



*Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio*

**SEP**

**SEIT**

**TecNM**

**DIVISIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**OPCIÓN**

*“Tesis”*

**Proyecto**

**“Evaluación de la actividad antidiabética *in vitro* de los  
extractos de hoja de *Salvia amarissima* fresca y seca”**

**Que para obtener el título de:**

*Ingeniero en Industrias Alimentarias*

**Presenta**

*Yesenia Herrera Bravo*

**160712016**

**Acatlán de Osorio, Pue., Febrero de 2022**



**ASUNTO:** Aprobación de Trabajo de Titulación.

Acatlán de Osorio, Pue., a 16 de febrero de 2022.

**I.I.A. ELEODORO GABILÁN LINARES  
JEFE DE DIVISIÓN DE LA CARRERA DE  
INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS  
P R E S E N T E.**

Por este medio hago de su conocimiento que el documento bajo el esquema: **OPCIÓN: TESIS PROFESIONAL**, que lleva por nombre **“Evaluación de la actividad antidiabética in vitro de los extractos de hoja de Salvia amarissima fresca y seca”**, que presenta la candidata a Titulación: **C. YESENIA HERRERA BRAVO** con número de control **160712016** de la carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias, fue revisada y aprobada para su impresión por la comisión revisora conformada por: **M.I.A. ANABEL ROMERO CRUZ, DR. RAÚL SALAS CORONADO** y **M.I.A. ERIKA LÓPEZ ARANDA**.

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E

“CONOCIMIENTO COMO GUÍA DEL DESARROLLO”

ING. GABRIELA FORTUNATA LARA RUIZ  
PRESIDENTE DE ACADEMIA DE LA CARRERA  
DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Vo. Bo.

M.I.A. ANABEL ROMERO CRUZ

Vo. Bo.

DR. RAÚL SALAS CORONADO

Vo. Bo.

M. I. A. ERIKA LÓPEZ ARANDA

c. c. p.-Archivo.



CACEL



## DEDICATORIA

*Les dedico este trabajo a mis padres **Victorina Bravo Santiago** y **Adolfo Herrera Ferrer** por brindarme el apoyo para cumplir mis sueños, por su inmensa comprensión, por guiar mis pasos con amor y ayudarme en los momentos más difíciles, por sus esfuerzos para darme una educación de calidad y enseñarme que antes de ser profesional se debe ser persona, por mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi carácter y la fuerza para perseguir mis sueños.*

*Son mi ejemplo de fortaleza, amor y humildad.*

*A mis hermanas **Oliva, Deicy, Sayuri**. Por compartir momentos inolvidables y animarme a seguir adelante gracias por su apoyo y consejos.*

*A **Joel ♥** y **Meritxell ♥** por su cariño por escucharme en los momentos importantes de mi vida, por estar a mi lado y llenar mi vida de felicidad y amor.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a dios porque me ha acompañado en cada momento de mi vida, a mis padres porque sin su apoyo incondicional no estaría cumpliendo una meta más. Gracias por confiar en mí, han sido mi motivación para seguir adelante. Gracias a ustedes puedo lograr una meta más en mi vida; concluir mi carrera profesional.

A mis hermanas y a Joel Sánchez Guzmán por los momentos maravillosos, son parte importante de ese logro.

Agradecimientos a mi asesor interno la M.I.A. Anabel Romero Cruz por su amistad y apoyo durante toda mi carrera profesional. Por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar esta investigación.

A mi asesor externo el Dr. Raúl Salas Coronado, por compartirme todos sus conocimientos y experiencias, por sus consejos y apoyo incondicional durante el desarrollo de esta investigación y por enseñarme que las cosas se pueden lograr con decisión y dedicación.

A todos mis maestros del ITSAO quienes durante toda mi carrera profesional me brindaron su apoyo y sus conocimientos.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por permitirme realizar este trabajo.

## RESUMEN

El presente proyecto consistió en determinar el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, utilizando como estándar ácido gálico (EAG). Así como el contenido de flavonoides totales mediante la formación de un complejo cromogénico de flavonoide-aluminio, utilizando como estándar la rutina (ER). También se evaluó la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos de hoja de *Salvia amarissima* fresca y seca a partir de la evaluación de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa, evaluando el contenido de  $\alpha$ -amilosa remanente en la mezcla de reacción. Las muestras de hojas de *S. amarissima* fresca se almacenaron a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para obtener las hojas secas se realizó una deshidratación en un secador de charolas rotatorias con una corriente de aire continua a una velocidad de 1.2 m/s, seguido de una molienda para finalmente almacenar los polvos a  $-18^{\circ}\text{C}$ . A las muestras, tanto frescas como secas se les determinó la humedad total. Para realizar la cuantificación de compuestos fenólicos y la actividad antidiabética se realizó una extracción de compuestos de las muestras fresca y seca con etanol al 70 % asistida por ultrasonido. La cuantificación de fenoles totales mostró que la hoja fresca contiene  $4648.9 \pm 47.2$  mg EAG/100 g de masa seca (ms), y la hoja deshidratada mostró un contenido de  $3010.35 \pm 0$  mg EAG/100 g de ms. La cuantificación de flavonoides totales mostró en la muestra fresca un total de  $10551.91 \pm 189.30$  mg ER/100 g de ms y en la muestra deshidratada  $11412.122 \pm 144.39$  mg ER/100 g de ms. El porcentaje de inhibición durante la evaluación de la actividad antidiabética en la hoja fresca tuvo un porcentaje de inhibición máximo de 42.8 % y la hoja deshidratada molida un porcentaje máximo de 30.2%

**Palabras claves:** *S. amarissima*, compuestos fenólicos, actividad antidiabética.

## ABSTRACT

The present project consisted of determining the total phenol content by the Folin-Ciocalteu method, using gallic acid (EAG) as standard. As well as the total flavonoid content through the formation of a flavonoid-aluminum chromogenic complex, using routine (ER) as standard. The in vitro antidiabetic activity of fresh and dried *Salvia amarissima* leaf extracts was also evaluated from the evaluation of the inhibition of the  $\alpha$ -amylase enzyme, evaluating the remaining  $\alpha$ -amylose content in the reaction mixture. Fresh *S. amarissima* leaf samples were stored at  $-18^{\circ}\text{C}$ . To obtain the dry leaves, dehydration was carried out in a rotary tray dryer with a continuous air stream at a speed of 1.2 m/s, followed by grinding to finally store the powders at  $-18^{\circ}\text{C}$ . The samples, both fresh and dry, were determined for total humidity. To perform the quantification of phenolic compounds and antidiabetic activity, an extraction of compounds from the fresh and dry samples was carried out with 70% ethanol assisted by ultrasound. The quantification of total phenols showed that the fresh leaf contains  $4648.9 \pm 47.2$  mg EAG/100 g of dry mass (ms), and the dehydrated leaf showed a content of  $3010.35 \pm 0$  mg EAG/100 g of ms. The quantification of total flavonoids showed a total of  $10551.91 \pm 189.30$  mg ER/100 g of ms in the fresh sample and in the dehydrated sample  $11412.122 \pm 144.39$  mg ER/100 g of ms. The inhibition percentage during the evaluation of the antidiabetic activity in the fresh leaf had a maximum inhibition percentage of 42.8% and the ground dehydrated leaf a maximum percentage of 30.2%.

**Keywords:** *S. amarissima*, phenolic compounds, antidiabetic activit

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	14
2.1 Objetivo general .....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
2.3 Hipótesis.....	14
3. MARCO TEORICO .....	15
3.1 Diabetes y sus tipos .....	15
3.2 Impacto de la diabetes a nivel mundial. ....	16
3.3 Diabetes en México .....	17
3.4 Fisiopatología de la absorción de carbohidratos y de la hiperglucemia postprandial .....	18
3.5 Alteraciones que sufre una persona por efecto de la diabetes .....	19
3.6 Función y localización de las enzimas encargadas de la digestión de carbohidratos.....	20
3.7 Tratamiento farmacéutico para la diabetes mellitus .....	21
3.8 Inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasa y $\alpha$ -amilasa.....	22
3.9 Tratamiento herbolario para la diabetes mellitus .....	24
3.10 Uso de plantas en fármacos .....	25
3.11 Familia Laminaceae.....	26
3.11.1 Género <i>Salvia</i> .....	28
3.11.2 <i>Salvia amarissima</i> .....	28
3.12 Propiedades de los compuestos fenólicos.....	29
3.13 Actividad antidiabética de extractos de planta .....	30
3.14 Actividad antidiabética <i>in vitro</i> .....	31
3.15 Almidón.....	32
3.16 Métodos para determinar el porcentaje de $\alpha$ -amilosa y amilopectina .....	33
4. METODOLOGÍA.....	35
4.1 Obtención de la muestra .....	35
4.2 Selección y almacenamiento .....	35
4.3 Determinación de humedad.....	36
4.4 Deshidratación y molienda.....	36
4.5 Obtención de los extractos de la muestra (Santos 2019).....	37
4.6 Fenoles totales (Girón 2013) .....	37
4.6.1 Preparación de las disoluciones.....	37

4.7 Flavonoides totales (Girón 2013) .....	38
4.7.1 Preparación de las disoluciones.....	38
4.7.2 Cuantificación de flavonoides. ....	39
4.8 Determinación del porcentaje de $\alpha$ -amilosa en fécula de papa a partir del valor azul (Han <i>et al.</i> 2012).....	40
4.8.1 Preparación de las disoluciones.....	40
4.9 Obtención de $\alpha$ -amilosa (Lemos <i>et al.</i> 2019) .....	41
4.9.1 Pretratamiento del almidón.....	41
4.9.2 Separación de $\alpha$ -amilosa y amilopectina .....	41
4.9.3 Preparación de las disoluciones.....	41
4.9.4 Separación de $\alpha$ -amilosa.....	41
4.9.5 Obtención de $\alpha$ -amilosa en polvo .....	41
4.9.6 Solubilización de la $\alpha$ -amilosa.....	42
4.10 Reacción de $\alpha$ -amilosa de papa .....	42
4.10.1 Preparación de las disoluciones.....	42
4.10.2 Reacción .....	42
4.11 Reacción enzimática de $\alpha$ -amilasa con $\alpha$ -amilosa.....	43
4.11.1 Preparación de las disoluciones.....	43
4.11.2 Reacción .....	43
4.11.2 Limpieza de extractos de <i>Salvia amarissima</i> (He <i>et al.</i> , 2007) .....	43
4.13 inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa <i>in vitro</i> en presencia de los extractos de <i>S. amarissima</i> .....	44
4.13.1 Preparación de las disoluciones.....	44
4.14 Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa <i>in vitro</i> en presencia de acarbosa pura .....	45
4.14.1 Preparación de las disoluciones.....	45
4.14.2 Reacción enzimática .....	45
5. RESULTADOS .....	46
5.1 Humedad relativa de la hoja de <i>Salvia amarissima</i> .....	46
5.2 Deshidratado de las hojas de <i>Salvia amarissima</i> .....	46
5.3 Cuantificación de fenoles totales.....	48
5.5 Determinación del porcentaje de $\alpha$ -amilosa en la fécula de papa a partir del valor azul.....	51
5.6 Solubilidad de la $\alpha$ -amilosa .....	52
5.7 Reacción enzimática de la $\alpha$ -amilosa y $\alpha$ -amilasa.....	52
5.8 Inhibición de $\alpha$ -amilasa .....	54
5.9 Análisis estadístico .....	57

6. CONCLUSIONES.....	59
7. RECOMENDACIONES .....	60
7. BIBLIOGRAFÍA .....	61
8. APÉNDICES .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales causas de muerte por sexo .....	18
Tabla 2 Grupos de medicamentos orales con diferentes mecanismos de acción para tratar la DM tipo 2 .....	21
Tabla 3 Características, grupos y acción de duración de los hipoglicemiantes orales .....	23
Tabla 4 Especies de diversos géneros pertenecientes a la familia Lamiaceae distribuidas en México.....	27
Tabla 5 Porcentaje de humedad en hojas de <i>S. amarissima</i> .....	46
Tabla 6 Contenido de Fenoles Totales en especies del genero <i>Salvia</i> .....	49
Tabla 7 Contenido de Flavonoides Totales en especies del genero <i>Salvia</i> .....	50
Tabla 8 Porcentaje de $\alpha$ -amilosa en papa .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los principales inhibidores de $\alpha$ -glucosidasa y $\alpha$ -amilasa. ....	24
Figura 2. Espécimen de <i>Salvia amarissima</i> . .....	29
Figura 3. Compuestos fenólicos representativos. ....	30
Figura 4. Estructura de la $\alpha$ -amilosa.....	32
Figura 5. Estructura de la amilopectina .....	33
Figura 6. Hoja de <i>S. amarissima</i> . .....	35
Figura 7. Polvo de hoja de <i>S. amarissima</i> deshidratada. ....	37
Figura 8. Pérdida de humedad con respecto al tiempo de las hojas de <i>S. amarissima</i> .....	47
Figura 9. Razón de humedad en función del tiempo de secado de las hojas de <i>S. amarissima</i> .47	
Figura 10. curva de calibración de $\alpha$ -amilosa.....	53
Figura 11. curva de calibración de $\alpha$ -amilasa. ....	54
Figura 12. Porcentaje de inhibición de los extractos de <i>S. amarissima</i> de extractos frescos y secos .....	56
Figura 13. Porcentaje de inhibición de acarbosa .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>FID</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>h</b>	Horas
<b>min</b>	Minutos
<b>s</b>	Segundo
<b>m/s</b>	Metros sobre segundo
<b>EAG</b>	Equivalentes de Ácido Gálico
<b>%</b>	Porcentaje
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>g</b>	Gramos
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>ISA</b>	Índice de Solubilidad en Agua
<b>ER</b>	Equivalentes de Rutina
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>HbA1c</b>	Prueba de hemoglobina glucosilada

## 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo II (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa que se produce cuando se manifiestan niveles elevados de glucosa en sangre y es la primera causa de morbilidad cardiovascular. Esto se debe a que el organismo deja de producir, o no produce suficiente cantidad de insulina, o no logra utilizar dicha hormona de modo eficaz. En la actualidad existen diferentes tipos de hipoglucemiantes los cuales traen efectos adversos como flatulencias, gastritis, entre otros.

La prevalencia de DM tiene características de una pandemia y afecta a diversas sociedades con distinto grado de desarrollo. Se estima que, en las próximas décadas, el número total de diabéticos en el mundo sobrepasará los 300 millones. Esto incrementará el gasto público y los recursos sanitarios necesarios para atender a pacientes diabéticos. La epidemia de obesidad, consecuencia indeseable de la globalización de los hábitos de vida y dietas no saludables son el origen de la enfermedad (Abad-Pérez & Bureo-Dacal, 2010).

Un control efectivo de la hiperglucemia en la DM es el retardo o inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos. Entre estas, se encuentra la  $\alpha$ -amilasa, la cual es secretada por las glándulas salivales y por el páncreas que la envía al intestino delgado. También se encuentra la  $\alpha$ -glucosidasa, se localiza en el borde del cepillo del epitelio del intestino delgado. Para inhibir dichas enzimas, se busca como alternativa utilizar plantas medicinales que sean capaces de realizar la misma función que tienen los fármacos.

Según la OMS, el 75% de la población mundial utiliza las plantas medicinales, y el uso tradicional de la planta generalmente se lleva a cabo entera o con alguna de sus partes después de una infusión o decocción. El número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica se estima en 5000, apenas una pequeña fracción del total estimado en 3 millones de especies (Luján et al., 2009).

La OMS ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos.

Los efectos hipoglucémicos de algunas plantas usadas como remedios antidiabéticos se ha confirmado en las poblaciones rurales que las usan, y los mecanismos de la actividad hipoglucémica de estas plantas se están estudiando.

Debido a lo anterior, en el presente proyecto se evaluó la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos de *salvia amarissima* fresca y seca a través de la inhibición enzimática de  $\alpha$ -amilasa. Adicionalmente se cuantificaron los fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos obtenidos por ultrasonido usando como disolvente etanol acuoso al 70%.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Comparar la actividad antidiabética *in vitro*, expresada como inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa de los extractos de *salvia amarissima*, en fresco y seco.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Obtener muestras de hoja de *S. amarissima* en buen estado físico.
2. Obtener extractos de compuestos fenólicos de las hojas de *S. amarissima* fresca y seca mediante una extracción con etanol acuoso al 70%, asistida por ultrasonido.
3. Determinar el contenido de fenoles totales en los extractos por el método espectrofotométrico del reactivo de Folin- Ciocalteu.
4. Determinar el contenido de flavonoides totales en los extractos.
5. Evaluar la actividad antidiabética de las muestras frescas y secas de las hojas de *S. amarissima*.
6. Comparar la actividad antidiabética de los extractos de hoja de *S. amarissima* fresca y seca por el método de inhibición de  $\alpha$ -amilasa *in vitro*.

### 2.3 Hipótesis

Los extractos de *S. amarissima* poseen un alto contenido de compuestos fenólicos que son capaces de inhibir la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en un modelo *in vitro*.

### 3. MARCO TEORICO

En la presente sección se describirá la diabetes, orígenes, impacto en el mundo actual. Así como los tratamientos médicos utilizados para controlar la enfermedad. También se describirán los tratamientos alternativos, mediante el uso de plantas. Se mencionarán las plantas más importantes y en particular las plantas del género *Salvia*. También se describirán los métodos empleados para evaluar la actividad antidiabética *in vitro*.

#### 3.1 Diabetes y sus tipos

La diabetes mellitus, más conocida simplemente como “diabetes”, es una afección crónica que se produce cuando se dan niveles elevados de glucosa en sangre. Esto se debe a que el organismo deja de producir o no produce suficiente cantidad de insulina, o no logra utilizar dicha hormona de modo eficaz. La insulina es una hormona esencial, producida por las células  $\beta$  en el páncreas (Proença et al., 2017). Dicha hormona transporta la glucosa desde la corriente sanguínea hacia las células del organismo, en donde la glucosa se convierte en energía. La falta de insulina o la incapacidad de las células de responder ante la misma, provocan un nivel de glucosa alto en sangre o hiperglucemia, que es la principal característica de la diabetes. Cabe señalar que, si el nivel de glucosa en la sangre permanece alto durante un período largo de tiempo, puede resultar en un daño de órganos a largo plazo, como los riñones, el hígado, los ojos, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos. Las complicaciones en algunos de estos órganos pueden llevar a la muerte (Mahmoud et al., 2015)

Las principales categorías de diabetes son tipo 1, tipo 2, y la diabetes mellitus gestacional. A continuación, se describe brevemente cada una de ellas.

La diabetes tipo 1, es la primera causa de diabetes en la infancia, pero puede ocurrir a cualquier edad. No se puede prevenir. Las personas que viven con diabetes tipo 1 pueden vivir vidas saludables y gratificantes si reciben un suministro continuo de insulina, educación, apoyo, y equipos de medición de la glucemia.

La diabetes tipo 2, representa la gran mayoría de casos de diabetes a nivel mundial (alrededor del 90%). Se puede tratar de manera eficaz a través de la educación, el apoyo y la adopción de estilos de vida saludables, en combinación con la medicación que se requiera. Existe evidencia de que la diabetes tipo 2 se puede prevenir y cada vez hay más pruebas que demuestran que la remisión de este tipo de diabetes es posible en algunas personas.

La “prediabetes” es un término de uso cada vez más frecuente para las personas con tolerancia anormal a la glucosa o glucosa alterada en ayunas. Implica un riesgo de desarrollo posterior de la diabetes tipo 2 y complicaciones diabéticas.

Las embarazadas con diabetes mellitus gestacional, pueden tener bebés que son grandes para su edad gestacional, lo que aumenta el riesgo de sufrir complicaciones en el embarazo y en el momento del parto, tanto para la madre como para el bebé (International Diabetes Federation, 2019).

### **3.2 Impacto de la diabetes a nivel mundial.**

La diabetes mellitus es uno de los problemas de salud pública más importantes del mundo. Según la Federación Internacional de Diabetes hay 415 millones de adultos con diabetes, y probablemente se presenten alrededor de 642 millones de casos para el año 2040 (Proença et al., 2017). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil y México, son en ese orden los países con mayor número de personas diabéticas.

La diabetes mellitus (DM) tipo 2 es la primera causa de morbilidad cardiovascular. La prevalencia de DM tiene características de una pandemia y afecta a diversas sociedades con distinto grado de desarrollo. Se estima que, en las próximas décadas, el número total de diabéticos en el mundo sobrepasará los 300 millones. (Kahleova & Pelikanova, 2017). Esto incrementará el gasto público y los recursos sanitarios necesarios para atender a pacientes diabéticos. La epidemia de obesidad, consecuencia indeseable de la globalización de los hábitos de vida y dieta no saludables son el origen de la enfermedad (Abad-Pérez & Bureo-Dacal, 2010).

