes en el extracto de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa). Para lo cual, se pesó de 30-50 gramos de material vegetal seco y se maceró durante 48 horas con diferentes compuestos de polaridad creciente éter etílico, posteriormente con etanol y terminando con agua destilada. Asegurándose que las extracciones vayan de menor polaridad a mayor polaridad. En las figuras 1, 2,3-2 se detalla proceso a seguir.

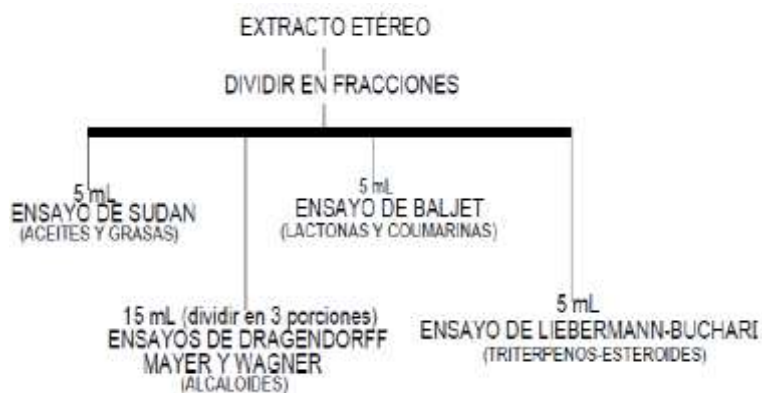


Figura 1-2: Ensayo a realizar en el extracto etéreo

Fuente: (Miranda y cuéllar 2011, p.40)



Figura 2-2: Ensayo a realizar en el extracto alcohólico

Fuente: (Miranda y cuéllar 2011, p.40)



Figura 3-2: Ensayo a realizar en el extracto acuoso

Fuente: (Miranda y cuellar 2011, p.41)

2.11.5. Cromatografía en capa fina (TLC)

Para la separación de flavonoides siguió el método de Hildebert Wagner y Sabine Bladt (Hildebert Wagner & Sabine Bladt 1996, p. 196). Para lo cual, sobre placas de TLC se depositaron aproximadamente 10µL del extracto de *Synsepalum dulcificum*. Para la elución se preparó la fase móvil constituida por acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26). Posteriormente para la visualización de la placa se empleó una cámara UV de 750nm. Finalmente, se calculó el Rf (factor de retardo) a través de la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{D_R}{D_{FM}}$$

Dónde:

D_R : Distancia recorrida por el soluto (cm)

D_{FM} : distancia recorrida por la fase móvil (cm)

2.11.6. Evaluación de la actividad hipoglucemiante

Para la evaluación de la actividad hipoglucemiante se indujo diabetes a los modelos experimentales con estreptozotocina (STZ), el procedimiento fue propuesto por Rakietyen. El fundamento de esta técnica se basa en la administración intraperitoneal de una solución de estreptozotocina antibiótica en ratones, la estreptozotocina resulta ser citotóxica para las células β del páncreas (metila el ADN,

dado que la STZ opera como donador de óxido nítrico), e induce la muerte de las células β , los efectos causados por la estreptozotocina se alivia con la administración de nicotinamida, que inhibe la poli (ADP-ribosa) sintetasa y evita el agotamiento de NAD⁺ en células β pancreáticas.

2.11.7. Inducción de diabetes en ratones (*Mus musculus*)

Para inducir la diabetes moderada o tipo II en los modelos biológicos se administró nicotinamida (NAD) disuelta en buffer citrato 0.1 M (pH 4.5), en una dosis de 100 mg/kg, 15 minutos después de la administración se inyectó 150 mg/kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en solución de buffer citrato 0.1 M (pH 4.5), la administración de ambas sustancias fue única. Con lo cual se obtuvo un daño parcial de las células β del páncreas, con un 40% de producción de insulina residual. La administración se realizó por vía intraperitoneal de acuerdo con el peso del animal.

2.11.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa MINITAB versión 19 y el programa Graphpad Prism 8 para una mejor visualización de la gráfica. El test de ANOVA permitió identificar si existe diferencias significativas entre los tratamientos administrados, con un probabilidad $P < 0,05$. Para lo cual se consideró la siguiente hipótesis.

H_0 : no existe diferencia significativa entre los tratamientos administrados a los modelos experimentales $P > 0,05$

H_1 : existe diferencia significativa por lo menos en uno de los tratamientos administrados $P < 0,05$

En caso de existir diferencias significativas, se procede a realizar el test Tukey que determina cuál de los tratamientos presenta una diferencia significativa.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIONES

3.1. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó a través de estimaciones bioquímicas de coloración y precipitación para detectar la presencia de diferentes metabolitos secundarios en los extractos de hojas y frutos de *Synsepalum dulcificum* se utilizó solventes de polaridad creciente: éter dietílico, etanol y agua destilada. En la tabla 1-3 se muestran los compuestos presentes.

Tabla 1-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de hojas de *S. dulcificum*.

ENSAYOS	TIPO METABOLITOS	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudan	Aceites y grasas	-	+	NA
Dragendorf	Alcaloides	-	++	++
Mayer	Alcaloides	-	++	-
Wagner	Alcaloides	-	++	+
Baljet	Cumarinas	+	++	NA
Lieberman-buchard	Terpenos-esteroides	+	+	NA
Catequinas	Catequinas	NA	+	NA
Resinas	Resina	NA	+	NA
Fehling	Azúcares reductores	NA	-	-
Espuma	Saponina	NA	+	+
Cl ₃ Fe	Fenoles y taninos	NA	Verde intenso	Verde
Borntrager	Quinonas	NA	+++	NA
Shidona	Flavonoides	NA	+++	++
Antocianidinas	Flavonoides	NA	+++	+
Ninhidrina	Aminoácidos libres	NA	-	NA
Mucílagos	Polisacáridos	NA	NA	+
Principios amargos	Principios amargos	NA	NA	Poco picante y amargo

+++ : Reacción de gran intensidad; ++ : Reacción de mediana intensidad; + : Reacción de baja intensidad; - : No detectado; NA: No aplica.

Elaborado por: Bueno P, Segundo, 2020

En la tabla 1-3, se observa los resultados del tamizaje fitoquímico; de las hojas de *Synsepalum dulcificum*, realizados sobre los tres extractos: Etéreo, hidroalcohólico y acuoso. Siendo compuestos grasos, alcaloides, cumarinas, terpenos-esteroides, catequinas, resinas, fenoles, taninos, quinonas, flavonoides, aminoácidos libres, polisacáridos y principios amargos los identificados.

En el extracto hidroalcohólico la prueba de Cloruro férrico da como resultado un color verde intenso, demostrando que existe la presencia de taninos de tipo pirocatecolicos. En el ensayo de Shidona que determina la presencia de flavonoides da como resultados en ambos extracto mayor presencia de este tipo de metabolitos. Así mismo en el ensayo de antocianidinas demuestra la presencia de flavonoides de tipo antocianos de alta y baja intensidad en extracto hidroalcohólico y acuoso.

También se observó la presencia de alcaloides en los dos extracto hidroalcohólico y acuoso, estos actúan principalmente sobre el sistema nervioso central, presenta actividad alucinógena y simpaticomimética, estos alcaloides en su estructura posee principalmente compuestos nitrogenados. Son empleados para disminuir los espasmos, calmando los dolores y secando las secreciones corporales (Pérez & Jimenez 2011, pp. 196–197).