La Federación Internacional de la Diabetes (FID) considera que los costos en salud del tratamiento contra las complicaciones diabéticas representan más del 50% de los costos en salud directos de la diabetes.

Los costos en salud para la detección y el tratamiento de las complicaciones relacionadas con la diabetes son altos. Todas las complicaciones diabéticas, tanto agudas como a largo plazo, contribuyen significativamente al impacto económico general de la afección.

### **3.3 Diabetes en México**

En el país, la diabetes es una epidemia que va en ascenso acelerado. Entre las enfermedades crónico-degenerativas, la diabetes ha mostrado el incremento más significativo en los últimos años. El incremento de la diabetes mellitus va de la mano con el aumento extraordinario de sobrepeso y obesidad en nuestra sociedad. En México, junto con los factores genéticos, el sobrepeso y la obesidad son los principales factores de riesgo para diabetes mellitus y sus complicaciones (Aguilar-Salinas, 2013)

A pesar de que en los últimos años el sector salud ha incrementado las acciones preventivas para evitar el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles apoyándose en instrumentos como PrevenIMSS, PrevenISSSTE y la Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la obesidad, la diabetes, continúan aumentando (Rojas-martínez et al., 2018). La enfermedad se presenta en todos los grupos de edad, ha sido más frecuente entre los individuos de 25 y 59 años y cada vez se observa en individuos más jóvenes (Altamirano & Cruz, 2009).

El impacto de la diabetes tipo 2 en la mortalidad ha aumentado consistentemente en México. En 1970, la diabetes tipo 2 era la decimoquinta causa más común de muerte. Sin embargo, en el 2000 la diabetes tipo 2 se convirtió en la principal causa de mortalidad general en México, siendo responsable del 10.7% de las defunciones registradas en ese año (Bello-Chavolla et al., 2017). Además, es de las principales causas de ceguera, insuficiencia renal crónica y amputaciones no traumáticas, y es una de las 10 causas más frecuentes de hospitalización en adultos, aumenta el riesgo de sufrir infarto al miocardio o cerebral (Rojas-Martínez et al., 2018).

En México las tres principales causas de muerte tanto para hombres como para mujeres son enfermedades del corazón, diabetes mellitus y tumores malignos, Tabla 1.

Tabla 1.

*Principales causas de muerte en México*

<b>Posición</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>Total</b>
<b>1</b>	Enfermedades del corazón 66,337	Enfermedades del corazón 75,256	Enfermedades del corazón 141,619
<b>2</b>	Diabetes mellitus 54,216	Diabetes mellitus 52,309	Diabetes mellitus 106,525
<b>3</b>	Tumores malignos 43,053	Tumores malignos 41,088	Tumores malignos 84,142

Fuente: Rojas-Martínez et al., (2018)

En los últimos 30 años, la población mexicana se ha concentrado en los centros urbanos, que ha contribuido a un cambio en los patrones dietéticos, con un aumento significativo en el consumo de calorías totales, alimentos procesados, carbohidratos simples, refrescos y algunas fuentes de grasas saturadas (Bello-Chavolla et al., 2017).

La mala nutrición en nuestra población explica el aumento de la incidencia de estas enfermedades en los últimos tiempos. Un claro ejemplo es el hecho de que el consumo promedio de frutas y vegetales se ha visto reducido en un 29.3% y, por el contrario, se incrementó en 37.2% el consumo de refrescos embotellados (Rivera et al., 2008).

### **3.4 Fisiopatología de la absorción de carbohidratos y de la hiperglucemia postprandial**

Los carbohidratos y los ácidos grasos son las principales fuentes de energía proveniente de una dieta convencional. Aunque la mayor parte de los tejidos utiliza ácidos grasos y glucosa como combustibles ordinarios, las neuronas sólo utilizan glucosa. Por ello, el organismo tiene varios mecanismos que forman glucosa a partir de grasas, cetonas y aminoácidos, a fin de mantener el metabolismo celular de las neuronas.(Cai & Shi, 2013). Los alimentos contienen carbohidratos simples, monosacáridos como glucosa, fructosa y galactosa o disacáridos como la sacarosa, la lactosa y polisacáridos como el almidón. Los monosacáridos se absorben rápidamente en la mucosa gastrointestinal. Pero los disacáridos y los polisacáridos necesitan ser degradados por diversas enzimas antes de que puedan ser absorbidos a través de la mucosa (García-alcalá et al., 2011).

En el interior del organismo, las principales formas de los carbohidratos son la glucosa y el glucógeno (un polímero de la glucosa), este último es la molécula de reserva, que se almacena

principalmente en el músculo. Se utiliza para la formación de hexosas que aprovecha en el mismo tejido muscular durante la actividad física vigorosa y en el hígado. Su función principal es la generación de glucosa para el torrente sanguíneo.(Merr & Perry, 2019). En la digestión de los carbohidratos participan numerosas enzimas gastrointestinales y pancreáticas, por ejemplo, las amilasas de origen salival y pancreático, que actúan sobre los oligosacáridos (almidones) para su fragmentación en disacáridos. Después, en el intestino, las enzimas  $\alpha$ -dextrinasas, maltasa, sacarasa y lactasa actúan sobre  $\alpha$ -dextrinas, maltosa, sacarosa y lactosa respectivamente, descomponiéndolas en monosacáridos como glucosa, fructosa y galactosa que son transportados por las  $\alpha$ -glucosidasas a las vellosidades del intestino delgado donde se lleva a cabo la absorción. Fenómeno debido a la acción de las enzimas amilasa y maltasa, encargadas de la absorción de glucosa y la formación de glucógeno (García-alcalá et al., 2011).

La absorción intestinal de los nutrientes tiene un efecto directo sobre la secreción de insulina, la hormona clave en el metabolismo de los carbohidratos.(Carlson, 2019). La secreción de insulina se realiza de manera basal continua y en forma pulsátil o en bolos. Los sitios de acción de la insulina son los tejidos muscular, graso y hepático, donde la insulina actúa para permitir la entrada de glucosa a las células. En la resistencia a la insulina se tiene una respuesta disminuida de los tejidos periféricos a la acción de esta hormona. Durante un tiempo, las células  $\beta$  pancreáticas intentan compensar la resistencia a la insulina con mayor producción de la misma(CODE, 1953). Por una serie de mecanismos complejos la célula  $\beta$  se va deteriorando, reduciendo su capacidad para producir insulina.

### **3.5 Alteraciones que sufre una persona por efecto de la diabetes**

Las complicaciones crónicas de la diabetes se clasifican en macrovasculares (equivalente a arteriosclerosis), que son las que afectan a las arterias ya que es la acumulación de grasas, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias en general producen enfermedades cardíacas coronarias, cerebrovasculares y vascular periférica. En microvasculares, que incluiría la retinopatía, nefropatía y neuropatía, y por último el pie diabético, que aparecería como consecuencia de la neuropatía y/o de la afección vascular de origen macroangiopático (Mediavilla, 2015).

El subdiagnóstico y el inadecuado control de la diabetes generan serios daños a la salud de los individuos. Los efectos nocivos más frecuentes y vinculados con esta afección son la pérdida de las capacidades visuales (ceguera), la nefropatía, la insuficiencia renal, la neuropatía y el aumento del riesgo de infarto, accidentes cerebro vascular e hipertensión. (Pereira et al., 2018). La muerte prematura es otra de las secuelas de la diabetes mellitus. Aproximadamente el 8.5% de las defunciones registradas en el mundo en el año 2013, de personas entre los 20 y los 79 años de edad, fueron atribuibles a la diabetes, cifra que es superior al 50% en algunas poblaciones (Agudelo-Botero & Dávila-Cervantes, 2015).

### **3.6 Función y localización de las enzimas encargadas de la digestión de carbohidratos**

Un control efectivo de la hiperglucemia en la diabetes mellitus tipo 2 es el retardo, regulación y/o inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos. Entre estas la  $\alpha$ -amilasa la cual es secretada por las glándulas salivales y en el intestino delgado por el páncreas. Así como, la  $\alpha$ -glucosidasa que se localiza en el borde del cepillo del epitelio del intestino delgado (Jaisankar, 2018).

La  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa catalizan el paso final en el proceso digestivo de los carbohidratos para liberar los monosacáridos absorbibles, incluidos la glucosa. Por tanto, los inhibidores de estas enzimas pueden ralentizar la liberación de sustancias absorbibles. Esto retrasa la absorción de glucosa en sangre y previene cualquier aumento repentino del nivel de glucosa en sangre inducido por la comida (Jaisankar, 2018).

La digestión del almidón y del glucógeno comienza en la boca con la acción de la enzima  $\alpha$ -amilasa que se secreta en la saliva. Esta enzima rompe los enlaces internos  $\alpha$  de ambos polímeros. En el intestino, la digestión continua, facilitada por la  $\alpha$ -amilasa secretada por el páncreas. Esta enzima degrada la  $\alpha$ -amilosa y un poco de glucosa. Para continuar con la degradación es necesaria la acción de una enzima descalificante, la cual permita romper la ramificación del glucógeno,  $\alpha$ -glucosidasa (también llamada isomaltasa). (Tesauro & Mazzotta, 2019). Esta acción expone un grupo nuevo de ramificaciones con enlaces  $\alpha$ , que pueden ser atacados por la  $\alpha$ -amilasa hasta alcanzar una nueva serie de ramificaciones con enlaces  $\alpha$ . El resultado final de la acción secuencial de estas dos enzimas es la degradación completa de almidón o del glucógeno a maltosa y algo de glucosa. La maltosa es fragmentada

por la maltasa, generando dos moles de glucosa, que se absorbe en el torrente sanguíneo y se transporta a los diversos tejidos para su utilización (Zhang, 2018).

Los carbohidratos que han sido resistentes a todo el proceso de digestión llegan al colon donde son fermentados por bacterias para producir ácidos grasos.

Tras la ingestión de carbohidratos hay un aumento de glucosa en la sangre y en respuesta a esto también existe un incremento de los niveles de insulina para promover la absorción de la glucosa y almacenarla en el hígado y tejido en forma de glucógeno (Heydari et al., 2019)

Al inhibir estas enzimas se puede retardar la descomposición y la absorción de carbohidratos como dextrinas, maltosa y maltotriosa para producir glucosa, lo que evita la absorción de la glucosa en el torrente sanguíneo y suprime la hiperglucemia postprandial.

### 3.7 Tratamiento farmacéutico para la diabetes mellitus

En la actualidad se dispone de una variedad de alternativas terapéuticas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Los hipoglicemiantes orales disponibles actualmente son las sulfonilureas, meglitinidas y derivados de D-fenilalanina, que estimulan la secreción de insulina. Las biguanidas que reducen la gluconeogénesis hepática y estimulan la incorporación de glucosa por los tejidos periféricos. Las tiazolidindionas (glitazonas), que disminuyen la resistencia a la insulina; y los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, que disminuyen la absorción intestinal de los carbohidratos (Habtemariam, 2019).

Tabla 2.

*Grupos de medicamentos orales con diferentes mecanismos de acción para tratar la DM tipo 2*

<b>FÁRMACO</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>EFEKTOS ADVERSOS</b>
<b>Sulfonilureas</b>	Estimulan al páncreas a producir más insulina	hipoglucemia, eventos cardiovasculares, agranulocitosis, trombocitopenia, anemia hemolítica y aplástica, erupción cutánea,
<b>Meglitinidas</b>	Estimulan al páncreas a producir más insulina	dolor de cabeza, náuseas, diarrea, vómito y porfiria hepática
<b>Inhibidores de las alfa-glucosidasas</b>	Retrasan la absorción y digestión de los azúcares en el tubo digestivo.	Flatulencia, dolor abdominal, diarrea y erupción cutánea, , cirrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, úlcera de colon y obstrucción parcial del intestino.
<b>Biguanidas</b>	Estos fármacos mejoran la utilización del azúcar en los tejidos o disminuyen la liberación	Diarrea, náusea, vómito, flatulencia, indigestión, incomodidad abdominal y dolor de cabeza, falla cardíaca congestiva.

<b>Tiazolidindionas</b>	del azúcar por el hígado producen una mayor sensibilidad a la insulina, aunque aún no se conoce bien el mecanismo de acción por el cual actúan	infecciones del tracto respiratorio superior, dolor de cabeza, sinusitis, mialgia, desorden de los dientes y agravamiento de la diabetes
-------------------------	--	--

Fuente: Altagracia-Martínez et al., (2007)

Cada clase de medicamentos tiene indicaciones terapéuticas asociadas a las características individuales de los pacientes y grado de avance de la diabetes. También de las enfermedades concomitantes que padezca el paciente, así como del peso, la estatura, sexo y cultura (Altagracia-Martínez et al., 2007).

El uso irracional del medicamento ocasiona daño a la salud del paciente y a la economía del sistema de salud. Los costos económicos asociados al tratamiento y sus complicaciones representan una grave carga para los servicios de salud y para los pacientes.

De los fármacos mencionados para el control de la diabetes mellitus tipo 2 destaca la acarbosa. Es un inhibidor competitivo de las  $\alpha$ -glucosidasas localizadas en el borde de cepillo de la mucosa intestinal. (Bray, 2017). En condiciones normales estas enzimas son las responsables de la hidrólisis de los carbohidratos complejos (almidón y otros oligosacáridos) en azúcares simples absorbibles (monosacáridos, sobre todo glucosa). El efecto de la acarbosa consiste en retrasar la digestión de los oligosacáridos en el intestino delgado, de manera que la liberación y absorción de glucosa sea más prolongada, resultando en una reducción directa de la hiperglucemia posprandial. (Floris A. Van De Laar et al., 2005)

### 3.8 Inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasa y $\alpha$ -amilasa

La acarbosa y el miglitol son los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa usados clínicamente. De estos, la acarbosa es un producto natural aislado de una cepa de *Actinoplanes* mientras que el miglitol es el análogo de N-hidroxietilo de 1-desoxinojirimicina aislado de especies de *Morus*. Este tipo de medicamentos no están exentos de efectos secundarios y producen graves molestias gastrointestinales, predominantemente flatulencia, dispepsia y diarrea (Jaisankar, 2018). Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa son los únicos hipoglicemiantes orales no sistémicos que pueden ayudar en el manejo de la DM tipo 2. La acarbosa (Precose®) y el miglitol (Glyset®), los dos fármacos disponibles de esta clase, inhiben a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa

Tabla 3.

*Características, grupos y acción de duración de los hipoglicemiantes orales*

<b>Fármaco</b>	<b>dosis diaria</b>	<b>dosis/ día</b>	<b>duración de la acción</b>	<b>principales efectos adversos</b>
<b>fulfoniluras</b>				
<i>primera generación</i>				
tolbutamina	0.5-2.0 g	2-3	6-12	Hipoglucemia, aumento de peso
acetohexamina	0.25-1.5 g	1-2	8-24	
tolazamina	0.1-1.0 g	1-2	12-24	
clorpropamida	1.25-20.0 mg	1	36-72	
<i>segunda generación</i>				
gliburina	5-20 mg	1-2	16-24	
glimipiride	1-4 mg	1		
<b>Meglitinidas</b>				
Repaglinina	1-6 mg	2-4	1-2	Hipoglucemia, aumento de peso
<b>Biguanidas</b>				
Metformina	1.0-2.5 g	2-3	6-12	Intolerancia gastrointestinal
<b>Inhibidores de la <math>\alpha</math>- glucosidasa</b>				
Acarbosa	75-300 mg	3	4	Intolerancia gastrointestinal
Miglitol	75-300 mg	3	4	
<b>Tiazolidinedionas</b>				
Rosiglitazona	2-8 mg	1-2	12-24	Retención hídrica, hepatotoxicidad
Pioglitazona	15-45 mg	1	24	
<b>Derivados de la D-fenilalanina</b>				
Nateglinida	60-120	3	1.5	Hipoglucemia, aumento de peso

Fuente: Jaisankar, (2018).

Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa tienen un efecto sobre la prueba de hemoglobina glicosilada (HbA1c), reduciendo los niveles en 0.5 a 1 % y la glicemia postprandial entre 50 y 60 mg/ dl. La diferencia fundamental entre la acarbosa y el miglitol está en su absorción. La acarbosa tiene características estructurales de una tetrasacaridasa y atraviesa muy poco la membrana de las microvellosidades. El miglitol, sin embargo, tiene una estructura similar a la glucosa y por lo tanto es absorbido (Al et al., 2001)

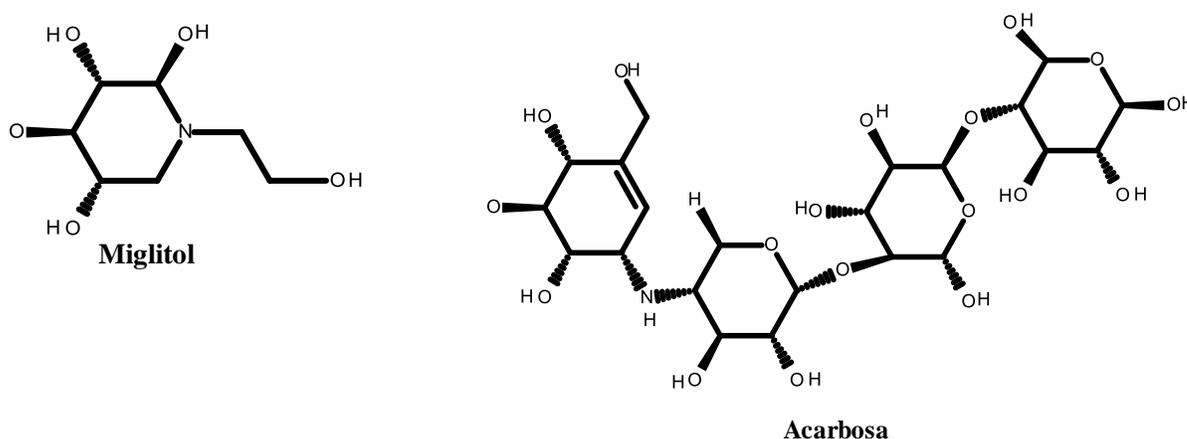


Figura 1. Estructuras químicas de los principales inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa.

Fuente: Bray, (2017).

Elaboración en software BIOVIA DRAW 2019

### 3.9 Tratamiento herbolario para la diabetes mellitus

En la actualidad más de 400 tratamientos naturales con plantas para la diabetes mellitus han sido registrados, pero solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia (Luján et al., 2009). Para inhibir las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, se busca como alternativa utilizar plantas medicinales que sean capaces de realizar la misma función que tienen los fármacos. Para lograr este objetivo se han realizado diferentes estudios en plantas, entre estas se encuentra la *S. amarissima*. (Santos 2019) en su estudio reporta que esta planta posee abundantes compuestos fenólicos, así como también flavonoides.

Se han descrito ampliamente diferentes mecanismos de acción de plantas medicinales con antidiabéticos. Estos incluyen la inhibición de la reabsorción renal de la glucosa, la estimulación de la secreción de insulina de las células  $\beta$  de los islotes y/o la inhibición de los procesos de degradación de la insulina. La reducción de la resistencia a la insulina, regenerando y/o reparando las células  $\beta$  pancreáticas al aumentar el tamaño y el número de células en los islotes de Langerhans. La estimulación de la secreción de insulina y la estimulación de la glucogénesis y la glucólisis hepática con plantas antidiabéticas está bien establecida (P. Singh et al., 2015)

Uno de los Estados con más recursos etnobotánicas producto de un gran legado multicultural es Oaxaca. (Castro Juarez *et al.*, 2014) reportan 35 especies certificadas de plantas comúnmente usadas para el tratamiento de la DM2 en el estado de Oaxaca, dentro de las cuales se encuentra la Familia botánica Lamiaceae, genero *Salvia*, especies *splendens* K Gawl, *amarissima* Ort., *urica* Epling. Siendo estas las principales.

### **3.10 Uso de plantas en fármacos**

La OMS estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo la existencia de 119 sustancias de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes, útiles en más de 60 categorías terapéuticas. Obtenidas principalmente de 91 especies. El estudio de las plantas medicinales y su evaluación con métodos científicos actuales, sus efectos farmacológicos y tóxicos han permitido su incorporación a la llamada medicina moderna. Estos medios tradicionales con verdadera efectividad, han ido ganando prestigio en la práctica médica actual (Beyra et al., 2004).

El 75% de la población mundial utiliza las plantas medicinales, y el uso tradicional fundamental es en forma de cocción de la planta entera o de sus partes y no de sus principales componentes aislados o purificados. Se estima en 5 mil el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica, que es una pequeña fracción del total estimado en 3 millones de especies (Luján et al., 2009).

La OMS ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos.

Los efectos hipoglucémicos de algunas plantas usadas como remedios antidiabéticos se ha confirmado en las poblaciones rurales que las usan, y los mecanismos de la actividad hipoglucémica de estas plantas se ha comenzado a estudiar.

Estos remedios son efectivos, no producen efectos secundarios y son de bajo costo comparados con los agentes hipoglucémicos sintéticos orales (S. K. Singh et al., 2008). Por lo tanto es prioritario investigar sobre medicina tradicional con los recursos disponibles en la región para conseguir un aprovechamiento y uso de la misma con un respaldo científico (Beyra et al., 2004). La OMS estima que 4 mil millones de personas, el 80% de la población mundial, utiliza actualmente la medicina herbal para algún aspecto de la atención primaria de salud.

La medicina herbaria es un componente importante en la medicina tradicional de todos los pueblos indígenas y un elemento común en la medicina ayurvédica, homeopática, naturopática y oriental tradicional.

Salgueiro *et al.* (2018) reportaron que las personas con diabetes mellitus consumen cinco o más tazas de té de plantas diariamente. La media de consumo por día es de 1.73 L y la mayoría de las personas adquieren las plantas medicinales en el comercio local. Las personas que han usado plantas medicinales informaron resultados positivos después de su uso

La población mexicana emplea más de 300 especies de plantas para tratar los síntomas de la diabetes. En algunos casos, los pacientes combinan terapias alopáticas con los remedios botánicos (Salinas-Arellano et al., 2020).

### **3.11 Familia Lamiaceae**

Lamiaceae es una familia muy diversa, incluye 236 géneros y 7,173 especies. Es muy diversa en zonas templadas, particularmente en el Mediterráneo y la región central de Asia. En México se encuentra ampliamente distribuida, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje Neovolcánico transversal.

Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*) (Loizzo et al., 2008).

La familia está representada en México por 32 géneros nativos. Por lo que es común encontrarlos de manera silvestre y ampliamente distribuidos, como el caso de *Prunella*. Los géneros pertenecen a 4 subfamilias e incluyen 591 especies. Además, se encuentran 17 géneros introducidos o cultivados, que en ocasiones pueden encontrarse de forma Silvestre (Martínez-Gordillo et al., 2013)

Tabla 4.

*Especies de diversos géneros pertenecientes a la familia Lamiaceae distribuidas en México.*

<b>Género</b>	<b>Número de especies en el mundo</b>	<b>Número de especies en México</b>	<b>Número de especies endémicas</b>	<b>Porcentaje de endemismo (%)</b>
<i>Acanthomintha</i>	4	1	0	0
<i>Aegiphila</i>	116	10	1	10
<i>Agastache</i>	22	12	5	41.6
<i>Asterohyptis</i>	4	4	3	75
<i>Callicarpa</i>	40	2	1	50
<i>Catoferia</i>	4	3	1	33.3
<i>Chaunostoma</i>	1	1	0	0
<i>Clinopodium</i>	100	14	10	71.4
<i>Cornutia</i>	12	1	0	0
<i>Cunila</i>	20	6	5	83.3
<i>Hedeoma</i>	42	29	21	72.41
<i>Hypenia</i>	23	1	1	100
<i>Hyptis</i>	280	35	17	48.5
<i>Lepechinia</i>	40	10	6	60
<i>Marsypianthes</i>	5 o 6	2	1	50
<i>Monarda</i>	17	6	3	50
<i>Monardella</i>	30	9	2	22.2
<i>Neoeplingia</i>	1	1	1	100
<i>Pogogyne</i>	7	3	1	30
<i>Poliomintha</i>	8	8	5	62.5
<i>Prunella</i>	7	1	0	0
<i>Salvia</i>	900	307	232	75.57
<i>Scutellaria</i>	301	56	38	67.85
<i>Stachys</i>	300	41	29	70.7
<i>Tetraclea</i>	2	1	0	0
<i>Teucrium</i>	100	6	2	33.3
<i>Trichostema</i>	18	9	2	11.11
<i>Vitex</i>	250	4	2	50

Fuente: Martínez-Gordillo et al., (2013)

### **3.11.1 Género *Salvia***

*La salvia* es un género importante, ampliamente cultivado y utilizado en medicinas populares. Es una fuente rica en polifenoles, ya que se han identificado más de 160 polifenoles, y algunos de ellos son exclusivos del género (Yinrong & Yeap, 2002).

El género agrupa 900 especies con una sub-cosmopolita distribución. En México, se localizan alrededor de 275 especies que se presentan en las zonas montañosas, principalmente en las del centro, y sur del país. Las formas de crecimiento de las especies de *Salvia* incluyen hierbas anuales y perennes, arbustos y raramente arbustos trepadores, las flores presentan cáliz y corola bilabiados, el ovario se divide en 4 lóculos y el estilo es ginobásico (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011). Muchas especies de *Salvia* se utilizan con fines etnomédicos para mejorar una amplia variedad de dolencias. Sus Propiedades biológicas de sus compuestos son relevantes como antiinflamatorios, antivirales, antiprotozoarios, agentes citotóxicos y fitotóxicos (Martínez-Gordillo et al., 2013)

### **3.11.2 *Salvia amarissima***

Entre las especies altamente valoradas en México para el tratamiento de la diabetes se encuentra *Salvia amarissima* perteneciente a la familia de la menta. Es un arbusto aromático perenne originario de México, identificada como medicinal en el catálogo de plantas de las Reales Expediciones Botánicas a Nueva España (Salinas-Arellano et al., 2020) *S. amarissima* es melitófila (polinizada por abejas). De acuerdo a la medicina popular mexicana, un té elaborado de partes aéreas secas de la planta es útil para tratar la diabetes, úlceras y helmintiasis. La especie se considera comúnmente como "insulina" en referencia a su eficacia para mejorar la condición diabética (Salinas-Arellano et al., 2020)



Figura 2. Espécimen de *Salvia amarissima*.

Fuente: Propia.

### 3.12 Propiedades de los compuestos fenólicos

Para comprender la estructura química de los compuestos fenólicos es importante comenzar con el fenol, que es la molécula básica (Figura 3). El fenol se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH), (Peñarrieta et al., 2014). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios derivados de las vías fosfato-pentosa, shikimato y fenilpropanoide en las plantas. Estos compuestos juegan un papel importante en el crecimiento y la reproducción de las plantas, brindando protección contra patógenos y depredadores. Además de contribuir con el color y las características sensoriales de los vegetales y las hortalizas (Jasicka-Misiak et al., 2018)

Los efectos benéficos derivados de los compuestos fenólicos se han atribuido a su actividad antioxidante. Estructuralmente, los compuestos fenólicos comprenden un anillo aromático, con uno o más sustituyentes hidroxilo. Variando desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados. A pesar de esta diversidad estructural, el grupo de compuestos a menudo se denomina polifenoles. Los compuestos fenólicos pueden clasificarse básicamente en varias clases, tales como, ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, estilbenos (Martins et al., 2014).

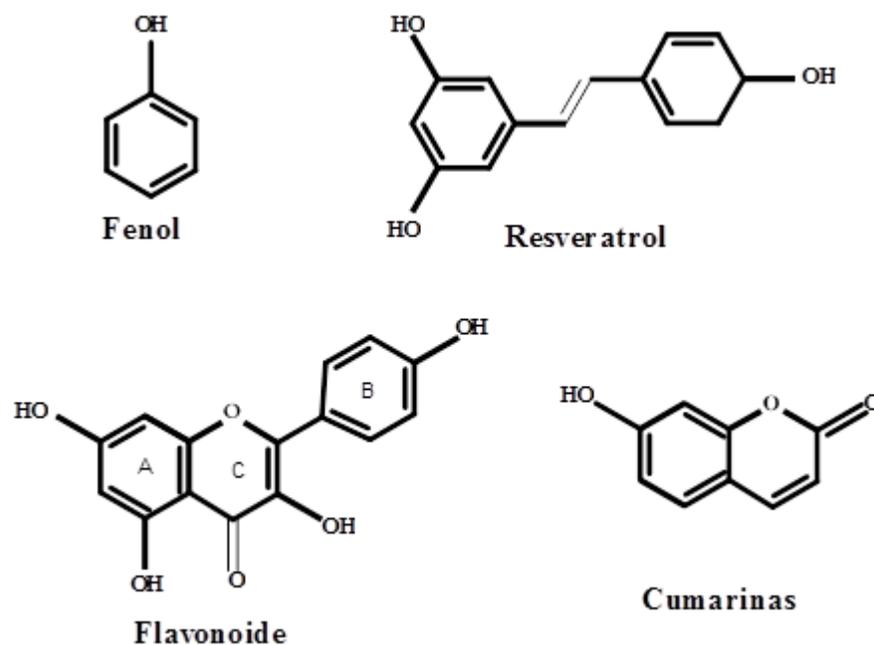


Figura 3. Compuestos fenólicos representativos.

Fuente: Girón, (2013)

Elaboración en software BIOVIA DRAW 2019

### 3.13 Actividad antidiabética de extractos de planta

Los extractos de plantas tienen compuestos químicos que demuestran efectos alternativos y seguros sobre la diabetes mellitus. La mayoría de las plantas contienen glucósidos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, carotenoides, etc., que están frecuentemente implicados en tener efecto antidiabético (Shao & Lin, 2018).

Las plantas medicinales constituyen una rica fuente de compuestos bioactivos que están libres de efectos adversos y tienen excelente acción farmacológica, puede favorecer el desarrollo de nuevos agentes antidiabéticos (Luján et al., 2009).

Los efectos antidiabéticos de los extractos de plantas pueden ser estudiados usando modelos *in vivo* o usando una variedad de sistemas *in vitro*. Los sistemas *in vitro* juegan un papel importante en la evaluación de la actividad antidiabética de los fármacos y proporcionan las

herramientas iniciales para la selección de un gran número de candidatos terapéuticos potenciales (Carlson, 2019).

### **3.14 Actividad antidiabética *in vitro***

Investigaciones recientes han demostrado que la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa pueden controlar la elevación de los niveles de glucosa en sangre. En la actualidad los inhibidores de estas enzimas como la acarbosa, miglitol, voglibosa, son utilizados ampliamente en pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, se ha documentado que estos inhibidores tienen efectos adversos tales como flatulencias, diarrea etc.

Hoy en día se han dedicado a realizar diferentes estudios sobre inhibidores de estas enzimas provenientes de extractos de plantas. Los resultados obtenidos han sido favorables, utilizando distintas técnicas de evaluación para comprobar la capacidad inhibitoria de los extractos de las plantas.

Inocente Camones et al., (2019) evaluaron la inhibición de la difusión de la glucosa utilizando polisacáridos aislados de *Nostoc Sphaericum Vaucher ex Bornet* y *Flahault* tratados mediante digestión gastrointestinal simulada a nivel *in vitro*. Los resultados mostraron una concentración de 50 mg/mL de polisacáridos digeridos disminuye en un 85.26 % la difusión de la glucosa a nivel *in vitro*. Motivo por el cual, la especie sería considerada promisorio para un posible tratamiento coadyuvante de la diabetes tipo 2.

Además del método de evaluación de la inhibición de la difusión de glucosa, se encuentra la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa *in vitro*. Este método se basa en la inhibición de la enzima en presencia del extracto. Se inicia cuando se adiciona un sustrato como almidón el cual, al ser hidrolizado con la enzima, propicia la liberación de azúcares reductores, estos azúcares reaccionan con un reactivo colorimétrico, el cual produce un cambio de color que puede ser medido espectrofotométricamente e indicar el efecto del extracto sobre la actividad enzimática (Nickavar & Yousefian, 2011). La inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se basa en la liberación de una molécula de *p*-nitrofenol como producto del sustrato utilizado *p*-nitrofenilo- $\alpha$ -*D*-glucopiranosido en presencia de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. En donde la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa se evalúa indirectamente a través del *p*-nitrofenol liberado ya que puede ser medido espectrofotométricamente (Acosta Vargas *et al.*, 2019).

En el presente estudio se empleó una prueba de inhibición de  $\alpha$ -amilasa *in vitro* para determinar el potencial inhibitorio de los extractos de hoja de *S. Amarissima*.

### 3.15 Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de la dieta y por tanto la mayor fuente de energía del hombre y los animales. Los almidones están constituidos principalmente por dos polisacáridos amilosa y amilopectina en proporciones que van desde el almidón normal (18-30 % de amilosa) hasta almidón con contenido de amilosa alto (alrededor de 70 %) (Medina *et al.*, 2010).

El almidón se encuentra como fuente de reserva energética en frutos, semillas de leguminosas, cereales, tubérculos, entre otros.

La proporción en la que se encuentra cada uno de los polisacáridos se rige por la genética de la fuente utilizada para su extracción, lo cual influye en sus propiedades funcionales (Badui-Dergal, 2006).

La  $\alpha$ -amilosa es un  $\alpha$ -D-(1,4)-glucano, constituida desde 200 hasta 2,500 unidades repetitivas de  $\alpha$ -maltosa, que forman cadenas lineales (Figura 4). Este polisacárido puede adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en donde cada hélice consta de seis moléculas de glucosa (Badui-Dergal, 2006).

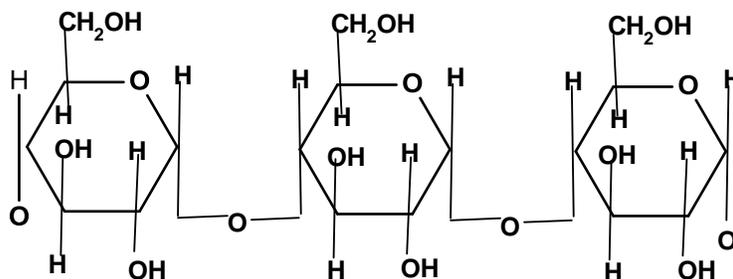


Figura 4. Estructura de la  $\alpha$ -amilosa

Fuente: Badui, (2006).

Elaboración en software BIOVIA DRAW 2019

Por otra parte, la amilopectina presenta ramificaciones con enlaces  $\alpha$ -D-(1,6) localizadas cada 15-25 unidades de glucosa (Figura 5). Las cadenas formadas pueden contar de 10,000 a 20,000 unidades, es decir, son significativamente más grandes en comparación con las de la  $\alpha$ -amilosa (Badui-Dergal, 2006).

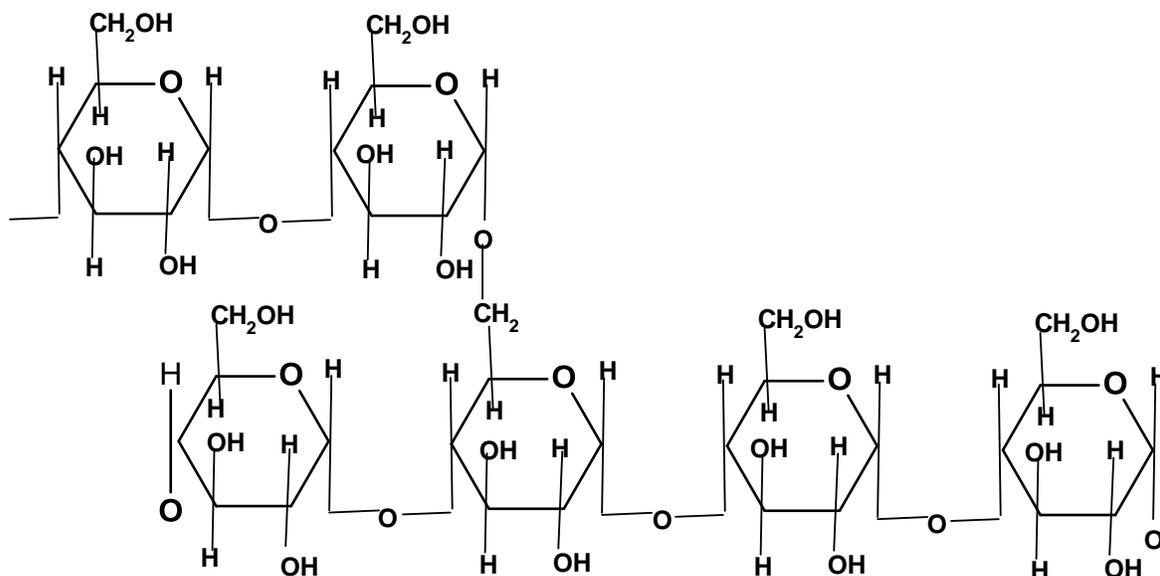


Figura 5. Estructura de la amilopectina

Fuente: Badui, (2006).

Elaboración en software BIOVIA DRAW 2019

### 3.16 Métodos para determinar el porcentaje de $\alpha$ -amilosa y amilopectina

Para establecer el contenido de  $\alpha$ -amilosa en almidones se han utilizado procedimientos, como los basados en la calorimetría diferencial y en la separación por exclusión de tamaño, o en la resonancia magnética nuclear. El método empleado para el presente trabajo fue a partir del valor azul, debido a que la  $\alpha$ -amilosa presente en el almidón tiene la propiedad de formar un complejo de inclusión con triyoduro, el cual posee un intenso color azul y puede ser cuantificado colorimétricamente (Han *et al.* 2012). Además de llevar a cabo la determinación

del porcentaje de  $\alpha$ -amilosa mediante la cuantificación colorimétrica, se llevó a cabo un pretratamiento del almidón para realizar la separación de la  $\alpha$ -amilosa y la amilopectina de la papa. El pretratamiento de la fécula consistió en remover la grasa del almidón y así facilitar la extracción de la  $\alpha$ -amilosa y amilopectina. Cabe señalar que los ácidos grasos derivados de la grasa provocan una disminución del color azul que forman los complejos  $\alpha$ -amilosa tri-yoduro. Por lo tanto, se obtienen valores más bajos (Juliano 1971).

Después de la separación de la  $\alpha$ -amilosa está se llevó a sequedad para ser utilizada en la evaluación de la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos de *S. amarissima*.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Obtención de la muestra

La muestra de la planta de *S. amarissima* se colectó en el mes octubre de 2020 en la comunidad de la Sabana Copala, que se localiza en el municipio de Santiago Juxtlahuaca del Estado de Oaxaca, y se ubica en las siguientes coordenadas GPS: Longitud (des): -97.958889, Latitud (des): 17.196389, a una altura de 1,777 metros sobre el nivel del mar. Posteriormente la muestra se transportó al laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

### 4.2 Selección y almacenamiento

Para la selección de la muestra se revisó que estuviera en buen estado, es decir que no presentara ninguna enfermedad, plaga o daños físicos. Las hojas se retiraron del tallo manualmente, se lavaron y se dejaron secar. Posteriormente se colocaron en bolsas de cierre hermético, ziploc. Las muestras de hojas que se utilizaron para pruebas en fresco se almacenaron a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Mientras que las muestras deshidratadas se almacenaron a  $5^{\circ}\text{C}$  en un refrigerador.



*Figura 6.* Hoja de *S. amarissima*.

Fuente: Propia.

### 4.3 Determinación de humedad

La determinación de humedad se realizó por el método de la AOAC 934.06. En una estufa marca Cecsa modelo TOHD433 se colocaron 3 crisoles a una temperatura de 105°C por 12 h. Para llevarlos a peso constante, posteriormente se colocaron dentro de un desecador por 5 min para después pesarlos (Apéndice 1). A cada crisol se le colocaron 4 g de muestra fresca y nuevamente se introdujeron a la estufa a una temperatura de 105°C por 6 h para realizar la determinación de humedad. Trascorridas las 6 h, los crisoles se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador para después pesarlos. La determinación de la humedad se realizó con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de humedad} = \left( \frac{p_2}{p_1} \right) * 100$$

Donde:

P<sub>2</sub>: Masa final en gramos de la muestra.

P<sub>1</sub>: Masa inicial en gramos de la muestra.

### 4.4 Deshidratación y molienda

La deshidratación de las hojas de *S. amarissima* se realizó en un secador de charolas rotatorias con corriente de aire continuo (Apéndice 2). En cada charola se colocaron hojas de *S. amarissima* esparcidas. Tomando en cuenta tres grupos de hojas para monitoreo. La pérdida de humedad se midió cada 15 min, hasta que la muestra alcanzó una humedad final del 10%. El deshidratador se operó a una temperatura de 50°C con una corriente de aire de 1.2 m/s. Las hojas deshidratadas se molieron en un molino de café marca SAYONA modelo SY-601220-240V-50/60Hz, y se tamizaron a través de una malla #60 posteriormente se almacenaron y sellaron para impedir la entrada de aire. Las muestras se almacenaron a -18°C (Apéndice 3).



*Figura 7.* Polvo de hoja de *S. amarissima* deshidratada.

Fuente: Propia.

#### **4.5 Obtención de los extractos de la muestra (Santos 2019)**

Se utilizó el método de extracción por ultrasonido usando como disolvente EtOH al 70%. Se pesaron 50 mg de hoja fresca y 20 mg de polvo de hoja en tubos eppendorf, posteriormente a cada tubo se le agregó 1 mL de EtOH al 70%. La mezcla se sonicó en un baño de ultrasonido a temperatura ambiente durante 40 min, para promover la extracción de los compuestos bioactivos. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Finalmente, el extracto se decantó y se recibió en viales ámbar, y se almacenó a  $-18^{\circ}\text{C}$ . La extracción de los compuestos se realizó por triplicado (Apéndice 4).