Mediante el ensayo de Borntrager se determinó la presencia de quinonas en el extracto alcohólico, las plantas que contienen estos tipos de compuestos son especies vegetales que pueden comportarse como laxantes o como purgantes en dependencia de la dosis administrada.

Se observó la presencia de triterpenos-esteroides en extracto etéreo y hidroalcohólico de baja intensidad. Estos metabolitos tienen un amplio espectro de efectos biológicos que incluyen actividades antifúngicas, citotóxicas y hemolíticas (Pérez & Jiménez 2011, p. 197).

Finalmente se observó en el extracto acuoso la presencia de mucílagos y principios amargos, los mucílagos son polisacáridos heterogéneos mezcla de pentosa hexosa y ácido urónico, actúan en el organismo recubriendo las membranas mucosas del tracto digestivo y de esta manera lo protegen de la acidez, la irritación y la inflamación. Los principios amargos proporcionan un sabor amargo y desagradable al extracto, pero estimula las secreciones cloropépticas y de la motilidad gástrica, a dosis bajas (García & Días 2015, p. 41).

Los fenoles y flavonoides presentan diversas actividades biológicas y farmacológicas a nivel experimental, entre los cuales se destacan: antioxidante, antitumoral, antiviral, tripanomicida, y leishmanicida en cuanto a las actividades farmacológica se han reportado: antidiabéticas, hipoglucemiantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, hepatoprotectoras, ansiolíticas y anticonvulsivante, antiaminoloidogénica, neuroprotectora, antilipídémica, y antihipertensiva. Por otra parte, han demostrado experimentalmente la inhibición de enzimas como la topoisomerasa IV, santina oxidasa, aldosa reductasa, α -glucosidasa y amilasa transcripatasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), proteína quinasa C, tirosina quinasa, calmodulina, hexoquinasa, glucosa-6-fosfatasa, fosfolipasa A2 y 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I, solo por mencionar algunas (Gámbaro & Ellis 2012, pp. 318–319).

La capacidad antioxidante de los flavonoides ha sido reconocida en diversos estudios, ya que estos compuestos pueden unirse a las enzimas transportadoras de hormonas y al ADN. Además pueden quelar los iones metálicos como el Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, catalizar el transporte de electrones y depuran los radicales libres. Cabe indicar que probablemente la acción hipoglucemiante de estos extracto indicados en nuestro estudio, es gracias a la presencia de quercetina, ácido cafeico y el ácido clorogénico que tiene fuerte afinidad de unión a la glucoquinasa lo cual ya han sido identificada y estudiada en África mediante el análisis de acoplamiento molecular (Obafemi & Tajudeen 2017, p. 116).

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *S. dulcificum*.

ENSAYOS	TIPO METABOLITOS	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudan	Aceites y grasas	+	-	NA
Dragendorf	Alcaloides	++	++	+
Mayer	Alcaloides	+	++	+
Wagner	Alcaloides	+	+	-
Baljet	Cumarinas	+	+	NA
Liberman-buchard	Terpenos-esteroides	Verde oscuro	Verde intenso	NA
Catequinas	Catequina	NA	Mancha verde carmelita	NA
Resinas	Resina	NA	+	NA
Fehling	Azúcares reductores	NA	+	+
Espuma	Saponina	NA	+	+
Cl ₃ Fe	Fenoles y taninos	NA	Rojo-vino	Verde

Borotrager	Quinonas	NA	-	NA
Shidona	Flavonoides	NA	+	+
Antocianidinas	Flavonoides	NA	+	+
Ninhidrina	Aminoácidos libres	NA	-	NA
Mucílagos	Polisacáridos	NA	NA	-
Principios amargos	Principios amargos	NA	NA	Sabor ligeramente ácido

+++ : Reacción de gran intensidad; ++ : Reacción de mediana intensidad; + : Reacción de baja intensidad; - : No detectado; NA :

No aplica.

Elaborado por: Bueno P, Segundo 2020

En la tabla 2-3 se indica los resultados de tamizaje fotoquímico del extracto hidroalcohólico de *Synsepalum dulcificum* en fruto, según la técnica de Miranda y Cuellar encontrándose la presencia de alcaloides, cumarinas, terpenos, resina, azúcares reductores, saponina, fenoles y flavonoides de reacciones de mediana y de baja intensidad.

Los metabolitos analizados en el fruto se encuentran en menor cantidad lo cual debió ser que durante el tratamiento de secado se aplicó la temperatura en la que se pierde ciertos componentes como la proteína que se desnaturaliza, ya que estudios realizados para este tipo de investigaciones la fruta debe ser liofilizada en la que todos los componentes se mantienen, por esta razón en los resultados del tamizaje fotoquímico nos da muy baja intensidad de reacción de los metabolitos. En si la fruta tiene compuestos fenólicos y flavonoides que dan la actividad antioxidante.

Según estudios realizados de Huajun Jian y Fang Qiao, Jie Chen y Nongyue en 2017 artículo denominado “Caracterización fisicoquímica de polisacáridos de las semillas y fruto (*Synsepalum dulcificum*) y su actividades antioxidante e inhibidoras de la α -glucosidasa in vitro” en la que indican que la piel de la fruta contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides responsables de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa siempre y cuando la materia prima haya sido tratada en óptimas condiciones para que se mantenga dicha propiedad.

3.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Se realizó la identificación y separación de compuestos a través de la cromatografía en capa fina. Para la cual se empleó como fase móvil acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26) como se indica en la figura 1-3.

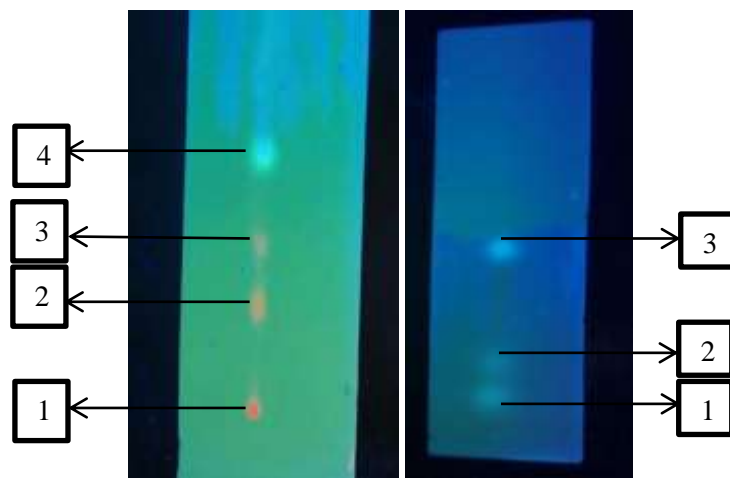


Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de extractos hidroalcohólicos *S. dulcificum* (izquierdo hojas derecho fruto).