Para la cuantificación de fenoles en el extracto de hoja fresca se realizó una dilución 1:5 (200  $\mu\text{L}$  de muestra + 1000  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70 %) y para el extracto seco una dilución 1:25 (40  $\mu\text{L}$  de muestra + 1000  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70 %).

#### **4.6 Fenoles totales (Girón 2013)**

##### **4.6.1 Preparación de las disoluciones**

*Disolución de EtOH acuoso al 90% (v/v).* Se agregaron 90 mL de EtOH destilado en un matraz de 100 mL y se llevó a la línea de aforo con agua destilada.

*Disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.5% (p/v).* 50 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a la línea de aforó con agua destilada. *Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M y se aforó con agua destilada. *Ácido gálico a 100 µg/mL y estándares.* En un matraz volumétrico de 10 mL se agregaron 10 mg de ácido gálico y se aforó con EtOH al 90%. Posteriormente para obtener la solución patrón, 1 mL de la disolución anterior se transfirió a un matraz de 10 mL y se aforó con EtOH al 90%. Los estándares de ácido gálico que se utilizaron para la curva de calibración se obtuvieron a partir de la disolución patrón de ácido gálico a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL. (Apéndice 5).

#### **4.6.2 Cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu**

En una microplaca limpia y sin ralladuras se mezclaron 40 µL del estándar de ácido gálico o de muestra con 40 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M. El blanco de los estándares se preparó con el estándar de 25 µg/mL y se les adicionó agua destilada en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M. Esta mezcla se dejó reposar durante 3 min en el lector de microplacas, al término del reposo, la mezcla se agitó durante 1 min a velocidad media. Después se adicionaron 40 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.5%. La muestra se dejó reposar a 40°C durante 30 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un lector de microplacas marca BioTek. La concentración de fenoles totales en las muestras se determinó mediante una curva de calibración que se construyó con los estándares de ácido gálico, y con ella se realizó una regresión lineal que permitió generar la ecuación de calibración para expresar el contenido de fenoles totales presentes en la muestra fresca y seca. El resultado se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g ms). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **4.7 Flavonoides totales (Girón 2013)**

##### **4.7.1 Preparación de las disoluciones**

*Disolución de NaNO<sub>2</sub> al 1.5% (p/v).* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocó 150 mg de NaNO<sub>2</sub> y posteriormente se llevó a la línea de aforó con agua destilada.

*Disolución de AlCl<sub>3</sub> al 3 %.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 300 mg de AlCl<sub>3</sub> y posteriormente se llevó a la línea de aforó con agua destilada.

*Disolución de NaOH 1 M.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 400 mg de NaOH y posteriormente se llevó a la línea de aforó con agua destilada.

*Disolución patrón de rutina 1000 µg/mL.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 10 mg de rutina y posteriormente se aforó con EtOH al 90%. A partir de esta disolución se prepararon los estándares de rutina de 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL (Apéndice 6).

#### **4.7.2 Cuantificación de flavonoides.**

En un vial ámbar se mezcló 1 mL de extracto o estándar de rutina con 1 mL de NaNO<sub>2</sub> al 1.5%. La mezcla se llevó a agitación por 5 min en un vortex a temperatura ambiente. Posteriormente, en una microplaca limpia y sin ralladuras se colocaron 50 µL de esta disolución y se mezcló con 50 µL de AlCl<sub>3</sub> al 3%. La microplaca se colocó en el lector de microplacas BioTekLX-808 y se agitó durante 1 min a velocidad variable. Posteriormente la microplaca se retiró del lector y se le adicionaron 50 µL de NaOH 1 M y nuevamente se sometió a una agitación en el lector por 1 min. Transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 490 nm.

Al blanco de la muestra o del estándar se le adicionó agua destilada en lugar de AlCl<sub>3</sub>. Para el blanco de los estándares se utilizó la disolución de rutina de 250 µg/mL. A partir de los valores de absorbancia de los estándares se construyó la curva de calibración que permitió expresar el contenido de flavonoides totales presentes en la muestra fresca y seca. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El resultado se expresó en miligramos equivalentes de rutina (mg ER/g de ms).

## **4.8 Determinación del porcentaje de $\alpha$ -amilosa en fécula de papa a partir del valor azul (Han *et al.* 2012).**

### **4.8.1 Preparación de las disoluciones**

*Disolución de NaOH 1 N.* En un matraz volumétrico de 25 mL se colocó 1 g de NaOH. Posteriormente, el matraz se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de ácido acético 1 N.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 577  $\mu$ L de ácido acético. Posteriormente, el matraz se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de yodo.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 20 mg de yodo y 200 mg de yoduro de potasio. Posteriormente el matraz se aforó con agua tipo 1.

### **4.8.2 Determinación del porcentaje de $\alpha$ -amilosa**

En un vial de 4 mL se mezclaron 25 mg de fécula de papa con 250  $\mu$ L de EtOH al 95% y 2.25 mL de NaOH 1 N. La suspensión se calentó por 10 min en un baño de agua hirviendo para gelatinizar el almidón. Posteriormente, la mezcla se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL con varios lavados con agua tipo 1 y después se aforó. Una alícuota de 1.25 mL de esta disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se mezcló con 250  $\mu$ L de ácido acético 1 N y 500  $\mu$ L de la disolución de yodo. Finalmente, una alícuota de 3.5 mL de esta mezcla se transfirió a una celda de polietileno de 1 cm de camino de haz. Posteriormente, se llevó a un espectrofotómetro Hach y se midió la absorbancia a 680 nm. Los blancos se prepararon de forma idéntica, pero sin fécula de papa (Apéndice7).

La concentración de  $\alpha$ -amilosa en la harina expresada en porcentaje (p/p) se calculó a partir de la ecuación de calibración generada con datos reportados para un conjunto de nueve datos del valor azul *vs* contenido de  $\alpha$ -amilosa de harinas de arroz.

$$\% \text{ de amilosa} = 56.203 (\text{absorbancia}) + 5.0051$$

El contenido de amilopectina se calculó por diferencia respecto al contenido de  $\alpha$ -amilosa aparente.

## **4.9 Obtención de $\alpha$ -amilosa (Lemos *et al.* 2019)**

### **4.9.1 Pretratamiento del almidón**

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL provisto de un termómetro se mezclaron 5 g de fécula de papa y 95 mL de glicerol al 70 %. La disolución se calentó lentamente hasta 50°C a una velocidad de 0.8°C/min, en un baño de ultrasonido. La disolución se calentó a 50°C durante 1 h. Se dejó enfriar para después filtrarla a través de un papel filtro whatman #5, en un sistema de filtración a vacío. El sólido retenido se lavó con 50 mL de EtOH absoluto hasta que los restos de glicerol se removieron completamente. La muestra se transfirió a una estufa y se dejó por 1 h a 40°C. Finalmente, el sólido retenido en el papel filtro se pesó y almacenó (almidón desengrasado).

### **4.9.2 Separación de $\alpha$ -amilosa y amilopectina**

#### **4.9.3 Preparación de las disoluciones**

*Disolución amortiguadora de fosfatos a un pH de 6.15.* En un matraz de 100 mL se transfirieron 1.25 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 0.34 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Posteriormente, el matraz se aforó con agua tipo 1.

#### **4.9.4 Separación de $\alpha$ -amilosa**

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 2 g de almidón desengrasado y 100 mL de disolución amortiguadora de fosfatos a un pH de 6.15. La mezcla se agitó a 200 rpm a una temperatura de 98°C por 15 min. La suspensión se enfrió usando un baño de hielo (0-2°C). Posteriormente se transfirió a tubos falcón y se sometió a una centrifugación a 4500 rpm por 1 h. El sobrenadante que se obtuvo fue una disolución de  $\alpha$ -amilosa que se almacenó a 8°C. Mientras que el precipitado, el cual consistió de amilopectina se filtró y lavó con EtOH acuoso para después almacenarlo a 8°C.

#### **4.9.5 Obtención de $\alpha$ -amilosa en polvo**

40 mL del sobrenadante constituido de  $\alpha$ -amilosa se mezclaron con 120 mL de butanol. Esta mezcla se dejó reposar por 8 h. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 4500 rpm por 20 min. La fracción se filtró y los sólidos retenidos en el papel filtro se transfirieron a un matraz bola con esmerilado 24/40. La muestra se llevó a sequedad en un rotavapor a vacío a una

temperatura no mayor a 40°C. El producto obtenido fue una película, la cual se molió con ayuda de un mortero.

#### **4.9.6 Solubilización de la $\alpha$ -amilosa**

En un vaso de precipitado de 15 mL se colocaron 10 mg de  $\alpha$ -amilosa y 1 mL de NaOH 1 N. La mezcla se dejó reposar por 15 h, a 8°C. Posteriormente se agregaron 7 mL de agua tipo 1 y gotas de CH<sub>3</sub>COOH hasta obtener un pH de 5.0 y 10 mg de azida de sodio para evitar contaminación microbiana. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con agua tipo 1. Para obtener una mayor solubilidad de la  $\alpha$ -amilosa de papa, la disolución se sometió a un calentamiento en baño de agua a 80 °C por 1 h, posteriormente se sonicó 10 min. A partir de la disolución se prepararon los estándares de 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL para construir la curva de calibración (Apéndice 8).

#### **4.10 Reacción de $\alpha$ -amilosa de papa**

##### **4.10.1 Preparación de las disoluciones**

*Disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5.* En un matraz volumétrico de 50 mL se mezclaron 85 mg de CH<sub>3</sub>COONa con 104 µL de CH<sub>3</sub>COOH y 10 mg de azida de sodio. Posteriormente, el matraz se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de triyoduro 0.01 M.* En un matraz volumétrico de 50 mL se adicionaron 63.45 mg de yodo molecular y 41.5 mg de KI. Posteriormente, el matraz se aforó con agua tipo 1

*Disolución de HCl 1.5 M.* En un matraz volumétrico de 10 mL se agregaron 1.47 mL de HCl y se aforo con agua tipo 1.

##### **4.10.2 Reacción**

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 30 µL de EtOH al 70%, 30 µL del estándar correspondiente, 30 µL de disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5, 10 µL de HCl 1.5 M y 50 µL de triyoduro 0.01 M. Esta mezcla se dejó reposar a 37 °C por 5 min. Al blanco de los estándares se le agregaron 30 µL de buffer de acetatos 0.1 M a pH 5 en lugar del estándar. La lectura de absorbancia se realizó a 595 nm, en un lector de microplacas (Apéndice 9).

## 4.11 Reacción enzimática de $\alpha$ -amilasa con $\alpha$ -amilosa

### 4.11.1 Preparación de las disoluciones

*Disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5.* En un matraz volumétrico de 50 mL se mezclaron 85 mg de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  con 104  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y 10 mg de azida de sodio. Posteriormente, el matraz volumétrico se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de triyoduro 0.01 M.* En un matraz volumétrico de 50 mL se mezclaron con 63.5 mg de yodo molecular y 41.5 mg de KI. El matraz volumétrico se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de HCl 1.5 M.* En un matraz volumétrico de 10 mL se agregaron 1.47 mL de HCl. Posteriormente, el matraz volumétrico se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de  $\alpha$ -amilosa de papa 500  $\mu\text{g/mL}$ .* En un vial se mezclaron 500  $\mu\text{L}$  de disolución de  $\alpha$ -amilosa 1000 ppm con 500  $\mu\text{L}$  de disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M (pH = 5).

*Disolución de  $\alpha$ -amilasa 1000  $\mu\text{g/mL}$ .* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 10 mg de  $\alpha$ -amilasa y el matraz se aforó con disolución amortiguadora de acetato 0.1 M. A partir de esta disolución se prepararon estándares de 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{g/mL}$  para construir la curva de calibración (Apéndice 9).

### 4.11.2 Reacción

En una microplaca de 96 pozos se prepararon dos grupos de reacción enzimática, el primer grupo consistió de 30  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70%, 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilosa de 500  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$  de HCl 1.5 M, 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa correspondiente, el segundo grupo de reacción consistió de 30  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70%, 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilosa de 500  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa correspondiente. Esta mezcla se dejó reposar a 37°C por 5 min. Posteriormente, al segundo grupo de reacción se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de HCl 1.5 M. A ambos grupos se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de triyoduro. Nuevamente se dejó reposar por 5 min a 37°C y se leyó la absorbancia a 595 nm.

### 4.11.2 Limpieza de extractos de *Salvia amarissima* (He et al., 2007)

La limpieza de los extractos tuvo como objetivo eliminar la clorofila para que no se produjeran interferencias durante la inhibición enzimática.

Para realizar la limpieza de los extractos primero se realizó la extracción de los compuestos bioactivos presentes en las muestras frescas y secas, Apéndice 4. Posteriormente los extractos

fueron transferidos a un matraz bola con un esmerilado 24/40 y se llevaron a sequedad en un rotavapor a una temperatura no mayor a 40°C. Después, los extractos se redisolviéron en 5 mL de agua tipo 1 (Apéndice 10).

La extracción en fase sólida se llevó a cabo en tres etapas, utilizando cartuchos Supelco ENVI-18 en fase reversa. En la primera etapa el cartucho se acondicionó con 5 mL agua tipo 1 y posteriormente se adicionaron los extractos de *S. amarissima* suspendidos en agua tipo 1. En la segunda etapa se adicionaron 5 mL de etanol al 50% y finalmente en la tercera etapa se adicionaron 5 mL de etanol destilado. La fracción obtenida en la segunda etapa (etanol al 50%) se utilizó para llevar a cabo la inhibición enzimática. Las fracciones se almacenaron a -18°C.

#### **4.13 inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa *in vitro* en presencia de los extractos de *S. amarissima***

##### **4.13.1 Preparación de las disoluciones**

*Dilución del extracto fresco de 1660  $\mu\text{g/mL}$ .* En un vial se mezclaron 332  $\mu\text{L}$  de la disolución de 50 mg/mL de extracto fresco con 9668  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70%. A partir de esta disolución se prepararon estándares de 1000, 500, 250, 100, 50, 10  $\mu\text{g/mL}$ .

*Dilución de extracto seco de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .* En un vial se mezclaron 1807.2  $\mu\text{L}$  de la disolución de 20 mg/mL de extracto seco con 1192.8  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70%. A partir de esta disolución se prepararon estándares de 1000, 400, 200, 40, 20 y 5  $\mu\text{g/mL}$  (Apéndice 11).

##### **4.13.2 Reacción enzimática**

Para realizar la reacción enzimática primero se hizo un acondicionamiento térmico de la  $\alpha$ -amilasa a 25°C y la  $\alpha$ -amilosa a 80°C por 1 h. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos se prepararon dos grupos de reacción enzimática, el primer grupo consistió de 30  $\mu\text{L}$  de extracto, 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilosa de 500  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$  de HCl 1.5 M, 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa de 400  $\mu\text{g/mL}$ , el segundo grupo de reacción consistió de 30  $\mu\text{L}$  de extracto, 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilosa de 500  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa 400  $\mu\text{g/mL}$ . Para el blanco de ambos grupos se utilizaron 30  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70%. Esta mezcla se dejó reposar a 37°C por 5 min. Posteriormente, al segundo grupo de reacción se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de HCl 1.5 M. A ambos grupos se les

agregaron 50  $\mu\text{L}$  de triyoduro. Nuevamente se dejó reposar por 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y se leyó la absorbancia a 595 nm.

#### **4.14 Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa *in vitro* en presencia de acarbosa pura**

##### **4.14.1 Preparación de las disoluciones**

*Dilución de acarbosa 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 10 mg de acarbosa y se llevó a la línea de aforó con disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5. A partir de esta disolución se prepararon estándares de 75, 50, 25, 10, 5, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

##### **4.14.2 Reacción enzimática**

La reacción se llevó de acuerdo al procedimiento en la sección 4.13.2.

#### **4.15. Análisis estadístico**

Los datos del contenido de fenoles totales y flavonoides de ambas muestras (frescas y secas) se sometieron a una prueba F para evaluar si muestras presentaban varianzas iguales a un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Posteriormente según los resultados obtenidos en esta prueba se realizó un análisis comparativo de pares de medias con la prueba t de Student. Utilizando la Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales o la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

Los datos que se obtuvieron en la inhibición enzimática de la  $\alpha$ -amilasa se sometieron a un análisis comparativo de pares de media con t de Student. Se utilizó la prueba t para medias de dos muestras emparejadas para determinar diferencias significativas entre las muestras frescas y secas de extractos de *S. amarissima* a la misma concentración.

Para calcular los porcentajes de inhibición a la misma concentración se emplearon las ecuaciones de calibración generadas a partir de los porcentajes de inhibición de cada extracto (fresco y seco) *versus* concentración. Los análisis se llevaron a un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Para esta prueba se estableció como  $H_0$  que no existe diferencia significativa entre las dos muestras a las mismas concentraciones.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Humedad relativa de la hoja de *Salvia amarissima*

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la humedad relativa en hojas de *S. amarissima* recién colectada. La determinación de humedad se realizó por triplicado a una temperatura de 105°C durante 6 h. El porcentaje de humedad total de las hojas fue de  $95.12 \pm 0.24$  %.

Tabla 5.

*Porcentaje de humedad en hojas de S. amarissima.*

Réplica	Peso de cápsula (g)	Peso de cápsula + muestra (g)	Peso de muestra (g)	Peso de cápsula después de la deshidratación (g)	Humedad removida	% de humedad	Promedio	Desv. Estd	C.V.
1	39.753	43.753	4.000	39.537	4.217	94.87			
2	40.032	44.053	4.021	39.839	4.214	95.43	95.12	0.2398	0.252
3	39.812	43.887	4.076	39.605	4.283	95.16			

### 5.2 Deshidratado de las hojas de *Salvia amarissima*

La deshidratación de la muestra se realizó en un tiempo máximo de 420 min (7 h) y un mínimo de 390 min (6.5 h). Estos tiempos de secado son similares a los resultados obtenidos por Santos (2019). La diferencia de variación se puede atribuir al contenido de humedad inicial tomando en cuenta que en el estudio reportado por Santos (2019) fue de  $62.28 \pm 0.82$  y en el presente estudio se determinó una humedad inicial del  $95.12 \pm 0.24$  %.

En la Figura 8 se muestra la pérdida de humedad con respecto al tiempo de las hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50 °C, en un secador de charolas rotatorias con corriente de aire continuo de 1.2 m/s. El contenido de humedad en los primeros 30 min de secado

disminuyó drásticamente, continuando con una pérdida de humedad relativamente más lenta hasta alcanzar una humedad final del 10 % a las 7 h de secado.

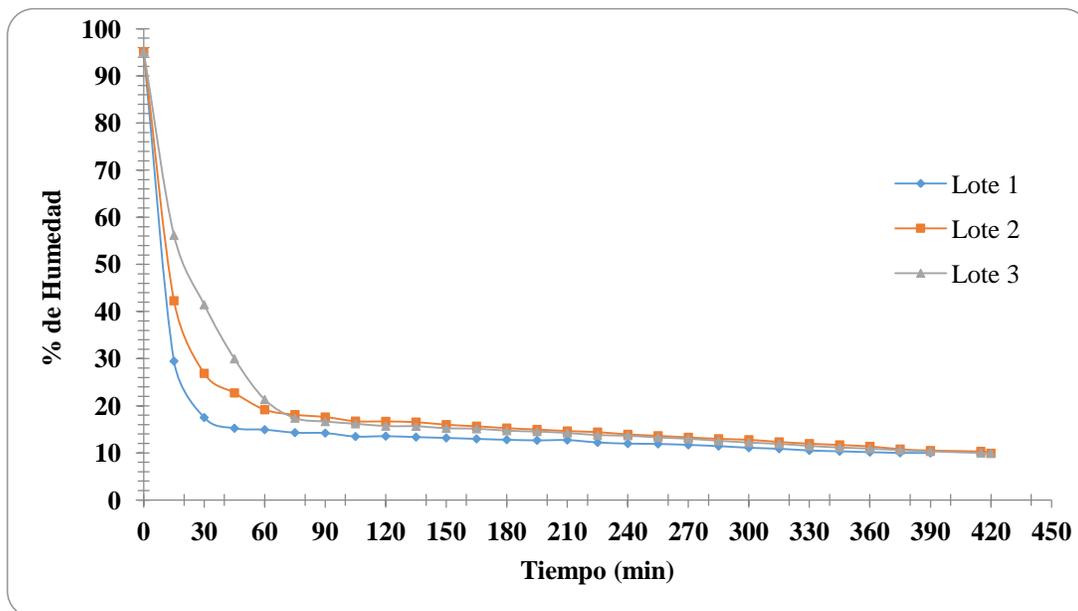


Figura 8. Pérdida de humedad con respecto al tiempo de las hojas de *S. amarissima*

En la figura 9 se muestra la razón de humedad inicial la cual fue de  $19.49 \pm 0.00$  kg agua/kg de sólido seco esta se redujo hasta alcanzar una razón de humedad de  $2.04 \pm 0.00$  kg agua/kg de sólido seco.