Realizado por: Bueno P, Segundo 2020

Tabla 3-3: Posibles compuestos identificados en los extractos de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum*

Extractos	Compuestos	D_{FM} (cm)	D_R (cm)	Rf
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Synsepalum dulcificum</i>	1	7,3	2,6	0,35
	2	7,3	3,0	0,41
	3	7,3	4,4	0,60
	4	7,3	6,1	0,83
Extracto hidroalcohólico del fruto de <i>Synsepalum dulcificum</i>	1	5,1	0,8	0,16
	2	5,1	1,6	0,31
	3	5,1	2,7	0,53

Elaborado por: Bueno P, Segundo, 2020

Se comparó los Rf de referencia en función de la revisión bibliográfica de Wagner y Bladt (1996) se pudo identificar que los Rf de los extractos analizados coinciden con los siguientes compuestos: rutina, hiperósido, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y finalmente dos compuestos que comparten el mismo Rf que puede ser Q-3-O-glucósidos. Estudios realizados en HPLC por Obafemi, determinaron que las hojas de *Synsepalum dulcificum* presenta gran cantidad de fenoles y flavonoides (Obafemi *et al.*, 2017), los cuales se detallan a continuación:

- ✓ Quercetina 3-Ob-D-glucósido
- ✓ Quercetina 3-Ob-D-glucópiranosil-(1-2)-a-L-rhamnopyranosido
- ✓ Isorhamnetin 3- Ob-D-glucopyranosyl-(1-2)- a-L-rhamnopyranosido

La quercetina es un flavonoide con capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación de las células tumorales malignas (anticancerígeno potencial). Además, posee actividad antioxidante bloqueadora de los efectos causados por radicales libres y la oxidación.

La presencia de ácido clorogénico en esta especie de planta aumenta la actividad antioxidante, le otorga acción hipoglucemiante, antiviral, hepatoprotectora, y nutracéutica.

Tabla 4-3: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de *Synsepalum dulcificum* de hojas y fruto.

Parámetros	Resultados	
	Hojas	Fruto
Color	Verde oscuro	Rojo vino oscuro
Olor	Herbáceo	Aromático a fresa
Sabor	Astringente y amargo	Ligeramente ácido
Rendimiento	7,02%	5,14%

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

La presencia de sabores astringentes, ácidos y amargos se debe a la existencia de polifenoles, flavonoides y compuestos fenólicos. En cuanto al rendimiento de las plantas, se obtuvo un 7,02% en las hojas y 5,14% de rendimiento en el fruto.

3.3. Actividad hipoglucemiante *in vivo*

Para la evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum*, se empleó el modelo experimental descrito en la tabla 1-2. Se realizó una recolección sistemática y organizada de datos en función de diferentes horas y días (0, 1, 2, 3, 4, 5 hora; 3, 5, 7 días). Los modelos animales fueron agrupados de forma aleatoria y posteriormente fueron codificados (marca en la cola de diferentes colores) según el tratamiento que le correspondiese. Se

administró los diferentes extractos y controles, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 5-3 y 6-3

Tabla 5-3: Lecturas de glicemias a través de las horas en los ratones diabéticos

TRATAMIENTOS	PROMEDIO DE NIVELES DE GLUCOSA					
	TIEMPO DE MEDICIÓN					
	Basal mg/dL	1 hora mg/dL	2 hora mg/dL	3 hora mg/dL	4 hora mg/dL	5 hora mg/dL
Blanco	91,429	91,571	95,143	88,857	87,143	90,857
Control (-) STZ	211,143	214,857	225,429	227,857	229,000	231,000
Control (+) Acarbosa	207,857	199,286	192,286	177,429	144,571	127,857
Extrac. Fruta 30 mg/kg	224,714	216,000	202,143	188,429	172,714	161,714
Extrac. Fruta 60 mg/kg	215,286	208,714	199,000	185,571	168,286	158,000
Extrac. Hojas 30 mg/kg	229,286	208,143	197,286	168,429	128,000	104,000
Extrac. Hojas 60 mg/kg	215,714	202,857	175,286	151,143	120,286	105,714
Extrac. Solución S 30 mg/kg	213,714	211,143	206,571	197,429	189,857	186,143
Extrac. Solución S 60 mg/kg	200,143	198,286	196,143	194,571	190,571	184,286

Extrac. Hojas y fruto (*Synsepalum dulcificum*); Nivel de glucosa mg/dL

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

Tabla 6-3: Lecturas de glicemias a través de los días en los ratones diabéticos

TRATAMIENTOS	MEDIA DE NIVELES DE GLUCOSA		
	TIEMPO DE MEDICIÓN		
	3 días mg/dL	5 días mg/dL	7 días mg/dL
Control (-) STZ	226,630	228,714	238,541
Control (+) Acarbosa	179,143	129,857	116,714
Extrac. Fruta 30 mg/kg	183,428	168,429	159,714
Extrac. Fruta 60 mg/kg	189,571	168,857	148,143
Extrac. Hojas 30 mg/kg	182,187	122,714	110,286
Extrac. Hojas 60 mg/kg	151,143	115,429	106,714
Extrac. Solución S 30 mg/kg	189,429	192,714	180,217
Extrac. Solución S 60 mg/kg	194,143	188,143	187,493

Extrac. Hojas y fruto (*Synsepalum dulcificum*); Nivel de glucosa mg/dL

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

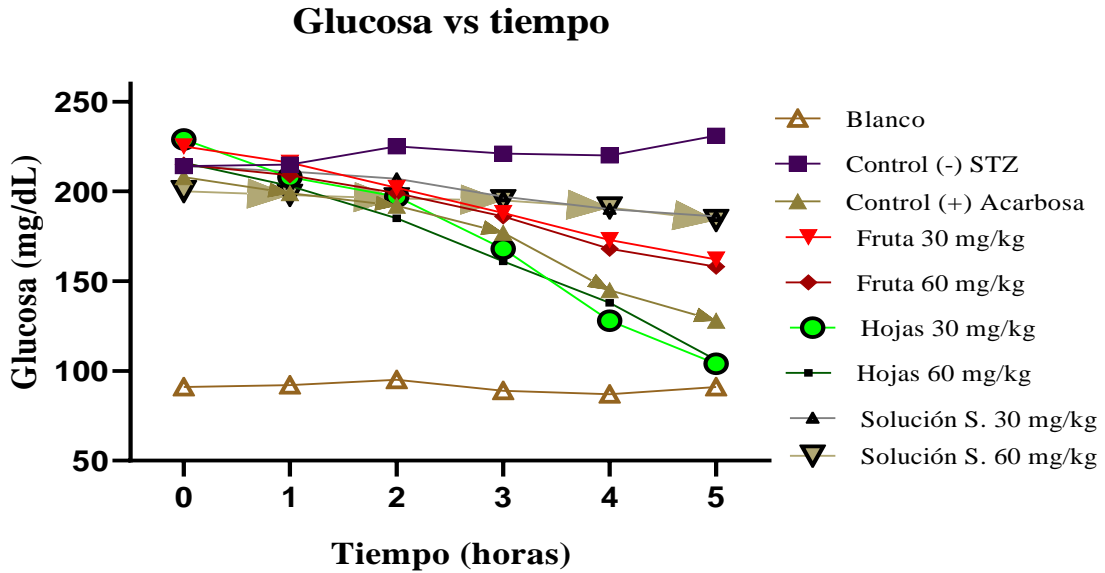


Gráfico 1-3: Concentración de nivel de glucosa en diferentes horas de medición.

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

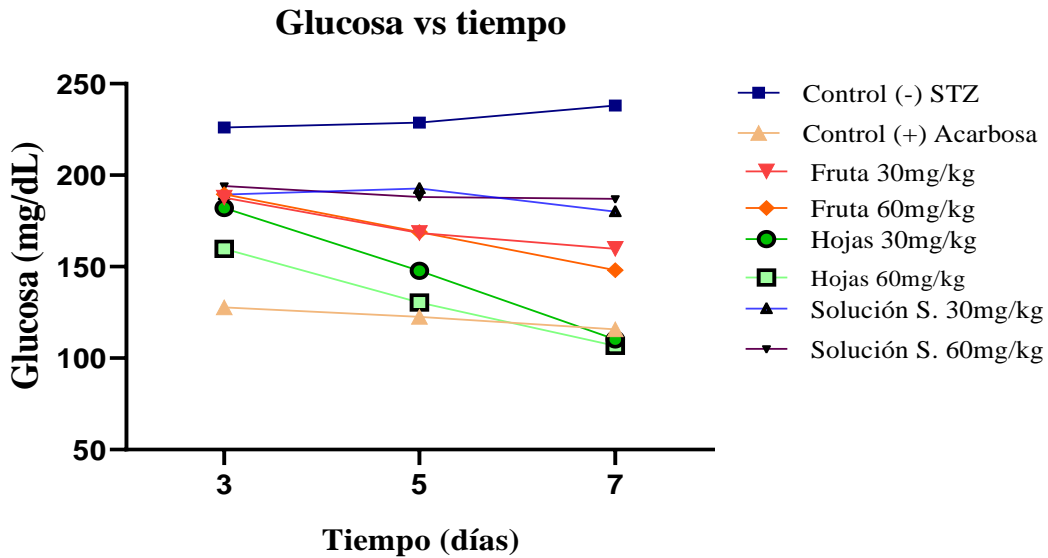


Gráfico 3-3: Concentración de niveles de glucosa en diferentes días.

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

En la tabla 5-3 y figura 2-3, se observa que a tiempo cero el grupo control negativo se inicia con niveles de 214,143 mg/dL de glucosa llegando así a la séptima hora a 231,000 mg/dL,

observándose el incremento de nivel de glucosa debido a que el daño de las células β del páncreas va en aumento ya que no hay presencia de antioxidantes que pueda proteger dichas células, como si se pueden observar en los grupos tratados con los extractos con posible presencias de flavonoides. Mientras que los grupos tratados con los extractos de 30 y 60 mg/kg a partir de la primera hora comienzan a disminuir la glucemia durante todas las horas de evaluación con respecto al grupo control negativo, sin embargo, no fue suficiente para normalizar los niveles de glucemia. El grupo tratado con acarbosa (control positivo), se inicia con 207 mg/dL de glucosa y a partir de la primera hora disminuye hasta valores de 127,857 mg/dL. En cuanto al grupo Solución S. de ambas concentraciones se observa que disminuye muy lento iniciando valores desde 213,714 mg/dL a 186,143 mg/dL. El grupo tratado con extracto de fruto de igual forma en las mismas concentraciones disminuyen los niveles de glucosa iniciando desde 224,714 mg/dL hasta 161,714 mg/dL sin embargo no llega a niveles deseados. Los extractos que tuvieron la mejor actividad e incluso al de control positivo fueron las hojas iniciando con nivel de glucosa de 215,714 mg/dL llegando hasta 105,714 mg/dL en la séptima hora de medición.

En la figura 3-3, se puede apreciar que los extractos elaborados de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum* a la dosis de 30 mg/kg y 60 mg/kg presentan cierta actividad antidiabética en comparación con el control negativo (STZ) el nivel de glucosa permanece > 200 mg/dL. Los extractos con mejor actividad hipoglucemiante son las hojas en comparación con el control positivo y con peor actividad son las de Solución S. de ambas concentraciones. Durante el tratamiento en los días 5 y 7 se observa mejor las diferencias entre distintos grupos administrados, de igual que el caso de medición en horas también en días los extractos que predomina son las hojas esto resultados se corrobora con los estudios realizados en Nigeria, en la que los posibles metabolitos presentes en los extractos tiene afinidad de unión a la glucoquinasa por ende los niveles de glucosa va descendiendo.

3.4. Análisis estadístico

Se realizó el test de ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos para lo cual se consideró los valores obtenidos en las diferentes horas y días, debido a que es el tiempo en el cual se observan los cambios de los niveles de glucosa después de la administración de los extractos. Si $p \geq 0,05$ se acepta la hipótesis nula concluyendo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si $p < 0,05$ se procede a realizar el test de Tukey donde se determina cuál de los tratamientos presenta diferencia significativa. Dando como resultado la siguiente tabla 6-3.

Tabla 6-3: Test de ANOVA para los tratamientos en función del tiempo.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p
Tratamientos	8	451571	5644,3	67,96	0,000
Error	369	306465	830,5		
Total	377	758035			

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

Según el análisis realizado y con un nivel de confianza del 95% se obtuvo un resultado de $p < 0,05$, por lo que se procede a rechazar la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa mostrando que sí existió actividad hipoglucemiante por efecto de algún tratamiento administrado. Por lo que se procedió a realizar el test de Tukey con nivel de confianza de 95% para determinar en cuál de los tratamientos existe una diferencia significativa. Dando como resultado las siguientes tablas 7-3.

Tabla 7-3: Análisis estadístico test de Tukey de la medición 6 (mediciones de glucosa en horas)

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Control (STZ) - Blanco	130,21	6,29	(110,69. 149,74)	20,71	0,000
Control (Acarbosa) - Blanco	84,05	6,29	(64,53. 103,57)	13,36	0,000
Fruta 30 mg/kg - Blanco	103,45	6,29	(83,93. 122,97)	16,45	0,000
Fruta 60 mg/kg - Blanco	98,31	6,29	(78,79. 117,83)	15,63	0,000
Hojas 30 mg/kg - Blanco	81,69	6,29	(62,17. 101,21)	12,99	0,000
Hojas 60 mg/kg - Blanco	77,33	6,29	(57,81. 96,85)	12,30	0,000
Solución S 30 mg/kg - Blanco	109,98	6,29	(90,45. 129,50)	17,49	0,000
Solución S 60 mg/kg - Blanco	103,17	6,29	(83,65. 122,69)	16,40	0,000
Control (Acarbosa)- Control (STZ)	-46,17	6,29	(-65,69. -26,65)	-7,34	0,000
Fruta 30 mg/kg - Control (STZ)	-26,76	6,29	(-46,28. -7,24)	-4,26	0,001