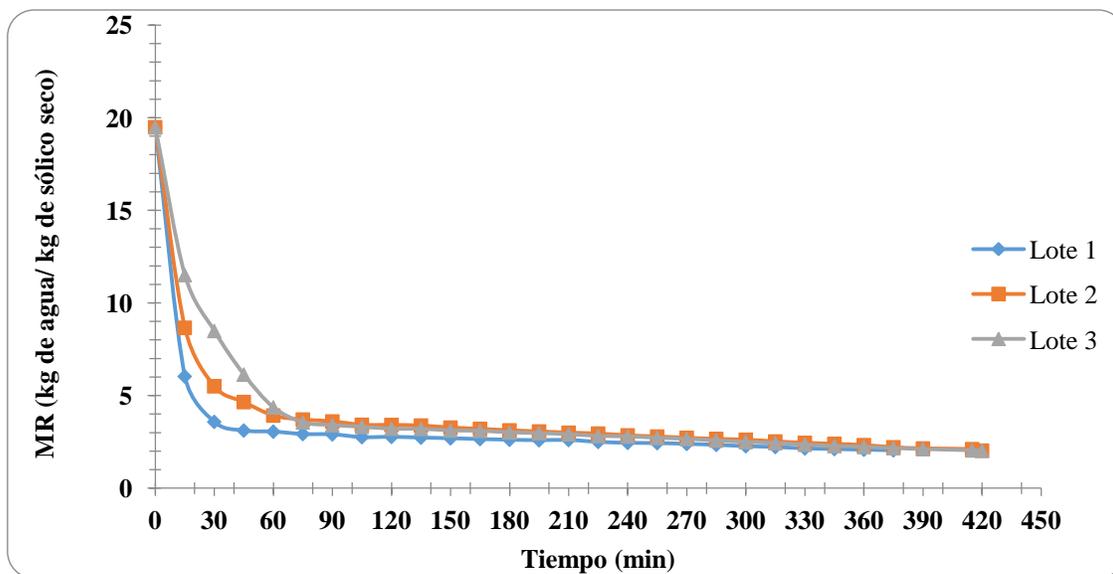


Figura 9. Razón de humedad en función del tiempo de secado de las hojas de *S. amarissima*

### 5.3 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó tanto en la muestra fresca como en la deshidratada en polvo, de las hojas de *S. amarissima*. Los resultados obtenidos para ambas muestras presentaron un contenido alto de compuestos fenólicos. Estos resultados se calcularon a partir de una curva de calibración de ácido gálico (Apéndice 6) con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.997, que condujo después de una regresión lineal a una ecuación de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración de los estándares. La concentración de fenoles totales en las muestras expresadas como mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de muestra seca, se calculó a partir de la ecuación de calibración. Los resultados obtenidos para el extracto de muestra fresca, preparado de acuerdo a la Sección 4.5 y llevados a una dilución 1:5, presentaron un contenido de  $4648.9 \pm 47.2$  mg EAG/100 g de masa seca (ms). El extracto en polvo de *S. amarissima*, Sección 4.5, diluida a una relación extracto:disolvente de 1:25 presentó un contenido de  $3010.35 \pm 0$  mg EAG/100 g de ms.

Cabe señalar que Santos (2019) reportó para el mismo espécimen un contenido de fenoles totales en la muestra fresca de  $2791.7 \pm 46.7$  mg EAG/100 g de ms y en la muestra deshidratada  $1450.9 \pm 50.4$  mg EAG/100 g de ms, que representa un 60% menos que el encontrado en el presente trabajo. Esto puede estar relacionado con la presencia o ausencia de determinados nutrientes en el suelo, el exceso o déficit de riego. El contenido de sustancias nitrogenadas del suelo tiene un efecto decisivo sobre el contenido de compuestos fenólicos antioxidantes. El grado de iluminación e irradiación de las plantas, la temperatura de cultivo, la temporada de recolección y el estado de florecencia (Tomás-Barberán, 2003).

Además, los compuestos bioactivos cumplen la función de protección en las plantas y en consecuencia son susceptibles a cambios en el contenido de sustancias fitoquímicas.

Ricco (2015) reportó el efecto de la edad de las hojas *Aloysia citrodora* y el efecto de la presencia de plagas sobre la concentración de fenoles totales en el espécimen de *Tripodanthus acutifolius*. Plantas de este último espécimen se infestaron con insectos *Dactylopius coccus*, que se alimentan regularmente del jugo de las hojas. Al comparar el contenido de fenoles totales en las plantas de *T. acutifolius* infestados, se observaron diferencias en su contenido respecto a plantas sanas. Las hojas infestadas mostraron un contenido de fenoles totales de  $9687.0 \pm 349.0$  mg de ácido tánico/100 g ms. Las hojas sanas presentaron un total de  $6780.0 \pm$

300.0 mg de ácido tánico/100 g ms. En las hojas infestadas los fenoles se incrementan aproximadamente un 40 % respecto de las sanas.

En el estudio de *Aloysia citrodora* han demostrado una clara diferencia en la concentración de fenoles totales en relación al grado de desarrollo foliar. Hay mayor acumulación de fenoles totales en las hojas jóvenes. Se ha observado que la concentración de los fenoles totales en las hojas jóvenes es de  $5002.0 \pm 384.0$  mg de ácido tánico/100 g masa seca (ms). Aproximadamente un 90 % mayor respecto al contenido de fenoles totales en las hojas adultas,  $2643.0 \pm 249.0$  mg de ácido tánico/100 g ms. Los niveles de fenoles decrecen rápidamente con la edad de la hoja.

En la Tabla 6 se realiza la comparación con otras especies de *salvia*. A partir de los resultados y la comparación con otras especies se comprueba que *S. amarissima* en fresco y deshidratada se encuentra dentro de las cuatro especies con mayor contenido de fenoles totales, las cuales pueden ser aprovechadas para tratamientos de la diabetes tipo 2.

Tabla 6

*Contenido de Fenoles Totales en especies del género Salvia.*

Especie	Estado del material vegetal	Parte de la planta	Contenido de Fenoles Totales (mg EAG/ 100 g de ms)	Fuente
<i>S. amarissima</i>	fresco	hoja	$4648.9 \pm 47.2$	Presente estudio
<i>S. amarissima</i>	deshidratado	hoja	$3010.35 \pm 0$	Presente estudio
<i>S. amarissima</i>	fresco	hoja	$2791.7 \pm 46.7$	Santos (2019)
<i>S. amarissima</i>	deshidratado	hoja	$1450.9 \pm 50.4$	Santos (2019)
<i>S. officinalis</i>	deshidratado	hoja <sup>a</sup>	$6180.0 \pm 500.0$	Jebri et al., (2019)
<i>S. sclarea</i>	deshidratado	tejido	$770.0 \pm 10.0$	El-Gohary et al., (2020)
<i>S. splendens</i>	deshidratado	hoja <sup>b</sup>	$1244.0 \pm 32.0$	Purizaca-Mejía, (2019)
<i>S. splendens</i>	deshidratado	hoja <sup>c</sup>	$1943.0 \pm 42.0$	Purizaca-Mejía, (2019)
<i>S. tomentosa</i>	deshidratado	hojas <sup>d</sup>	$5671.0 \pm 272.0$	Dinçer et al., (2013)
<i>S. sclarea</i>	deshidratado	hojas <sup>e</sup>	$9610.0 \pm 260.0$	Jasicka-Misiak et al., (2018)
<i>S. officinalis</i>	deshidratado	hojas <sup>f</sup>	$6380.0 \pm 290$	Jasicka-Misiak et al., (2018)

<sup>a</sup> Hoja deshidratada a  $52.9 \pm 0.9^\circ\text{C}$  y una velocidad de aire de 1.0 m/s. <sup>b</sup> Hoja deshidratada a  $45^\circ\text{C}$  durante 5 h, y extracción de compuestos con MeOH acuoso al 80% y ácido fórmico al 0.1%. Los valores están presentados en mg equivalente de catequina/ 100 g de ms. <sup>c</sup> Hoja deshidratada a  $45^\circ\text{C}$  durante 5 h, y extracción de compuestos con agua tipo 2 a punto de ebullición. <sup>d</sup> Hoja secada por convección natural, con un periodo de almacenamiento de 2 meses a temperatura ambiente. <sup>e</sup> Nueva variedad cultivada en Polonia (Aj todor), La extracción de compuestos se realizó con MeOH acuoso. <sup>f</sup> La extracción de los compuestos se realizó con MeOH acuoso. Los datos se expresan como la media de las muestras por triplicado  $\pm$  desviación estándar

#### 5.4 Cuantificación de flavonoides totales

En la cuantificación de flavonoides totales se realizaron curvas de calibración utilizando como estándar la rutina. La curva de calibración se construyó con estándares a concentraciones en el intervalo de 50 a 250  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de la curva de calibración se generó una ecuación de calibración, con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.9947. El contenido de flavonoides totales en la muestra fresca fue de  $10551.9126 \pm 189.29517$  mg ER/100 g de ms y para la muestra deshidratada fue de  $11412.122 \pm 144.39$  mg ER/100 g de ms. Estos resultados mostraron que las hojas de *S. amarissima* tienen un contenido alto de flavonoides totales en comparación con lo reportado por Santos (2019) quien reportó para la muestra fresca un contenido de flavonoides totales de  $2791 \pm 46.7$  mg ER/100 g de ms y en la muestra deshidratada mostro un total de  $1450.9 \pm 50.4$  mg ER/100 g de ms. Cabe mencionar que en el presente trabajo se observa que la muestra fresca presenta un menor contenido de flavonoides totales en comparación con la muestra seca. Esto puede atribuirse a un mal almacenado de la muestra lo cual ocasionó una degradación en la muestra. En la Tabla 7 se muestran los resultados de otros estudios en diferente espécimen cabe mencionar que la diferencia que existe entre cada resultado puede deberse a que para la cuantificación de flavonoides se utilizan diferentes reactivos como catequina, rutina y quercentina.

Tabla 7.

#### Contenido de Flavonoides Totales en especies del género *Salvia*

Especie	Estado del material vegetal	parte de la planta	Flavoniodes Totales (mg ER/ 100 g de ms)	Fuente
<i>S. amarissima</i>	fresco	hoja	$10551.9 \pm 189.29$	Presente estudio
<i>S. amarissima</i>	deshidratado	hoja	$11412.1 \pm 144.39$	Presente estudio
<i>S. amarissima</i>	fresco	hoja	$9272.7 \pm 160.0$	Santos (2019)
<i>S. amarissima</i>	deshidratado	hoja	$5074.4 \pm 201.1$	Santos (2019)
<i>S. officinalis</i>	deshidratado	Hoja <sup>d</sup>	$5300.0 \pm 90.0^a$	Jebri et al., (2019)
<i>S. sclarea</i>	deshidratado	tejido	$770.0 \pm 10.0$	(El-Gohary et al., 2020)
<i>S. tomentosa</i>	deshidratado	Hojas <sup>e</sup>	$3962.0 \pm 164.0^b$	Dinçer et al., (2013)
<i>S. blepharochlaena</i>	deshidratado	Hojas <sup>f</sup>	$9790 \pm 240.0^c$	Zengin et al., (2018)
<i>S. Amasiaca</i>	deshidratado	Hojas <sup>f</sup>	$9650.0 \pm 310.0^c$	Zengin et al., (2018)

<sup>a</sup> La concentración está expresada en mg equivalentes de quercentina/100 g de ms. <sup>b</sup> La concentración está expresada en mg equivalentes de catequina/100 g de ms. <sup>c</sup> La concentración está expresada en mg equivalentes de rutina/100 g de extracto. <sup>d</sup> Hoja deshidratada a  $52.9 \pm 0.9^\circ\text{C}$  y una velocidad de aire de 1.0 m/s. <sup>e</sup> Hoja secada por convección natural, con un período de almacenamiento de 2 meses a temperatura ambiente. <sup>f</sup> Hoja deshidratada a temperatura ambiente. Los datos se expresan como la media de las muestras por triplicado  $\pm$  desviación estándar.

Los resultados del contenido de flavonoides confirman que *S. amarissima* es una fuente rica de flavonoides tanto en la muestra fresca y seca además de presentar valores altos en comparación con los que se han reportado en otras literaturas para otros especímenes de *Salvia*.

### **5.5 Determinación del porcentaje de $\alpha$ -amilosa en la fécula de papa a partir del valor azul.**

El almidón estructuralmente, consiste de dos polisacáridos químicamente distinguibles, la  $\alpha$ -amilosa y la amilopectina. Ambos polímeros influyen de manera determinante en la susceptibilidad a la hidrólisis ácida y enzimática. Se ha determinado que a pesar de que los almidones procedan de la misma fuente botánica, los que presentan mayor contenido de  $\alpha$ -amilosa muestran mayor resistencia a la hidrólisis enzimática y ácida. El resultado del porcentaje de  $\alpha$ -amilosa se calculó a partir de la ecuación de calibración generada con los datos reportados para nueve datos del valor azul vs contenido de  $\alpha$ -amilosa de harinas de arroz.

$$\% \text{ de } \alpha\text{-amilosa} = 56.203 (\text{absorbancia}) + 5.0051$$

A continuación, en la Tabla 8 se presenta los resultados obtenidos en la cuantificación de  $\alpha$ -amilosa.

Generalmente el contenido de  $\alpha$ -amilosa en la papa es de 22%. (Lamadrid Avendaño, 2009) En el presente trabajo el % de  $\alpha$ -amilosa fue de  $25.61 \pm 63.51$ . Los valores obtenidos en esta investigación superan los reportados por Lamadrid et al., (2009) y Medina et al., (2008), quienes reportan un porcentaje de 15-20% de  $\alpha$ -amilosa en la fécula de papa. Solarte *et al.*, (2019) reportó para la variedad latina un porcentaje de  $\alpha$ -amilosa de  $25.97 \pm 0.24$ . Estas diferencias encontradas en el contenido de  $\alpha$ -amilosa se debe a la variabilidad que existe entre una variedad y otra, así como las condiciones climáticas y tipo de suelo durante su crecimiento (Singh & Singh, 2003). Así mismo está relacionado con el tamaño y la forma del granulo (Lindeboom et al., 2004).

Posteriormente se realizó la separación de  $\alpha$ -amilosa y amilopectina, y se calculó el rendimiento de obtención. De amilopectina se obtuvo 1.4941 g que corresponde a un 75 % y

0.3118 g de  $\alpha$ -amilosa que corresponde a un 16 %. El porcentaje de recuperación de  $\alpha$ -amilosa fue de 62.75%.

Tabla 8

*Porcentaje de  $\alpha$ -amilosa en papa*

muestra	% de $\alpha$ -amilosa	fuelle
Fécula de papa	25.61±63.51	Presente estudio
Papa rosa 1	15.0±0.3 <sup>a</sup>	Lamadrid <i>et al.</i> , (2009)
Papa rosa 2	17.5±1.7 <sup>a</sup>	Lamadrid <i>et al.</i> , (2009)
Papa blanca 1	18.0±1 <sup>a</sup>	Lamadrid <i>et al.</i> , (2009)
Papa blanca 2	16.8±1.1 <sup>a</sup>	Lamadrid <i>et al.</i> , (2009)
Papa jardinera	26.27 ±0.24 <sup>b</sup>	Solarte-montúfar <i>et al.</i> , (2019)
Papa latina	25.97±0.24 <sup>b</sup>	Solarte-montúfar <i>et al.</i> , (2019)
Papa Colombia	24.82±0.11 <sup>b</sup>	Solarte-montúfar <i>et al.</i> , (2019)
papa	21.0±0.0	Hernández-Medina <i>et al.</i> , (2008)

<sup>a</sup> El contenido de  $\alpha$ -amilosa se determinó empleando un kit enzimático *Megazyme*. <sup>b</sup> El contenido de  $\alpha$  amilosa se determinó de acuerdo con la metodología ISO 6647-2 (2011), utilizando el método de colorimetría de yodo estandarizado. Se leyó la absorbancia a 620 nm. Los datos se expresan como la media de las muestras por triplicado ± desviación estándar.

### 5.6 Solubilidad de la $\alpha$ -amilosa

La  $\alpha$ -amilosa que se obtuvo después del tratamiento del almidón formó una película resistente a la solubilidad. La  $\alpha$ -amilosa es poco soluble debido a que posee enlaces de hidrógeno, formando una estructura compleja, que presenta una gran estabilidad a las múltiples interacciones que existen con sus dos polisacáridos constituyentes, su solubilidad depende de la cantidad disponible de estos polímeros en el medio (J. Singh *et al.*, 2007).

Solarte *et al.*, (2019) reportó para tres variedades de papa el índice de solubilidad en agua (ISA). Para la variedad de jardinera, latina y Colombia. Los valores más altos de ISA los obtuvieron a temperaturas de 70, 80, 90°C con solubilidades entre 1.6 a 3.92 g solubles/g de muestra. Resaltando de esta manera que hay una solubilidad baja de la  $\alpha$ -amilosa en agua. En el presente trabajo, la  $\alpha$ -amilosa se calentó a 80°C por 1 h para lograr una mayor solubilidad.

### 5.7 Reacción enzimática de la $\alpha$ -amilosa y $\alpha$ -amilasa

La reacción de la  $\alpha$ -amilosa y la  $\alpha$ -amilasa tuvo como finalidad identificar las concentraciones adecuadas de sustrato y enzima a emplear en la prueba de inhibición enzimática. La

concentración de disolución de  $\alpha$ -amilosa fue de 500  $\mu\text{g/mL}$  y para la disolución de  $\alpha$ -amilasa de 400  $\mu\text{g/mL}$

Los resultados obtenidos durante las reacciones enzimáticas para la  $\alpha$ -amilosa de papa y para la  $\alpha$ -amilasa a diferentes concentraciones se calcularon a partir de una curva de calibración con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.9943 para la  $\alpha$ -amilosa de papa la cual se ajustó a una regresión lineal, Figura 10.

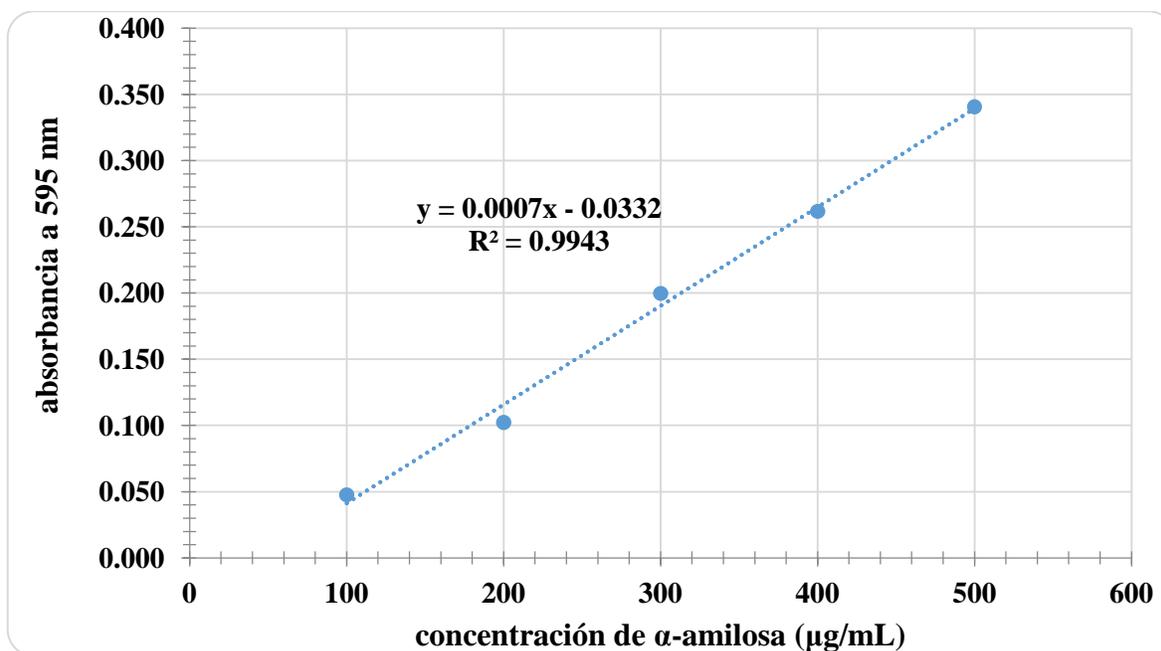


Figura 10. curva de calibración de  $\alpha$ -amilosa.