Fruta 60 mg/kg - Control (STZ)	-31,90	6,29	(-51,43. -12,38)	-5,07	0,000
Hojas 30 mg/kg - Control (STZ)	-48,52	6,29	(-68,05. -29,00)	-7,72	0,000
Hojas 60 mg/kg - Control (STZ)	-52,88	6,29	(-72,40. -33,36)	-8,41	0,000
Solución S 30 mg/kg - Control (STZ)	-20,24	6,29	(-39,76. -0,72)	-3,22	0,035
Solución S 60 mg/kg - Control (STZ)	-27,05	6,29	(-46,57. -7,53)	-4,30	0,001
Fruta 30 mg/kg - Control (Acarbosa)	19,40	6,29	(-0,12. 38,93)	3,09	0,052
Fruta 60 mg/kg - Control (Acarbosa)	14,26	6,29	(-5,26. 33,78)	2,27	0,362
Hojas 30 mg/kg - Control (Acarbosa)	-2,36	6,29	(-21,88. 17,16)	-0,37	0,007
Hojas 60 mg/kg - Control (Acarbosa)	-6,71	6,29	(-26,24. 12,81)	-1,07	0,979
Solución S 30 mg/kg - Control (Acarbosa)	25,93	6,29	(6,41. 45,45)	4,12	0,001
Solución S 60 mg/kg - Control (Acarbosa)	19,12	6,29	(-0,40. 38,64)	3,04	0,060
Fruta 60 mg/kg - Fruta 30 mg/kg	-5,14	6,29	(-24,66. 14,38)	-0,82	0,996
Hojas 30 mg/kg - Fruta 30 mg/kg	-21,76	6,29	(-41,28. -2,24)	-3,46	0,016
Hojas 60 mg/kg - Fruta 30 mg/kg	-26,12	6,29	(-45,64. -6,60)	-4,15	0,001
Solución S 30 mg/kg - Fruta 30 mg/kg	6,52	6,29	(-13,00. 26,05)	1,04	0,982
Solución S 60 mg/kg - Fruta 30 mg/kg	-0,29	6,29	(-19,81. 19,24)	-0,05	1,000
Hojas 30 mg/kg - Fruta 60 mg/kg	-16,62	6,29	(-36,14. 2,90)	-2,64	0,169
Hojas 60 mg/kg - Fruta 60 mg/kg	-20,98	6,29	(-40,50. -1,45)	-3,34	0,024
Solución S 30 mg/kg - Fruta 60 mg/kg	11,67	6,29	(-7,85. 31,19)	1,86	0,645
Solución S 60 mg/kg - Fruta 60 mg/kg	4,86	6,29	(-14,66. 24,38)	0,77	0,998
Hojas 60 mg/kg - Hojas 30 mg/kg	-4,36	6,29	(-23,88. 15,16)	-0,69	0,999
Solución S 30 mg/kg - Hojas 30 mg/kg	28,29	6,29	(8,76. 47,81)	4,50	0,000
Solución S 60 mg/kg - Hojas 30 mg/kg	21,48	6,29	(1,95. 41,00)	3,41	0,018
Solución S 30 mg/kg - Hojas 60 mg/kg	32,64	6,29	(13,12. 52,16)	5,19	0,000
Solución S 60 mg/kg - Hojas 60 mg/kg	25,83	6,29	(6,31. 45,35)	4,11	0,001

Solución S 60 mg/kg - Solución S 30mg/kg	-6,81	6,29	(-26,33. 12,71)	-1,08	0,977
---	-------	------	-----------------	-------	-------

Nivel de confianza individual= 99,78% Extractos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

Tabla 8-3: Análisis de medias entre tratamientos con diferencias significativas en función del tiempo.

Tratamientos	N	Medía	Agrupación
Blanco	42	90,8333	A
Hojas 60 mg/kg	42	168,1667	B
Hojas 30mg/kg	42	172,5238	B
Control (+) Acarbosa	42	174,8810	B
Fruta 60 mg/kg	42	189,1429	C
Solución S 60 mg/kg	42	191,0000	C D
Fruta 30 mg/kg	42	192,2857	D
Solución S 30 mg/kg	42	200,8095	E
Control (-) STZ	42	221,0476	F

Las medias que no comparten una sola letra son significativamente diferentes. Extractos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

Mediante el test de Tukey se determinó que tratamientos fueron significativamente diferentes y los que tenían similar relación. La tabla 8-3 muestra que en los casos del control positivo (Acarbosa) con los extractos de hojas a concentración de 60 y hojas 30 mg/kg presentan actividad similar, en este caso la agrupación con el medicamento indica que los extractos poseen efecto hipoglucemiante durante el tiempo medido por horas. El tratamiento del extracto fruta 60 y Solución S 30 mg/kg es diferente, ya que, a pesar de presentar cierta actividad hipoglucemiante estas no fueron tan efectivas como los demás.

Se realizó el test de ANOVA para tratamientos en función de los días de estudio (3, 5, 7 días), dado que, es el tiempo en el cual se aprecia la disminución de los niveles de glucosa. Para establecer si $p > 0,05$ se acepta la hipótesis nula concluyendo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si $p < 0,05$ se procede a realizar el test de Tukey donde se determina en cuál de los grupos de tratamientos existe una diferencia significativa. Dando como resultado los datos de la tabla 9-3.

Tabla 9-3: Test de ANOVA para los tratamientos en función de los días de medición

Glucosa	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p
Tiempo (semana)	2	30696	15348	27,72	0,000
Tratamiento	7	147277	21040	37,753	0,000
Error	158	89065,257	564,163		
Total	167	267038,296			

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

El análisis realizado con un nivel de confianza del 95% dio como resultado que $p < 0,05$, por lo que se procede a rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa que indica que existe diferencia significativa por lo menos en uno de los extractos administrados.

Tabla 10-3: Análisis de medias que son significativamente diferentes en tratamiento días.

Tratamientos	N	Media	Agrupación	
Hojas 60 mg/kg	21	132,7619	A	
Control (+) Acarbosa	21	141,9048	A	
Hojas 30 mg/kg	21	148,8095	A	B
Fruta 60 mg/kg	21	168,9571		B
Fruta 30 mg/kg	21	171,9524	B	C
Solución S 30 mg/kg	21	187,3810		C
Solución S 60 mg/kg	21	189,7619		C
Control (-) STZ	21	230,9048		D

Las medias que no comparten una sola letra son significativamente diferentes. Extractos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*

Realizado por: Bueno P, Segundo, 2020

La tabla 10-3 muestra que el control negativo STZ es diferente a los demás tratamientos, debido a que sus valores de la glucosa permanecen elevados al no recibir tratamientos, en comparación con los demás grupos que reciben los diferentes tratamientos, en el caso de los extractos de hojas los valores medidos se asemejan con los obtenidos por el control positivo. El tratamiento Solución S. 60 mg/kg es diferente a todos a pesar de tener una cierta actividad hipoglucemiante esta no fue tan efectiva.

Se evidenció también que al transcurrir los días de tratamiento el nivel de glucosa va disminuyendo y el menor valor se presenta en el séptimo día llegando a niveles de glicemia parecidos a los normales.

3.5. Discusión

En el presente estudio se evaluó el efecto hipoglucemiante de los extractos hidroalcohólicos de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum*, en un modelo animal con diabetes inducida por STZ, la razón del uso de esta sustancia se debe a su toxicidad selectiva frente a las células beta, encargada de producir insulina. Algunas evidencias indican que la toxicidad de la STZ está mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre las células beta.

La STZ al parecer provocaría un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), al disminuir su síntesis e incrementar su hidrólisis. La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto de STZ como la de aloxano.

Los resultados obtenidos el grupo del control positivo con Acarbosa 100 mg/kg, evidencia el potencial farmacológico que tiene el medicamento, esto se debe, a su mecanismo de acción encargado de aumentar la secreción de insulina en las células beta de los islotes Langerhans del páncreas, además de participar en la disminución de la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática.

En el tamizaje fitoquímico de hojas y fruto (*Synsepalum dulcificum*) se pudo identificar de forma cualitativa la presencia de los metabolitos secundarios como se indica en las tablas 2-3 y 3-3. Recalcando la importancia de los compuestos fenólicos y alcaloides; los primeros son conocidos por su increíble capacidad antioxidante, mientras que los alcaloides participan en procesos de inhibición enzimática.

Los resultados prometedores de la actividad hipoglucemiante de la especie seleccionada puede estar relacionado a la presencia de flavonoides y alcaloides estos compuestos poseen estructuras capaces de donar electrones fácilmente, ya que poseen grupos hidroxilos en posición orto y por lo tanto ejercen una poderosa actividad de barrera de electrones, además pueden unirse a enzimas, e incluso a iones metálicos transitorios tales como: hierro, cobre y zinc, catalizan el transporte de electrones y depuran los radicales libres. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidróxido y superóxido, especies altamente activas, es decir poseen un efecto protector frente a los fenómenos de daño oxidativo por lo tanto no es de extrañar que *Synsepalum*

dulcificum proteja las complicaciones crónicas producidas por la diabetes, además los resultados obtenidos en los tratamientos con extractos en hojas son semejantes a los que se obtuvieron en estudios realizados en la Universidad de Nigeria Ibadán, mientras que la fruta no presentó efectos significativos.

CONCLUSIONES

- ✓ Se determinó la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* recolectada en el país, con la finalidad de comprobar si presenta o no efectos similares a especies que crecen en otras partes del mundo, como su homóloga de África, que han sido ampliamente investigada por sus importantes efectos en la disminución de la cantidad de glucosa en sangre. *Synsepalum dulcificum* en el Ecuador está siendo utilizada como el edulcorante, por lo que es importante conocer si influye en los niveles de glucosa de las personas que lo consumen.
- ✓ Mediante el tamizaje fitoquímico de las hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* se identificó la presencia de metabolitos secundarios representativos, entre los cuales se pudo observar flavonoides, taninos quinonas, cumarinas, terpenoides, así como mucílagos, principios amargos. Cabe recalcar que los flavonoides en el fruto no estuvieron presentes, la fuente principal de estos fueron las hojas.
- ✓ Se evaluó la actividad hipoglucemiante de los extractos de hojas y fruto de *Synsepalum dulcificum* a diferentes dosis, se observó que los tratamientos con mayor efectividad fueron los que presentaron dosis de 30 y 60 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas. Los resultados de ambos tratamientos presentaron actividad hipoglucemiante significativa, esto posiblemente se deba a que la fruta es muy sensible a la temperatura y la proteína con efecto hipoglucemiante comprobado es fácilmente desnaturalizada.
- ✓ Se comparó los resultados de los extractos de fruta y hojas de la fruta milagrosa a diferentes dosis con el control positivo. Los extractos mostraron resultados estadísticamente similares a los obtenidos con el control positivo; por lo que, el extracto de las hojas podrían ser empleado como un potencial antidiabético, y debido a la presencia de flavonoides presentaría importantes efectos antioxidantes lo que evitaría posteriormente en el paciente el desencadenamiento del síndrome metabólico.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda para posteriores estudios a realizarse en la fruta controlar la temperatura ya que la proteína que está presente es termolábil, para lo cual se sugiere su liofilización ya que por estos métodos las propiedades se mantienen en su totalidad y los resultados serían más confiables.

- ✓ De igual forma, se recomienda que se realice la cuantificación de flavonoides tanto en hojas como en el fruto, debido a su importante actividad hipoglucemiante y antioxidante.

- ✓ Realizar estudios de su efecto antiinflamatorio y antioxidante, ya que es rica en metabolitos secundarios, además según el conocimiento ancestral es empleada contra la malaria.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Etreptozotocina: es una sustancia química diabética que se utiliza para inducir la diabetes en modelos experimentales, este compuesto es absorbido por el transportador GLUT2 en las células β pancreáticas (Meng & Faxiang 2018, p. 1348).

Transportador de glucosa: es un transportador de baja afinidad lo cual es expresado en las membranas de células pancreáticas, hepáticas, renales e intestinales así como también en astrocitos y tanicitos. Además está involucrada en el transporte de galactosa, fructosa y glucosamina; por lo que más que un transportador de glucosa es un transportador de hexosas (Meng & Faxiang 2018, p. 1348).

DPPH: La molécula DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la reubicación de electrones no apareados en toda la molécula. Al agregar una sustancia que actúa con hidrógeno a una solución de DPPH•, se obtiene hidrazina cambiando simultáneamente el color de violeta a amarillo pálido (Rivas Silva 2017, p. 52).

Flavonoides: son metabolitos secundarios presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultra violetas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos (Praka & Gupta 2012, p. 26).

Antioxidantes: compuesto químico sintético o natural que tiene la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación (Praka & Gupta 2012, p. 26).

Cromatografía en capa fina: es un método analítico, empleado para la separación de los compuestos, donde la placa de la sílica gel (fase estacionaria) es sumergida a una fase móvil (eluyente) la cual sube por la capilaridad desplazando los compuestos. Un indicador fluorescente permite la visualización de los compuestos activos a la luz UV (Rivas Silva 2017, p. 52).

Óxido nítrico: es un mediador químico endógeno cuyo efecto predominante es la vasodilatación lo cual es producido en la naturaleza a partir de los combustibles fósiles, siendo rápidamente oxidado a óxido nítrico (Praka & Gupta 2012, p. 26).

Hiper glucemia: es la concentración elevada de glucosa en sangre. Es el hallazgo básico en todos los tipos de diabetes mellitus cuando no están controlando o en sus inicios. El opuesto a este término es la hipoglucemia (Álvarez & Peralta 2019, p. 17).

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ **ALVARES, Francisco; & ANTON, Teresa** (2019) “Manual de Endocrinología y Nutrición”, en *Manual de Endocrinología y Nutrición*. Madrid: Changing diabetes, pp. 1–565.
- ✓ **CHÁVEZ, Amaya. et al.** (2007) “Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicémica de la glibenclamida”, *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 38(3), pp. 5–11.
- ✓ **BURKART, A; & Hill, A.** (1979) “Diversidad Vegetal- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) CORE EUDICOTILEDÓNEAS- Asterídeas-Ericales: Sapotaceae”. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Asterideas/Ericales/5-Sapotaceae.pdf>.
- ✓ **CALLE, P. & CHARRO, S.** (2001) “Acarbosa y diabetes mellitus . Implicaciones prácticas”, 18, pp. 231–233. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n5/editorial.pdf>.
- ✓ **MARTINEZ, Carmen; & INMACULADA, Periago.** (2016) “Revelando el secreto de la fruta milagrosa”. Nutrición comunitaria. doi: 10.14642/RENC.
- ✓ **CASTRO, Carlos . et al.** (2014) “Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño Medicinal use of antidiabetic plants in Oaxacan ethnobotanical tradition”, 19(1), pp. 101–120. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v19n1/pla12114.pdf>.
- ✓ **CECMED** (2002) “Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de origen natural de uso humano”, (1706), p. 33. Disponible en: [http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/0804688d2854a01e032579e60062d5a9/\\$FILE/Regulación N° 28-2002.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/0804688d2854a01e032579e60062d5a9/$FILE/Regulación N° 28-2002.pdf).
- ✓ **CERVANTES,villagrana; & PRESNO, bernal;** (2017) “Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas”, *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(3), pp. 98–106. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/endocrinologia>.
- ✓ **CHIH, Chang; & TANG, Juei;** (2006) “Improvement of Insulin Resistance by Miracle Fruit (*Synsepalum dulcificum*) in Fructose-Rich Chow-fed Rats”, 992(March), pp. 987–992. doi: 10.1002/ptr.
- ✓ **GUERRERO, David;** (2014) “Actividad hipoglucémica del extracto de las hojas de *Oreocallis grandiflora* en ratas (*Rattus norvegicus*) por inhibición de alfa-amilasa”, p. 77.
- ✓ **Dc, A. & Daniell, S. A. D. C.** (2020) *Global Biodiversity Information facility Synsepalum*

dulcificum. Disponible en: <https://www.gbif.org/occurrence/search?q=genero+synsepalum>.