Para la  $\alpha$ -amilasa con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.9475 que se ajustó a una curva polinómica de segundo orden. La cual permitió relacionar la absorbancia con la concentración de los estándares, Figura 11.

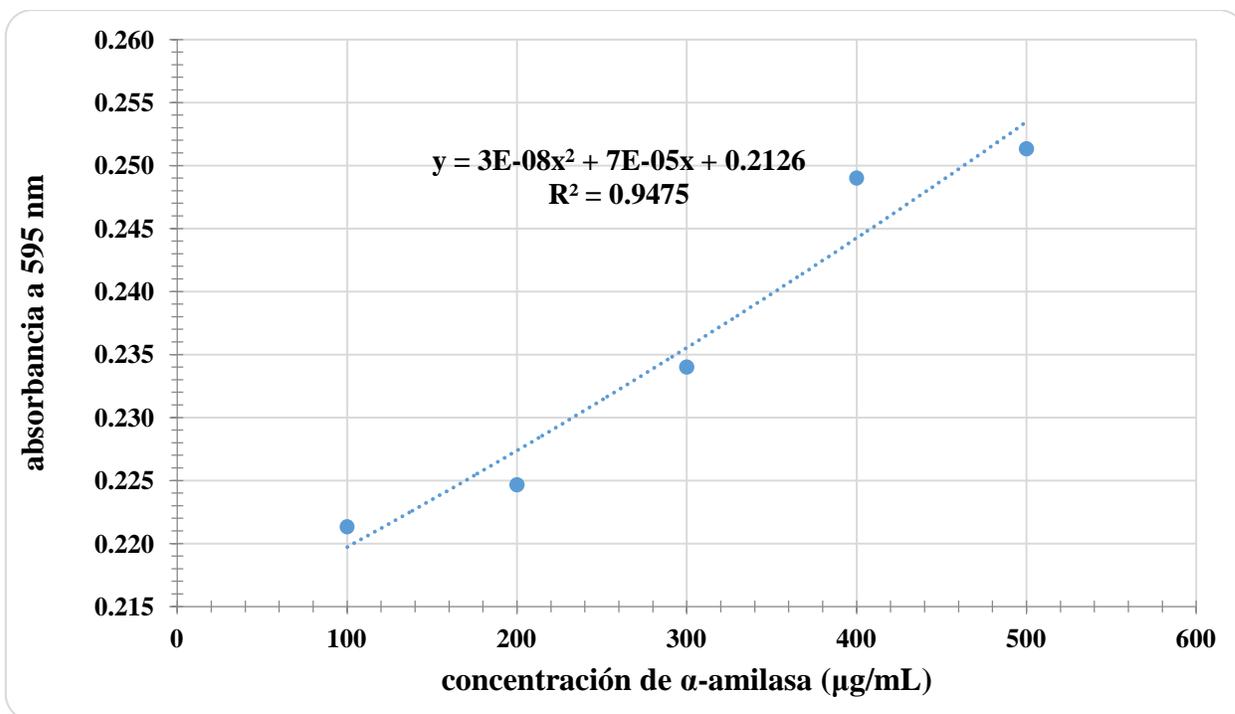


Figura 11. curva de calibración de α-amilasa.

## 5.8 Inhibición de α-amilasa

La α-amilasa es una enzima digestiva clave involucrada en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, que los convierten en objetivos importantes para el control terapéutico de diabetes y obesidad. La α-amilasa y la α-glucosidasa catalizan la hidrólisis de carbohidratos en azúcares simples, por lo que su inhibición retarda la digestión del almidón y los oligosacáridos que contribuyen a la reducción del aumento posprandial de los niveles de glucosa plasmática, (Kocak et al., 2016).

Generalmente, la actividad antidiabética *in vitro* para la enzima α-amilasa es expresada como porcentaje de inhibición. El método para llevar a cabo estas pruebas de inhibición de la enzima α-amilasa no están bien establecidas debido a que existen ciertas diferencias durante el procedimiento, tal como el tipo de disolución amortiguadora, el pH de la disolución amortiguadora, las cantidades y tipos de reactivos, el origen de la enzima, los tiempos entre cada reacción, el orden de los reactivos, la temperatura y la longitud de onda utilizada para la determinación de la absorbancia.

Para este estudio se llevaron a cabo diversos experimentos para encontrar las condiciones (concentración de enzima, sustrato e inhibidor) de reacción. Adicionalmente, la acarbosa pura se utilizó como control positivo.

El porcentaje máximo de inhibición experimental de  $\alpha$ -amilasa fue de 43% para el extracto fresco y para el extracto seco del 30 %. El porcentaje de inhibición con respecto a la concentración del extracto fue no lineal. Por lo que los valores de la absorbancia se ajustaron a una regresión logarítmica para la muestra seca y para la muestra fresca se ajustó a una regresión exponencial. Con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.9845 para la muestra fresca y para la deshidratada  $R^2$  de 0.9881.

Santos (2019) reportó para el mismo espécimen en estado deshidratado un porcentaje de inhibición del 98.6%. Comparado con los resultados obtenidos en el presente estudio es un porcentaje de inhibición alto. Cabe resaltar que con el método empleado en el presente estudio no se midió azúcar si no el consumo de  $\alpha$ -amilosa después de la reacción enzimática y con ello la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en la mezcla de reacción. En comparación con el estudio realizado por Santos donde midió el consumo de azúcar en la mezcla de reacción.

En la Figura 12 se observa la tendencia de las absorbancias a diferentes concentraciones de los extractos de *S.amarissima* en fresco y seco del presente estudio. Como se puede observar la hoja en fresco mostro mayor porcentaje de inhibición que en la hoja deshidratada en polvo.

El comportamiento experimental que presentan los extractos, así como el control positivo (acarbosa) al incrementar la concentración provoca una disminución en la inhibición. Provocando que no sea posible predecir si al aumentar la concentración exista un mayor porcentaje de inhibición.

Como se puede observar en la Figura 13, la acarbosa tuvo un máximo porcentaje de inhibición de 9 % y los valores de absorbancia se ajustaron a una regresión polinómica de segundo orden, con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.9622

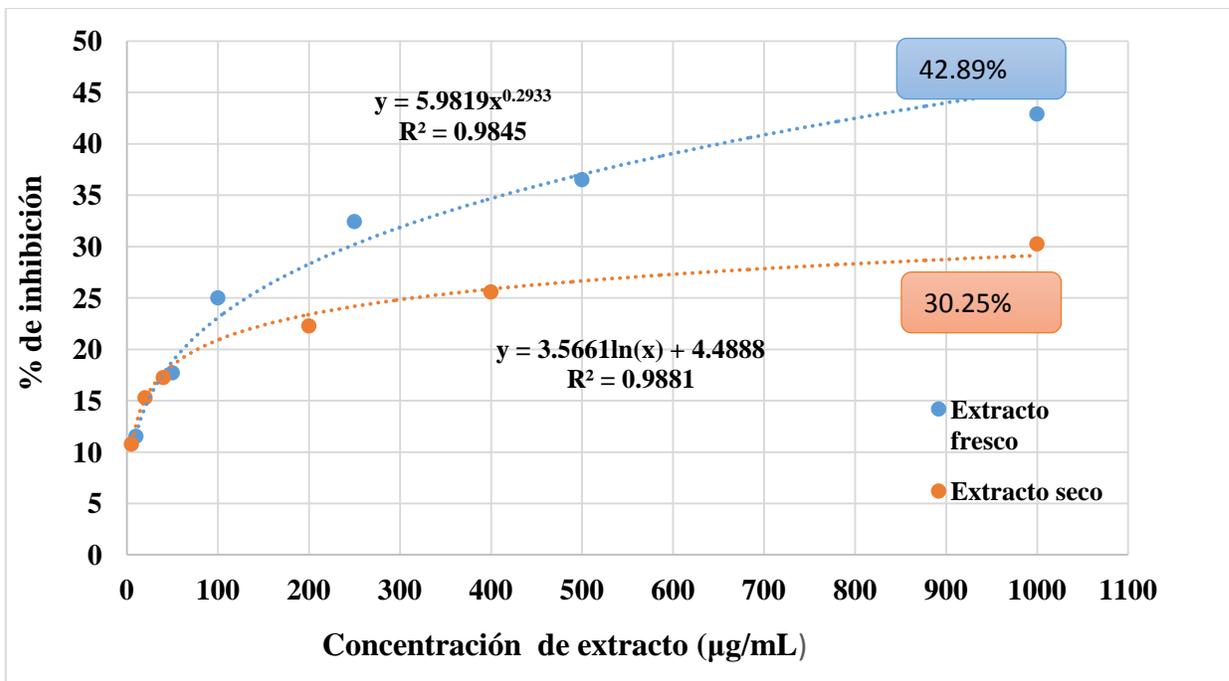


Figura 12. Porcentaje de inhibición de los extractos de *S. amarissima* de extractos frescos y secos

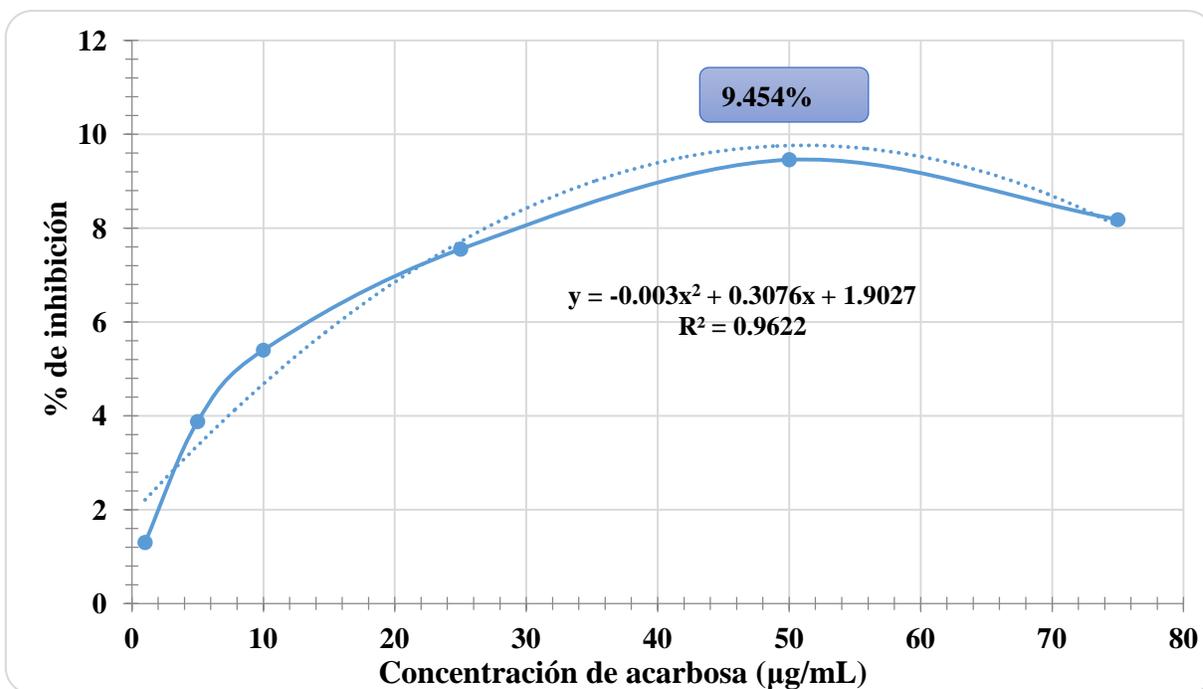


Figura 13. Porcentaje de inhibición de acarbosa

Cabe señalar que se ha reportado para la acarbosa a concentraciones de  $1.9 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$  de muestra, un porcentaje de inhibición del 50% de la actividad de  $\alpha$ -amilasa pancreática (Mendoza et al., 2015).

Los resultados obtenidos tanto para los extractos de *S. amarissima* y el control positivo (acarbosa) no fueron comparados con otros reportes, ya que esta técnica empleada en para medir la actividad antidiabética es un nuevo método que mide el consumo de  $\alpha$ -amilosa después de la reacción enzimática y con ello la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en la mezcla de reacción. Es por ello que la capacidad de inhibir la  $\alpha$ -amilasa depende de diversos factores y del método de inhibición *in vitro* empleado.

## 5.9 Análisis estadístico

Los resultados de la prueba F para varianzas de dos muestras de fenoles totales mostraron varianzas desiguales ( $p = 0.0037$ ). Por lo que se aplicó la Prueba t para dos muestras, suponiendo varianzas desiguales y el resultado mostró que existe diferencia significativa estadísticamente en el contenido de fenoles totales de las muestras frescas y secas ( $p = 0.0002$ ).

Mientras que para flavonoides totales se determinó que los valores tienen varianzas iguales ( $p = 0.367$ ). Por lo que se aplicó la Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales. El resultado de la prueba mostró la existencia de una diferencia significativa estadísticamente entre el contenido de flavonoides totales de los extractos secos como frescos ( $p = 0.003$ ).

El contenido de compuestos fenólicos se encuentra presente en mayor cantidad en los extractos frescos.

De acuerdo con el análisis comparativo de pares de medias de t de Student para medias de dos muestras emparejadas. Los resultados de la prueba mostraron una diferencia significativa entre la muestra fresca a partir de una concentración de  $5 \mu\text{g/mL}$  a  $40 \mu\text{g/mL}$  a las mismas concentraciones de la muestra seca, empleando los valores predichos por los modelos de regresión correspondientes.

Mientras que a concentraciones de la muestra fresca mostraron una diferencia significativa a partir de  $10$  a  $250 \mu\text{g/mL}$ . Por lo anterior se rechaza la hipótesis nula, la cual afirma que las dos muestras son iguales a las mismas concentraciones a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.005$ .

Consecuentemente, el porcentaje de inhibición enzimática de la  $\alpha$ -amilasa es mayor en presencia de los extractos frescos debido a que contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos.

## 6. CONCLUSIONES

La hoja de *Salvia amarissima* en estado fresco y seco, tiene una cantidad alta de fenoles totales, así como también de flavonoides en comparación con lo reportado por Santos (2019) para el mismo espécimen.

Los extractos deshidratados mostraron la menor cantidad de compuestos fenólicos debido al proceso de secado. Mientras que el contenido de flavonoides, la muestra seca mostró tener un contenido mayor que la muestra fresca, esto posiblemente se debió a que la muestra fresca, durante su almacenamiento previo a su análisis, se degradó parcialmente.

La extracción de los compuestos bioactivos asistida por ultrasonido, así como el tiempo de extracción fue fundamental para obtener extractos ricos en compuestos. La evaluación antidiabética a través de la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa fue mayor en presencia de los extractos frescos que en los secos. Ambos extractos de *S. amarissima* presentaron un mayor porcentaje de inhibición que la acarbosa, empleada como control positivo.

El análisis comparativo de pares de media t de Student permitió evaluar la diferencia significativa en las medias de los resultados.

## 7. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar una investigación más sobre la caracterización de compuestos fenólicos que se encuentran en el espécimen de *Salvia amarissima*.
- ❖ Evaluar otro método de inhibición de  $\alpha$ -amilasa, como la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa por difusión de la glucosa.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Pérez, D., & Bureo-Dacal, J. (2010). Protocolos diabetes mellitus tipo 2. In *Elsevier Doyma*. <http://biblioteca.fesemi.org/handle/11119/28>
- Acosta Vargas, J. S., Rincón Silva, J. D., & Rincon-Silva, N. G. (2019). Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus. *Biociencias*, *14*(2). <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.6936>
- Agudelo-Botero, M., & Dávila-Cervantes, C. A. (2015). Carga de la mortalidad por diabetes mellitus en América Latina 2000-2011: los casos de Argentina, Chile, Colombia y México. *Gaceta Sanitaria*, *29*(3), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2015.01.015>
- Aguilar-Salinas, C. (2013). Comentarios a la ENSANUT 2012. *Salud Pública de México*, *55*, 347–350.
- Al, C. P., Salgado, C., Acarbosa, A. L., & Interna, M. (2001). *Acarbosa y diabetes mellitus . Implicaciones prácticas*. *18*, 231–233.
- Altagracia-Martínez, M., Kravzov-Jinich, J., Moreno-Santamaría, M. D. R., Rubio-Poo, C., Skromne-Kadlubik, D., Rivas-Cornejo, M. S., & Vázquez-Moreno, E. (2007). Diabetes mellitus tipo 2: Ventas de los hipoglucemiantes orales y costos de los tratamientos farmacológicos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *38*(1), 23–33.
- Altamirano, L. M., & Cruz, D. L. (2009). Panorama general y factores asociados a la diabetes. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, *52*(5), 219–223.
- Badui, S. (2006). Salvador Badui Dergal. In *Química de los alimentos*.
- Bello-Chavolla, O. Y., Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C. A., & Hernández-Avila, M. (2017). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutrition Reviews*, *75*, 4–12. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw030>
- Beyra, Á., León, M. del C., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimarais, M., & Álvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, *61*(2), 185–204. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i2.44>
- Bray, G. A. (2017). Obesity and the risk for type 2 diabetes. *Nutrition in the Prevention and*

- Treatment of Disease*, 677–689. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802928-2.00030-8>
- Cai, L., & Shi, Y. C. (2013). Self-assembly of short linear chains to A- and B-type starch spherulites and their enzymatic digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10787–10797. <https://doi.org/10.1021/jf402570e>
- Carlson, B. M. (2019). The Digestive System. The human body. In *The human body*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804254-0.00012-0>
- Castro Juarez, C. J., Villa Ruano, N., Ramirez Garcia, S. A., & Mosso Gonzalez, C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabeticas en el legado etnobotanico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 101–120.
- Code, C. F. (1953). The digestive system. In *Annual review of physiology* (Vol. 15). <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.15.030153.000543>
- Cornejo-Tenorio, G., & Ibarra-Manríquez, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), 1279–1296. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.668>
- Dinçer, C., Tontul, I., Çam, I. B., Özdemir, K. S., Topuz, A., Nadeem, H. Ş., Tuğrul Ay, S., & Göktürk, R. S. (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller: Effects of cultivation, harvesting year, and storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(5), 561–567. <https://doi.org/10.3906/tar-1211-72>
- El-Gohary, A. E., Amer, H. M., Salama, A. B., Wahba, H. E., & Khalid, K. A. (2020). Growth and chemical profile of clary sage (*Salvia sclarea* L.) in response to algae and banana peel extracts. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00445-2>
- Floris A. Van de Laar, P. L. L., Akkermans, R. P., Lisdonk, e. H. Van de, Rutten, G. E., & weel, c. van. (2005). Reviews / Commentaries / ADA Statements  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors for Patients Results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 28(1), 154–163.
- García-alcalá, H., Meaney-mendiola, E., Vargas-ayala, G., Pulido, M. E., & Aldrete-velasco, J. (2011). Review article Current review of knowledge about intestinal carbohydrate absorption and its relationship with cardiovascular risk prevention. 27(3), 270–280.
- Girón, C. N., (2013) Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante *in vitro* de extractos polares de *Justicia Spicigera* y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios. Universidad Tecnológica de la Mixteca.