- ✓ ECUADOR (2016) “Ecuador - World Health Organization. Number of diabetes deaths. Ecuador.” Disponible en: https://www.who.int/diabetes/country-profiles/ecu_en.pdf?ua=1.
- ✓ EE.UU (2020) “Discover Life | Global Mapper”, p. 1. Disponible en: <https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Synsepalum+dulcificum>.
- ✓ FANDOHAN, Andadé; *et al.* (2017) “Usages traditionnels et valeur économique de *Synsepalum dulcificum* au Sud-Bénin”, *Bois et Forêts des Tropiques*, 2(332), pp. 17–30.
- ✓ GÁMBARO, Adriana; & ELLIS, Ana; (2012) “Exploring consumer perception about the different types of chocolate”, *Brazilian Journal of Food Technology*. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, 15(4), pp. 307–316. doi: 10.1590/S1981-67232012005000021.
- ✓ GARCÍA, Gertrudis; & DÍAS, Ela; (2015) “Plants considered useful for hypoglycemic , antihypertensive or hypolipidemic treatments by patients with peripheral vascular diseases.”, 20(1), pp. 38–47. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2015/cpm151d.pdf>.
- ✓ GARCÍA, Santos; *et al.* (2018) “Neuroimagen y ensayos clínicos con células madre en la esclerosis lateral amiotrófica: perspectivas de presente y futuro”, *Radiología*. Elsevier Doyma. doi: 10.1016/J.RX.2018.11.004.
- ✓ GONZÁLEZ, Antonio; *et al.* (2011) “Nature pharmacy – source of drugs in the xxi century”, 1(2), pp. 149–153. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5072890>.
- ✓ GRIEB, Pawel; *et al.* (2016) “Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer’s Disease: in Search of a Relevant Mechanism”, *Molecular Neurobiology*, 53(3), pp. 1741–1752. doi: 10.1007/s12035-015-9132-3.
- ✓ INGLETT, G; & CHEN, D; (2011) “Contents of Phenolics and Flavonoids and Antioxidant Activities in Skin , Pulp , and Seeds of Miracle Fruit”, 76(3), pp. 479–482. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02106.x.
- ✓ JOSHI, Shashank. *et al.* (2015) “Therapeutic potential of a -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus : an evidence-based review”, (Cv), pp. 1959–1981. doi: 10.1517/14656566.2015.1070827.
- ✓ KANTHARIDIS, Phillip. *et al.* (2011) “Diabetes complications: The microRNA perspective”, *Diabetes*, 60(7), pp. 1832–1837. doi: 10.2337/db11-0082.
- ✓ LANKATILLAKE, Chinta; & HUYNH, Tien; (2019) “Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence - based medicinal plants”, *Plant Methods*. BioMed Central, pp. 1–35. doi: 10.1186/s13007-019-0487-8.
- ✓ LEÓN, Susana; & VALENCIA, Renato. *et al.* (2011) *Libro rojo de las plantas endémicas del*

Ecuador, 2ª edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica el Ecuador, Quito, Ministerio del Ambiente (M 01)(BP 004). Bosque Protector “Daule-Peripa” Recuperado de <http://chmecuador.ambiente.gob.ec/userfiles/37/file/Bosques%20Protectores/BP%20CUENC A%20DAULE%20PERIPA.pdf> Ministerio del Ambiente (2015). *Reforma del Libro VI*. Disponible en: https://ddrn.dk/wp-content/uploads/2018/01/LIBRO_ROJO_de_las_plantas_endemicas_del-1.pdf.

- ✓ **LÓPEZ, Liliana . et al.** (2013) “Elaboración, control de calidad y evaluación de la actividad antidiabética de la miel de agave (Agave americana L.)”, p. 186. Disponible en: <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/3099/1/56T00408.pdf>.
- ✓ **LÓPEZ, simarro; & MARGÜELLO, Redondo.** (2018) “Prevención y tratamiento de la enfermedad infecciosa en personas con diabetes.”, *Medicina de Familia. SEMERGEN*. Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN), 20(xx), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.semerg.2018.07.007.
- ✓ **MEDINA, Diana. et al.** (2017) “Implementación de una metodología para la obtención de marcadores de frutos de Physalis peruviana L., y evaluación de actividad hipoglucemiante”. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/7552/1/192540.2012.pdf>.
- ✓ **MENDOZA, Zhofre. et al.** (2015) *Especies forestales más aprovechadas en la región sur del Ecuador*. Edilojas. Loja. Disponible en: <https://nikolayaguirre.files.wordpress.com/2011/12/lb-especies-forestales-sur-ecuador-2015.pdf>.
- ✓ **MENG, Ya & Rhen, ZHILI;** (2018) “Stem Cell Reports”, *Stem Cell Reports*. ElsevierCompany., 11(6), pp. 1347–1356. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.023.
- ✓ **MISHRA, Satish; & CHHATBAR, Cunal.** (2017) “Diabetic foot”, *CLINICAL UPDATES*, pp. 1–7.
- ✓ **NAIVY, Alonso; & JIMENEZ, Elio.** (2011) “Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro.”, 11(4), pp. 195–211. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/228>.
- ✓ **NAKAMURA, Carlos; & DEMARINI, Noe.** (2018) “Hypoglycemic and antioxidant activities of Morinda Citrifolia fruit in rats with diabetes mellitus induced by Aloxan.”, 21(1), pp. 3–9.
- ✓ **NAVARO, Ana. & LIDÓN, María.** (2015) “Conocimiento sobre los factores de riesgo cardiovascular y grado de control de la Diabetes Mellitus tipo 2 en un grupo de diabéticos españoles Cardiovascular”, *Atención Familiar*. Elsevier, 22(4), pp. 97–101. doi: 10.1016/S1405-8871(16)30061-X.
- ✓ **RODRIGUEZ, Nidia; & MENDOZA, Patricia.** (2017) “Hipoglucemiantes orales para el

tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México”, pp. 203–211. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2017/ju174e.pdf>.

- ✓ **OBAFEMI, Olabisi; & AKINMOLADUM, Clement.** (2017) *Antidiabetic potential of methanolic and flavonoid-rich leaf extracts of Synsepalum dulcificum in type 2 diabetic rats*, *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.jaim.2017.01.008.
- ✓ **OBAFEMI, Olabisi. et al.** (2017) “High Performance Liquid Chromatography (HPLC) fingerprinting, mineral composition and in vitro antioxidant activity of methanol leaf extract of *Synsepalum dulcificum* (Sapotaceae)”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(11), pp. 110–118. doi: 10.7324/JAPS.2017.71117.
- ✓ **OMS** (2016) “Informe mundial sobre la diabetes”.
- ✓ **OMS** (2015) “Informe mundial sobre la diabetes”, en, pp. 6–84. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf;jsessionid=1563CA04B410758E4DD86648EF04C63F?sequence=1 (Consultado: el 3 de abril de 2019).
- ✓ **PÉREZ, Alonso. & JIMÉNEZ, Elio.** (2011) *Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro*, *Bioteología Vegetal*. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837> (Consultado: el 24 de junio de 2019).
- ✓ **“PLAN ESTRATÉGICO INSTITUCIONAL”** (2018). Disponible en: https://www.geoenergia.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/06/plan_estrategico_institucional.pdf.
- ✓ **PRAKASH, Dhan; & GUPTA, Charo.** (2012) “Glucosinolates: the phytochemicals of nutraceutical importance.”, *Journal of complementary & integrative medicine*, 9(1), pp. 20–35. doi: 10.1079/9781780643632.0132.
- ✓ **REINEHR, Thomas. et al.** (2013) “Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents”, 4(6), pp. 270–281. doi: 10.4239/wjd.v4.i6.270.
- ✓ **RIVAS, Silva. et al.** (2017) “Estudio fitoquímico y evaluación de las propiedades hipoglucemiantes de *Clusia latipes*”, p. 58. Disponible en: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21001/1/Silva Rivas Ronald Santiago.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21001/1/Silva%20Rivas%20Ronald%20Santiago.pdf).
- ✓ **RIVERA, Susana; & PEDRAZA, José.** (2018) “Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: Evidence from preclinical and clinical studies”, *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. Elsevier, 14, pp. 29–41. doi: 10.1016/J.JNIM.2018.05.001.
- ✓ **ROKNI, Saba; & WURSTEN, Bart.** (2019) “*Synsepalum chimanimani* (Sapotaceae), a new species from the Chimanimani Mountains of Mozambique and Zimbabwe, with notes on the

botanical importance of this area”, *PhytoKeys*, 133(2019), pp. 115–132. doi: 10.3897/phytokeys.133.38694.

- ✓ **NAVARRETE, Rosa. et al.** (2016) ““Determinación de la glucoproteína y sus propiedades en la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*)”, 1, pp. 1–96.
- ✓ **SOIZA, Lara; & DONAGHUES.** (2018) “Vaccine against arteriosclerosis: an update”, *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), pp. 259–261. doi: 10.1177/https.
- ✓ **TACUMAN, Sonia. et al.** (2015) “ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Jungia rugosa* EN RATONES (*Mus musculus*) DIABÉTICOS INDUCIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA”, p. 70. Disponible en: http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4521/1/56T00574_UDCTFC.pdf.
- ✓ **WAGNER, Hildebert; & BLADT, Sabine.** (1996) *Plant Drug Analysis, Plant Drug Analysis*. doi: 10.1007/978-3-642-00574-9.
- ✓ **WAKEFORD, Charles. et al.** (2018) “Beneficial effects of an investigational wristband containing *Synsepalum dulcificum* (miracle fruit) seed oil on the performance of hand and finger motor skills in healthy subjects : A randomized controlled preliminary study”, (October 2017), pp. 321–332. doi: 10.1002/ptr.5980.
- ✓ **WHO** (2018) “World Health Organization”, *30 October 2018*, (October 2018), p. 5. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- ✓ **ZAVALA, Alicia; & FERNÁNDEZ, Erik.** (2018) “Revista Universitaria con proyección científica , académica y social”, 2(4), pp. 3–9.

ANEXOS:

ANEXO A: Acondicionamiento del material vegetal



Hojas de *Synsepalum dulcificum* en el desecador



Fruto *Synsepalum dulcificum* en el desecador

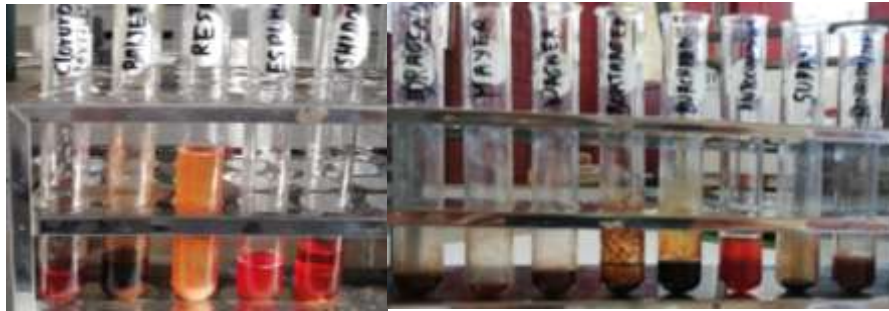
ANEXO B: Tamizaje fitoquímico de *Synsepalum dulcificum* de hojas y fruto



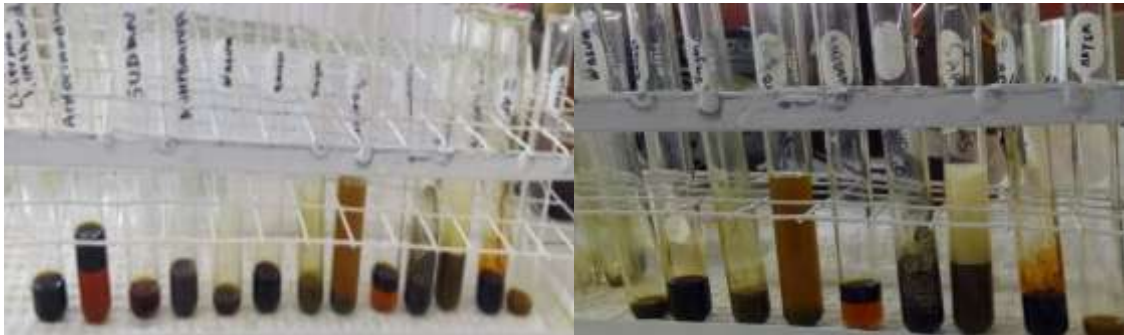
Ensayos de identificación en extracto etéreo de hojas de *Synsepalum dulcificum*



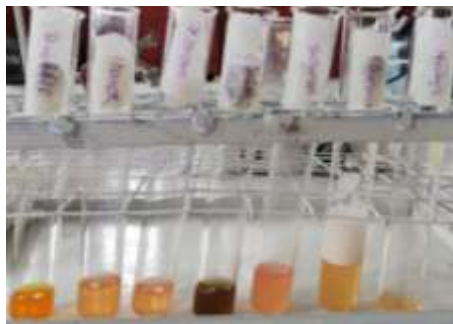
Ensayos de identificación en extracto etéreo de fruto de *Synsepalum dulcificum*



Ensayos de identificación del extracto alcohólico del fruto de *synsepalum dulcificum*



Ensayos de identificación del extracto alcohólico de las hojas de *synsepalum dulcificum*



Ensayos de identificación del extracto acuoso del fruto de *synsepalum dulcificum*



Ensayos de identificación del extracto acuoso de las hojas de *Synsepalum dulcificum*

ANEXO C: Preparación de los Extractos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*



Filtración del extracto líquido bruto hojas



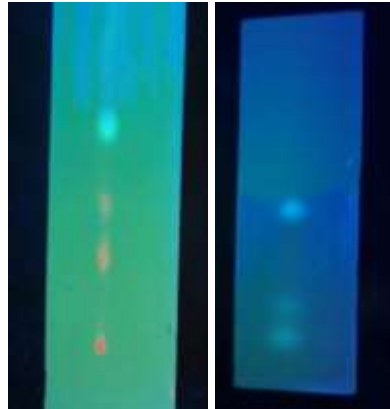
Filtración del extracto líquido bruto hojas

Concentración del extracto bruto de *Synsepalum dulcificum* en rota vapor por presión reducida y temperatura de 50°C



Concentrado de los extractos de hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*

ANEXO D: Cromatografía en capa fina de los extractos hidroalcohólicos hojas y fruto *Synsepalum dulcificum*



Cromatografía en capa fina de extractos hidroalcohólicos *Synsepalum dulcificum* (izquierdo hojas derecho fruto).

ANEXO E: Inducción de la diabetes con administración de Estreptozotocina (STZ) y administración de tratamientos



Administración de STZ por vía intraperitoneal en ratones *Mus musculus*



Dosificación de los extractos por vía oral en ratones *Mus musculus*

ANEXO F: Medición de niveles de glucosa



Glucosa basal antes de la inducción de diabetes



Glucosa basal de 72 horas después de haber inducido la diabetes ya con tratamientos de los extractos.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 27 / 10/2020

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres - Apellidos: Segundo Apolinario Bueno Pérez
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímico Farmacéutico
E. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS



0306-DBRAI-UPT-2020