- Habtemariam, S. (2019). Chemical and pharmacological evidences for coffee as a modulator of type 2 diabetes and metabolic syndrome. In *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102922-0.00021-3>Han, H. M., Cho, J. H., Kang, H. W., & Koh, B. K. (2012). Rice varieties in relation to rice bread quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1462–1467. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4727>
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 718–726. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000300031>
- Heydari, M., Hashempur, M. H., Daneshfard, B., & Mosavat, S. H. (2019). Bioactive Foods as Dietary Intervention for Diabetes From the Perspective of Persian Medicine. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*, 49–68. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813822-9.00004-7>
- Inocente Camones, M. A., Jurado Teixeira, B., Ramos Llica, E., Alvarado Chávez, B., Fuertes Ruiton, C., Cárdenas Montoya, L., & Rivera Castillo, B. (2019). Actividad hipoglucemiante in vitro de los polisacáridos digeridos de *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault (cushuro). *Horizonte Médico (Lima)*, 19(1), 26–31. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n1.05>
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. In *Atlas de la Diabetes de la FID*.
- Jaisankar, P. (2018). A Review of A-Glucosidase and A-Amylase Inhibitors for Type 2 Diabetes Isolated From Some Important Indian Medicinal Plants. *Annals of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1(1), 1003.
- Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Petecka, M., Buslovych, O., Shlyapnikov, V. A., & Wieczorek, P. P. (2018). Antioxidant Phenolic Compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 25(1), 133–142. <https://doi.org/10.1515/eces-2018-0009>
- Jebri, M., Desmorieux, H., Maaloul, A., Saadaoui, E., & Romdhane, M. (2019). Drying of *Salvia officinalis* L. by hot air and microwaves: dynamic desorption isotherms, drying kinetics and biochemical quality. *Heat and Mass Transfer/Waerme- Und Stoffuebertragung*, 55(4), 1143–1153. <https://doi.org/10.1007/s00231-018-2498-9>

- Juliano, B. O. (1971). A Simplified Assay for Milled-Rice Amylose. *Cereal Science Today*, 16(October 1971), 334–360.
- Kahleova, H., & Pelikanova, T. (2017). With Type 2 Diabetes. *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*, 369–393. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803968-7.00021-6>
- Kocak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M. C., & Tepe, B. (2016). *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 85, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.015>
- Lamadrid, A. A., Bernal, G. L. A., Morales, M. M. G. (2009). Capacidad de adhesión y fermentación a gránulos de almidón por bacterias ácido lácticas silvestres para evaluar la actividad como prebiótico. *Revista Del Centro de Investigación. Universidad La Salle*. 8, 5-21
- Lemos, P. V. F., Barbosa, L. S., Ramos, I. G., Coelho, R. E., & Druzian, J. I. (2019). Characterization of amylose and amylopectin fractions separated from potato, banana, corn, and cassava starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.086>
- Lideboom, N., Chang, P., & Tyler, R. (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, white os small granule starches. *Starch/ Stärke*, 56(3-4), 89-99.
- Loizzo, M. R., Saab, A. M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., Statti, G. A., de Cindio, B., Houghton, P. J., & Menichini, F. (2008). In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.003>
- Luján, C. G., Estela, B., Hernández, P., Romero, A. M., & Castro Barraza, F. (2009). Uso De Plantas Medicinales Y Suplementos Dietéticos Para El Control Glucémico De La Diabetes Use of Medicinal Plants and Dietary Supplements for Glycemic Control of Diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*, 8, 229–239.
- Mahmoud, A. M., Ahmed, O. M., Ashour, M. B., & Abdel-Moneim, A. (2015). In vivo and in vitro antidiabetic effects of citrus flavonoids; a study on the mechanism of action. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 35(3), 250–263. <https://doi.org/10.1007/s13410-014-0268-x>

- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 30–86. <https://doi.org/10.7550/rmb.30158>
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.096>
- Mediavilla, J. (2015). Complicaciones de la diabetes mellitus Diagnóstico y tratamiento. *Semergen*, 59.
- Medina, C., Paredes, A., Rodríguez, M. E., Moreno, M., Belén-camacho, D., & García, D. (2010). *almidón a partir de cotiledones de mango*. 22(1), 67–74.
- Mendoza Meza, D. L., & Medina Valdés, R. (2015). Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances En Química*, 10(1), 33–40.
- Merr, L., & Perry, L. M. (2019). *The chemical and pharmacological basis of cloves ( Syzygium aromaticum*. 551–578.
- Nickavar, B., & Yousefian, N. (2011). Evaluation of  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of selected antidiabetic medicinal plants. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 6(2), 191–195. <https://doi.org/10.1007/s00003-010-0627-6>
- Pereira, O. R., Catarino, M. D., Afonso, A. F., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). *Salvia elegans*, *salvia greggii* and *salvia officinalis* decoctions: Antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123169>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana De Química*, 31, 68–81. <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216–1228. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368503>
- Purizaca-Mejía, C. (2019). *Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en*

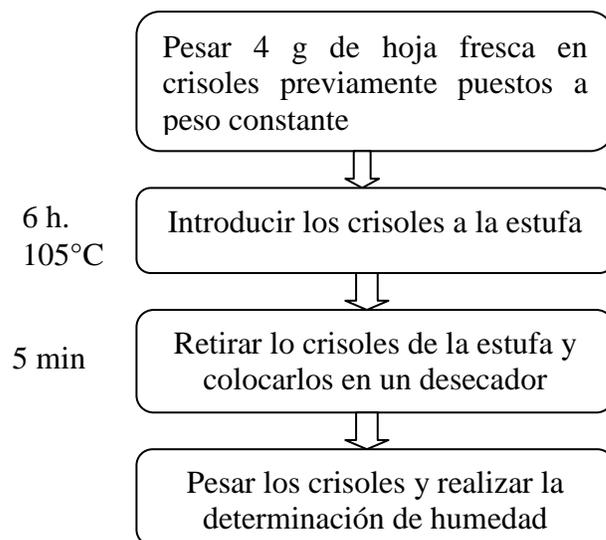
*Salvia splendens* (Salvia Roja).

- Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M., & Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: Recomendaciones para la población mexicana. *Gaceta Médica de México*, 144(5), 369–388. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342008000200011>
- Rojas-martínez, R., Basto-abreu, A., Aguilar-salinas, C. A., & Zárata-rojas, E. (2018). *Rojas R, Basto A, Aguilar C. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. Salud Pública de México. [revista en Internet] 2018; 60(3): 224. Disponible en: https://www.medigraphic.com/cg.60(3).*
- Salinas-Arellano, E., Pérez-Vásquez, A., Rivero-Cruz, I., Torres-Colin, R., González-Andrade, M., Rangel-Grimaldo, M., & Mata, R. (2020). Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of salvia amarissima ortega. *Molecules*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153530>
- Santos, M. D., (2019) Actividad antioxidante y evaluación de la inhibición de  $\alpha$ -amilasa de extractos de hoja de *Salvia amarissima*. Instituto Tecnológico Superior de Acatlan de Osorio.
- Shao, Y., & Lin, A. H. M. (2018). Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry*, 240, 898–903. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.083>
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh Sodhi, N., & Singh Gill, B. (2003) Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources . *Food Chemistry*(81), 219-231.
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.006>
- Singh, P., Mishra, A., Singh, P., Goswami, S., & Singh, A. (2015). Diabetes mellitus and use of medicinal plants for its treatment. *Indian Journal of Resaerch in Pharmacy and Biotechnology*, 3(5), 351–357.
- Singh, S. K., Rai, P. K., Jaiswal, D., & Watal, G. (2008). Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodon dactylon*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 415–420. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem044>

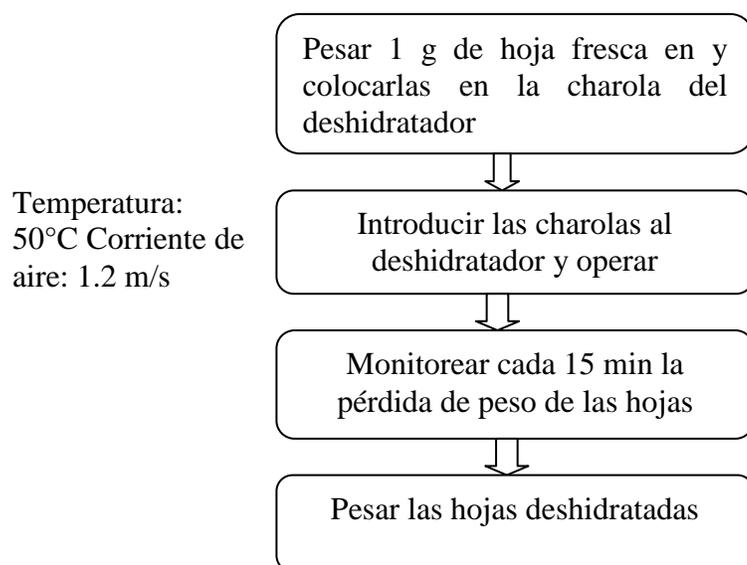
- Solarte-montúfar, J. G., Díaz-murangal, A. E., & Mejía-españa, O. O. D. F. (2019). *No impreso - Propiedades reológicas y funcionales del almidón procedente de tres variedades de papa.pdf*. 30(6), 35–44.
- Tesauro, M., & Mazzotta, F. A. (2019). Pathophysiology of diabetes. *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas: Volume 1*, 37–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814833-4.00003-4>
- Zhang, Y. (2018). Autophagy and diabetes mellitus. *Autophagy and Cardiometabolic Diseases: From Molecular Mechanisms to Translational Medicine*, 83–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805253-2.00007-9>

## 8. APÉNDICES

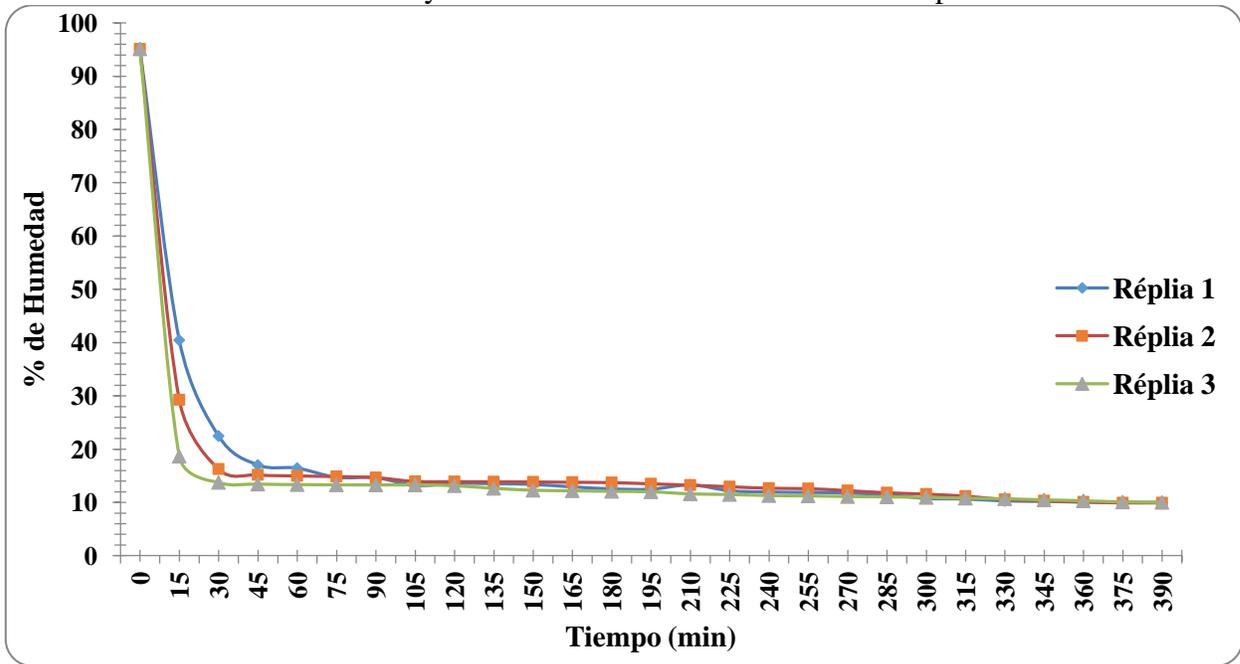
### Apéndice 1. Determinación de humedad



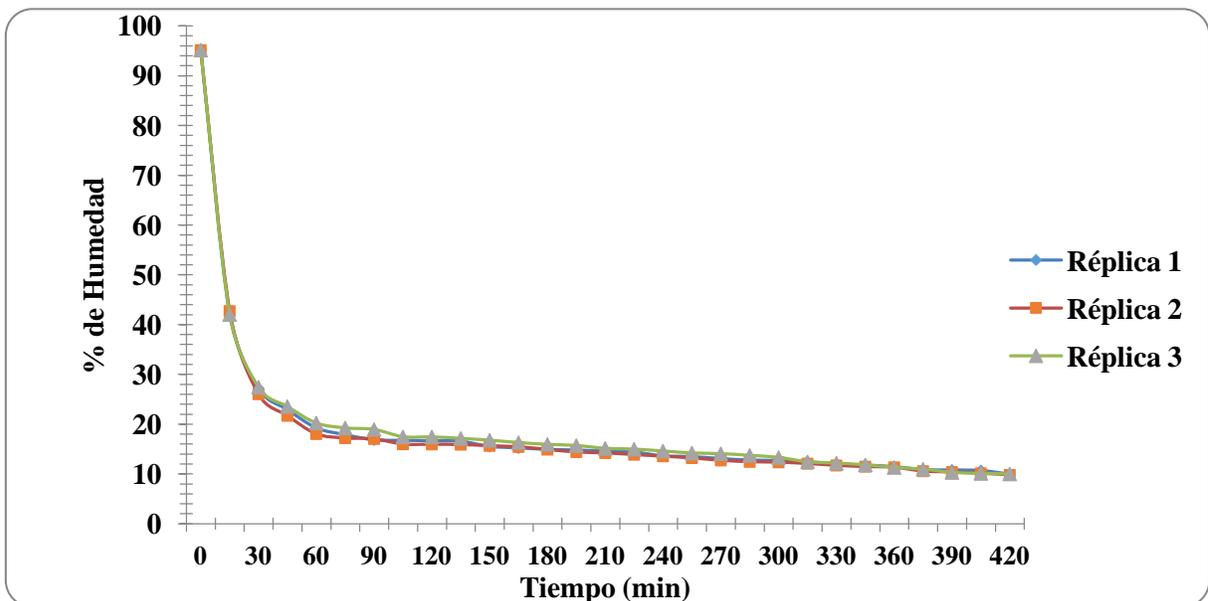
## Apéndice 2. Deshidratación de las hojas de *S. amarissima*



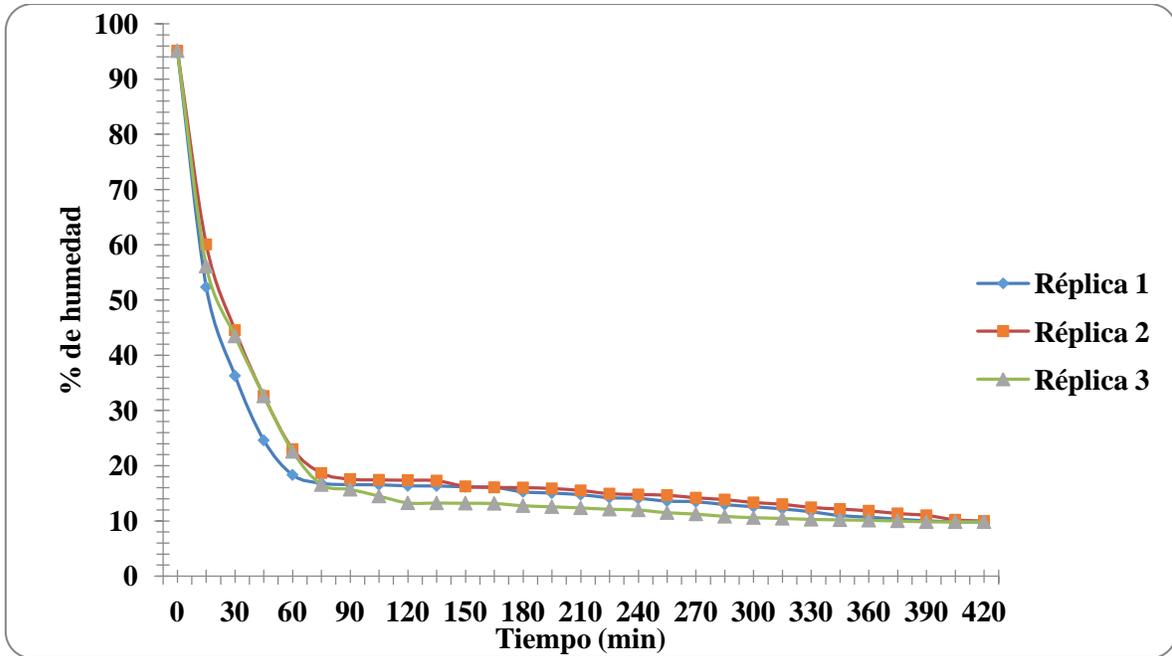
Graficas de Perdida de humedad y razón de humedad en función del tiempo de secado.



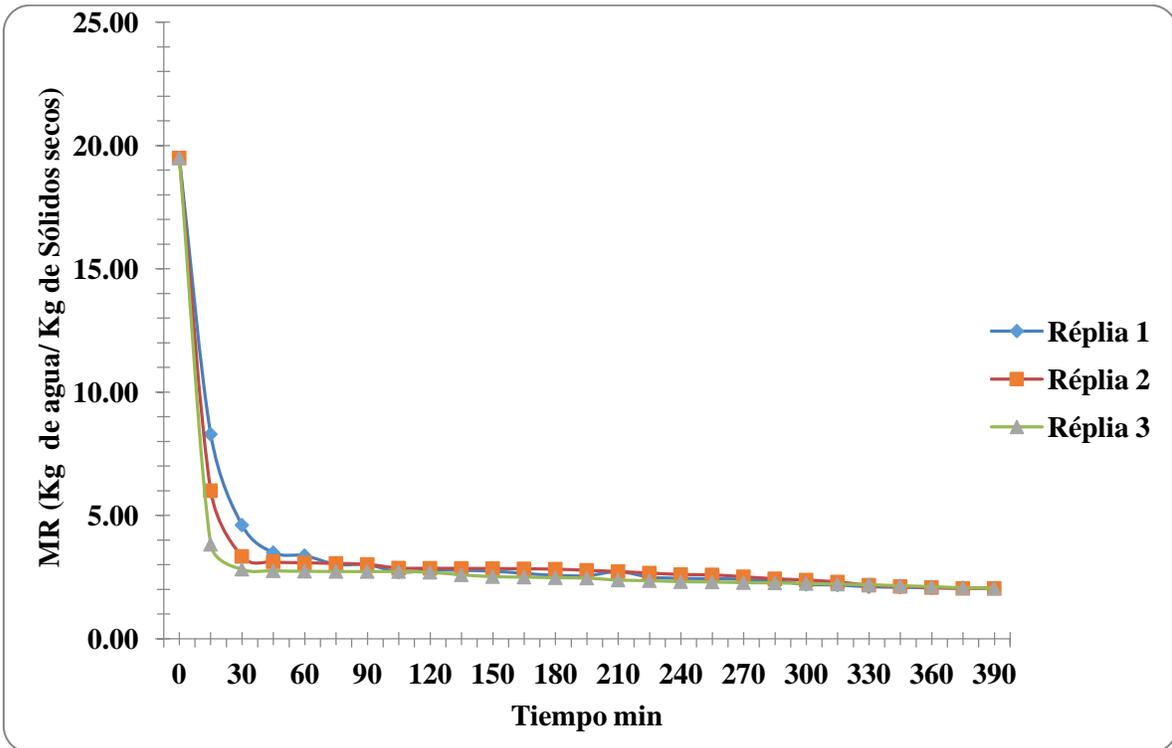
Grafica 1. Perdida de humedad con respecto al tiempo del lote 1 de hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50°C con una corriente de aire continuo de 1.2 m/s.



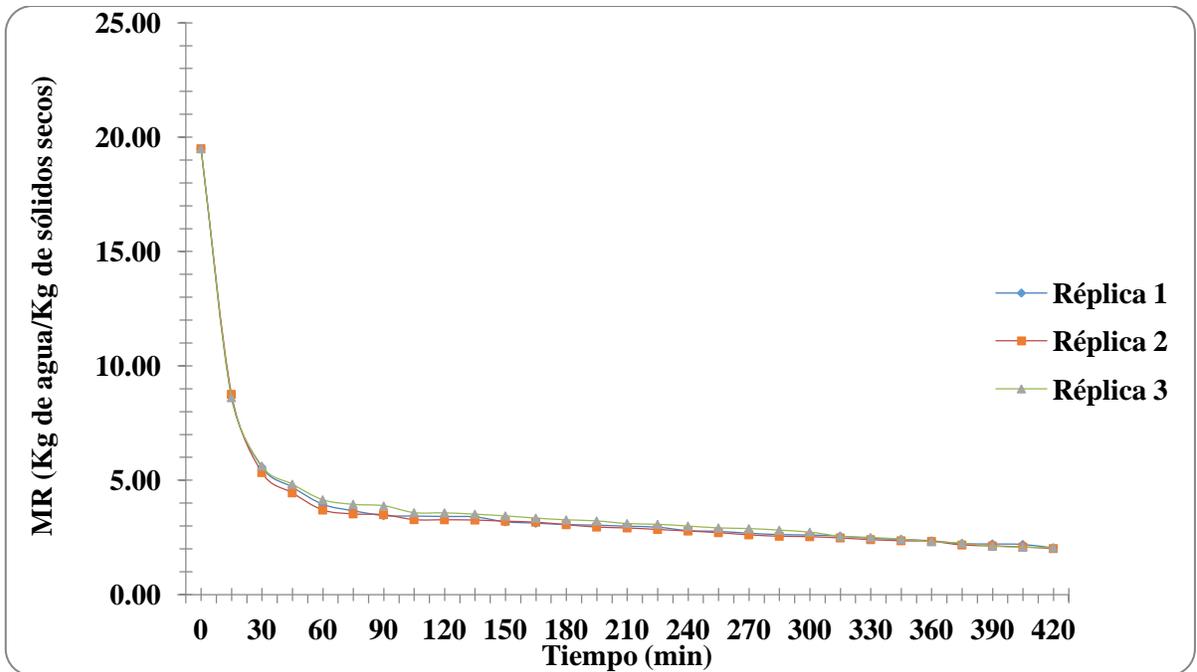
Grafica 2. Perdida de humedad con respecto al tiempo del lote 2 de hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50°C con una corriente de aire continuo de 1.2 m/s.



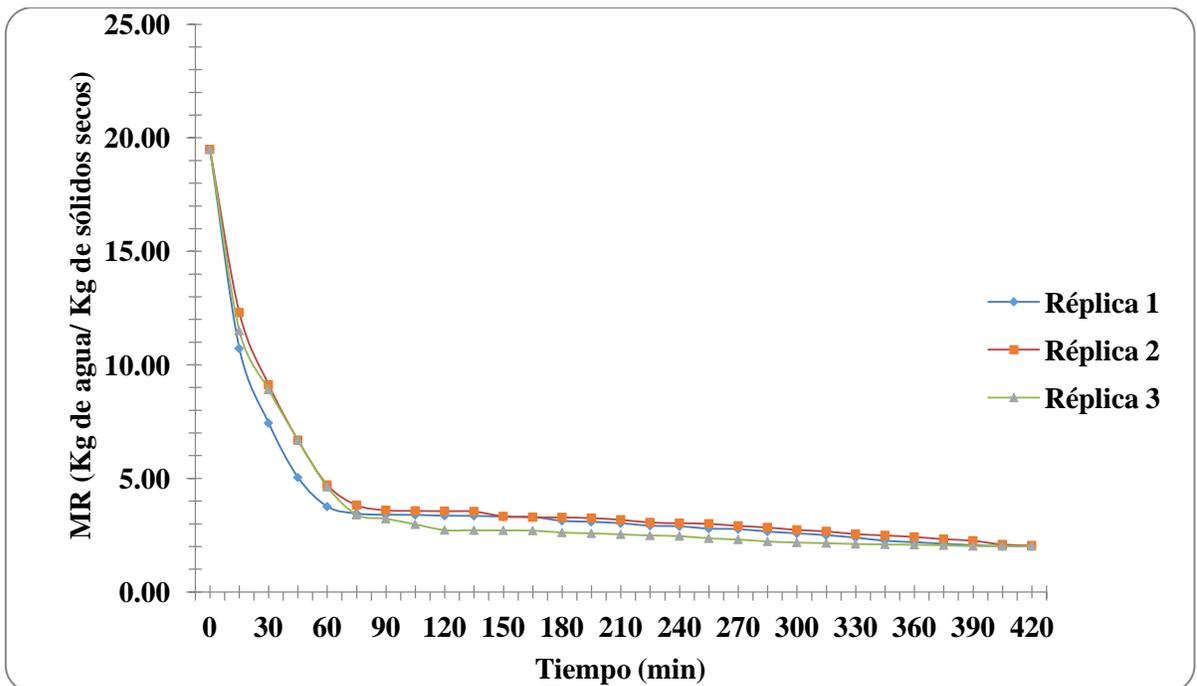
Grafica 3. Perdida de humedad con respecto al tiempo del lote 3 de hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50°C con una corriente de aire continuo de 1.2 m/s.



Grafica 4. Razón de humedad en función del tiempo de secado del lote 1 de hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50°C con una corriente de aire continuo de 1.2 m/s.

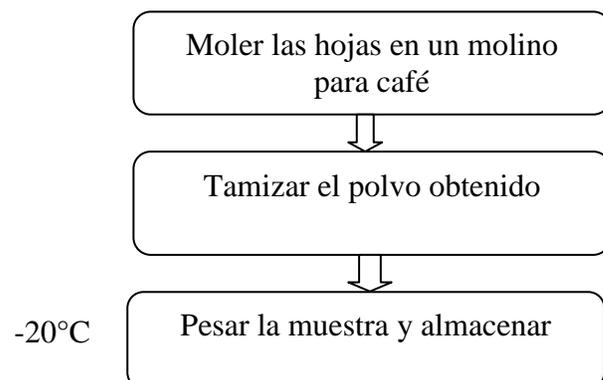


Grafica 5. Razón de humedad en función del tiempo de secado del lote 2 de hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50°C con una corriente de aire continuo de 1.2 m/s.

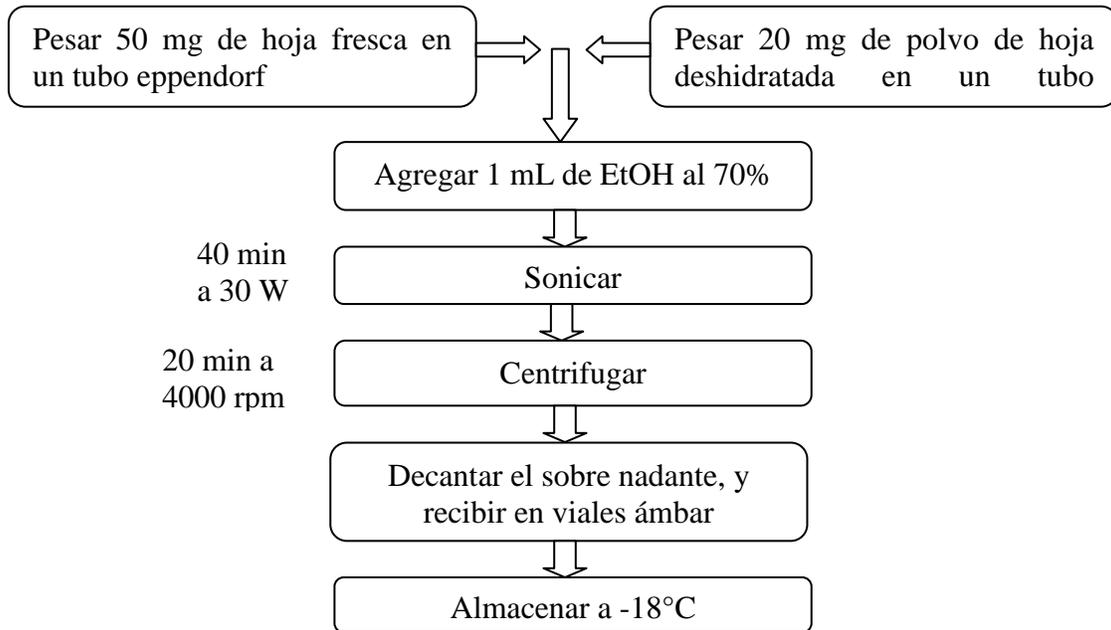


Grafica 6. Razón de humedad en función del tiempo de secado del lote 3 de hojas de *S. amarissima* a una temperatura de 50°C con una corriente de aire continuo de 1.2 m/s.

### Apéndice 3. Molienda de las hojas

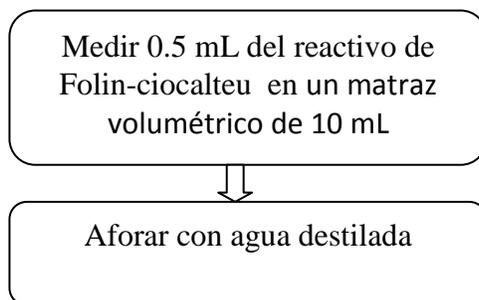


#### Apéndice 4. Obtención de los extractos.

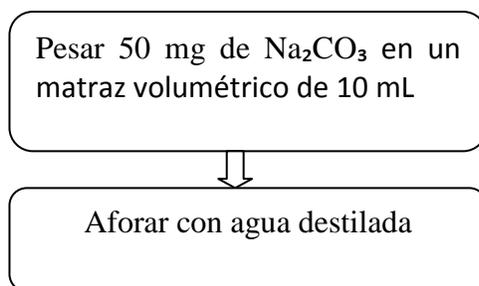


**Apéndice 5.** Preparación de soluciones para fenoles totales y cuantificación de fenoles totales

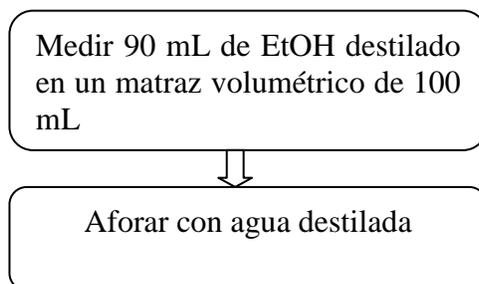
Reactivo de Folin-ciocalteu 0.1 M



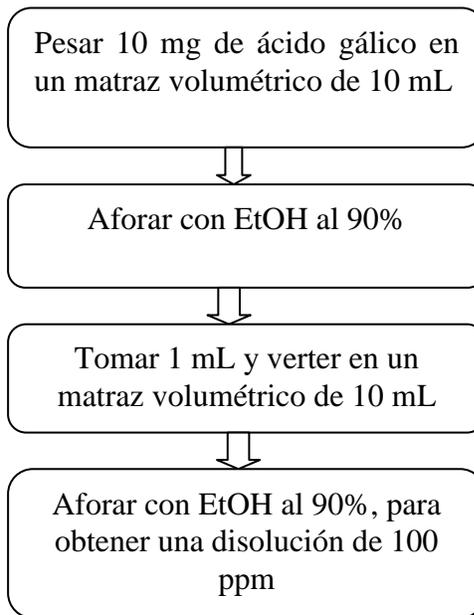
$\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 0.5% (p/v)



EtOH al 90%



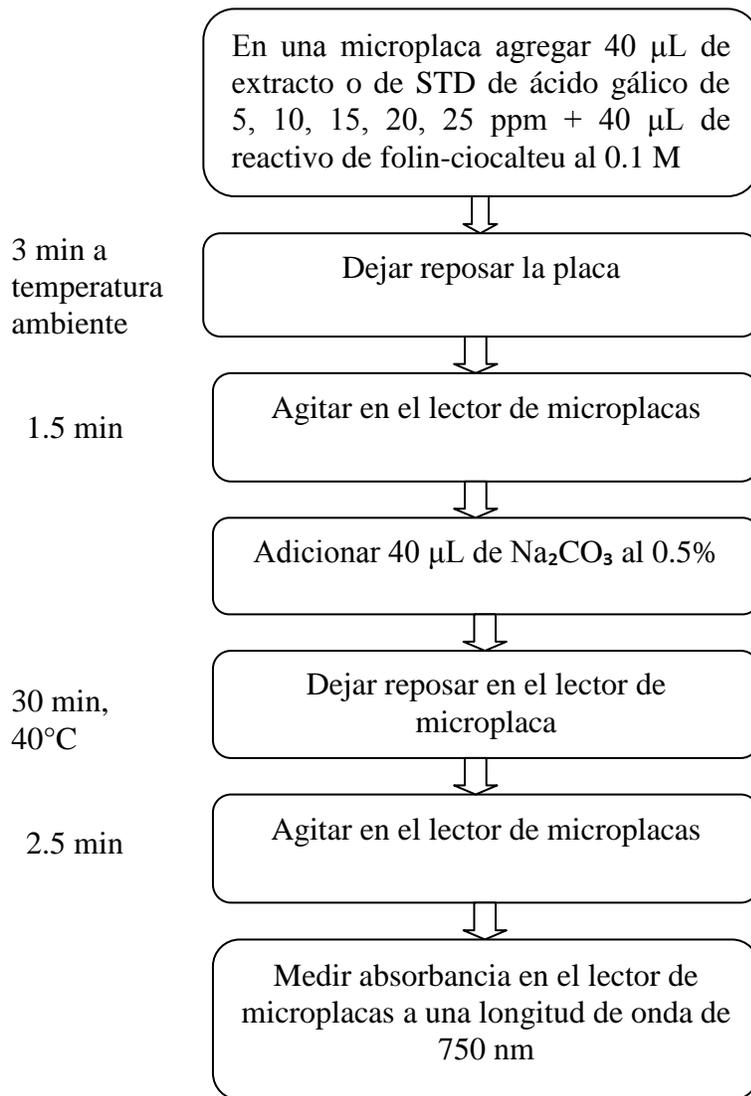
### Disolución de ácido gálico



A partir de la disolución de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ácido gálico se prepararon los estándares para la curva de calibración.

Concentración de Ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen de EtOH acuoso al 90% (m/L)	Volumen de disolución de ácido gálico 100 $\mu\text{g/mL}$ (m/L)	Volumen total (m/L)
25	7.5	2.5	10
20	8	2	10
15	8.5	1.5	10
10	9	1	10
5	9.5	0.5	10

### Cuantificación de fenoles totales



El blanco de los estándares se preparó con el estándar de 25 µg/mL y se les adicionó agua destilada en lugar del reactivo de folin-ciocalteu

Cálculos de cuantificación de fenoles totales en muestra se *S.amarissima* fresca

Concentración de AG. µg/ml	ABS R <sub>1</sub>	ABS R <sub>2</sub>	ABS R <sub>3</sub>	ABS Promedio	Desv. Estd.	C.V.
BLK	0.042	0.043	0.045	0.043	0.002	3.525
5	0.070	0.070	0.070	0.070	0.000	0.000
10	0.097	0.096	0.099	0.097	0.002	1.569
15	0.126	0.126	0.125	0.126	0.001	0.459
20	0.156	0.157	0.156	0.156	0.001	0.369
25	0.190	0.195	0.191	0.192	0.003	1.378

Concentración de AG. µg/ml	ABS R <sub>1</sub> -BLK STD	ABS R <sub>2</sub> -BLK STD	ABS R <sub>3</sub> -BLK STD	ABS Promedio	Desv. Estd.	C.V
5	0.027	0.027	0.027	0.027	0.000	0.000
10	0.054	0.053	0.056	0.054	0.002	2.829
15	0.083	0.083	0.082	0.082	0.001	0.701
20	0.113	0.114	0.113	0.113	0.001	0.511
25	0.147	0.152	0.148	0.149	0.003	1.780

#### ABSORBANCIA DE LA MUESTRA

	SPLC <sub>1</sub>	SPLC <sub>2</sub>	SPLC <sub>3</sub>	Promedio	Desv. Estd.	CV
Ctrl BLK	0.0400	0.0400	0.0420	0.0407		
muestra	0.1490	0.1470	0.1490	0.1483	0.00	0.7784

#### Datos generales de la muestra fresca de *S. amarissima*

Datos	Réplica <sub>1</sub>	Réplica <sub>2</sub>	Réplica <sub>3</sub>
ABS Ajustada	0.1083	0.1063	0.1083
Factor de dilución	6	6	6
volumen de extracción mL	1	1	1
Masa en polvo (g)	0.05	0.05	0.05
% de humedad	95.12	95.12	95.12
% de masa seca en muestra	4.88	4.88	4.88
% de muestra	100	100	100

#### Ecuación general de regresión lineal

Y= Ax +B	
Y= absorbancia	A= 0.00601
X= concentración de Á. Gálico (µg/mL)	B= -0.00590
A= Pendiente	
B= Intercepto	

---

**Datos para calcular fenoles totales en la muestra fresca de *S. amarissima***

---

<b>Muestra</b>	<b>Concentración de FT en la muestra diluida <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Factor de dilución (FD)(<math>\mu\text{g EAG/ mL muestra concentrada}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{g EAG/g de muestra (vol. De masa de la muestra utilizada)}</math></b>	<b>Mg masa muestra (<math>1\text{mg}/1000\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Mg EAG/g masa seca</b>	<b>Mg EAG/100 g de masa seca de muestra</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desv. Estd.</b>	<b>C.V.</b>
SPL1	19.017	114.1	2282.004	2.282	46.762	4676.238			
SPL2	18.684	112.103	2242.051	2.242	45.944	4594.367			
SPL3	19.017	114.1	2282.004	2.282	46.762	4676.238	4648.948	47.269	1.017

Cálculos de cuantificación de fenoles totales en muestra se *S. amarissima* seca.

Concentración de AG. µg/ml	ABS R <sub>1</sub>	ABS R <sub>2</sub>	ABS R <sub>3</sub>	ABS Promedio	Desv. Estd.	C.V.
BLK	0.042	0.043	0.045	0.043	0.002	3.525
5	0.070	0.070	0.070	0.070	0.000	0.000
10	0.097	0.096	0.099	0.097	0.002	1.569
15	0.126	0.126	0.125	0.126	0.001	0.459
20	0.156	0.157	0.156	0.156	0.001	0.369
25	0.190	0.195	0.191	0.192	0.003	1.378

Concentración de AG. µg/ml	ABS R <sub>1</sub> -BLK STD	ABS R <sub>2</sub> -BLK STD	ABS R <sub>3</sub> -BLK STD	ABS Promedio	Desv. Estd.	C.V
5	0.027	0.027	0.027	0.027	0.000	0.000
10	0.054	0.053	0.056	0.054	0.002	2.829
15	0.083	0.083	0.082	0.082	0.001	0.701
20	0.113	0.114	0.113	0.113	0.001	0.511
25	0.147	0.152	0.148	0.149	0.003	1.780

#### ABSORBANCIA DE LA MUESTRA

	SPLC <sub>1</sub>	SPLC <sub>2</sub>	SPLC <sub>3</sub>	Promedio	Desv. Estd.	C.V
Ctrl BLK	0.0400	0.0410	0.0410	0.0407	0	0
muestra	0.1600	0.1600	0.1600	0.1600		

#### Datos generales de la muestra seca de *S. amarissima*

Datos	Réplica <sub>1</sub>	Réplica <sub>2</sub>	Réplica <sub>3</sub>
ABS Ajustada	0.1193	0.1193	0.1193
Factor de dilución	26	26	26
volumen de extracción mL	1	1	1
Masa en polvo (g)	0.02	0.02	0.02
% de humedad	9.97	9.97	9.97
% de masa seca en muestra	90.03	90.03	90.03
% de muestra	100	100	100

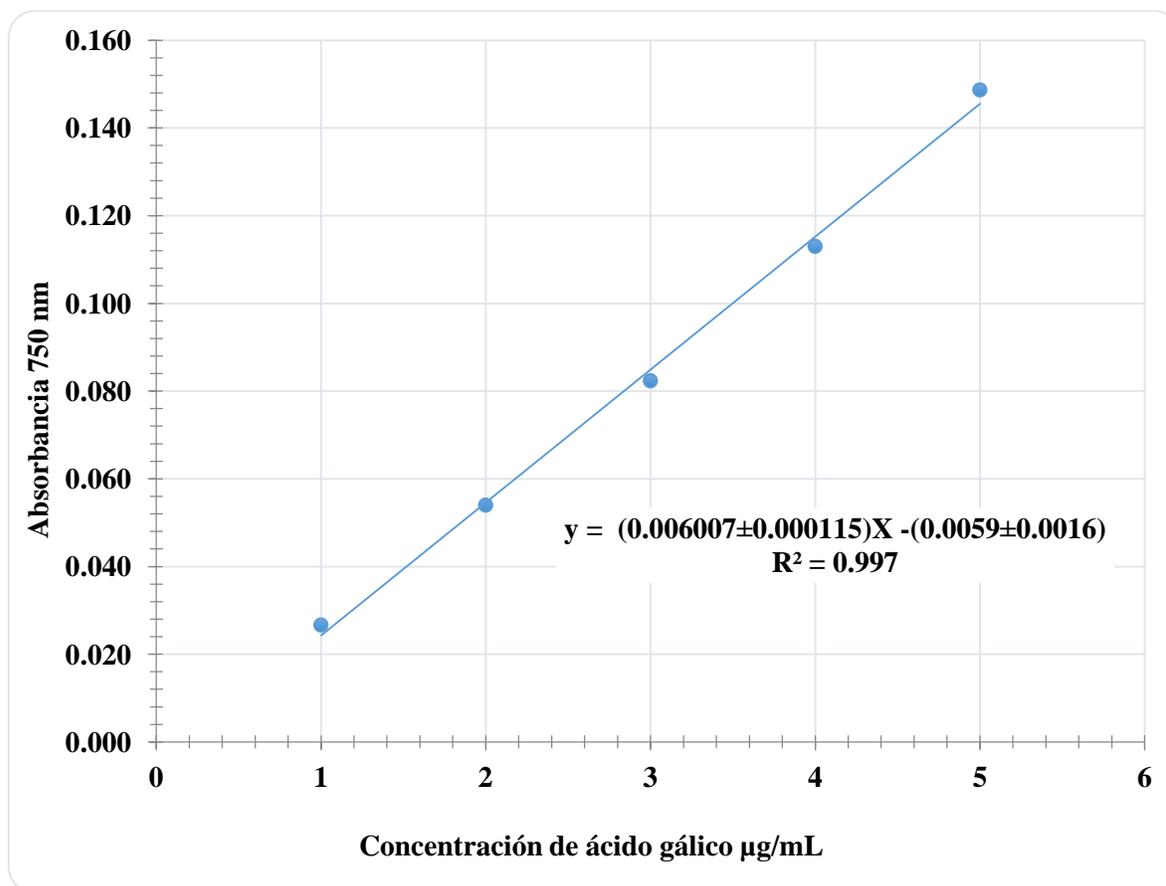
#### Formula de aplicación

Y= Ax +B	
Y= absorbancia	A= 0.00601
X= concentración de Á. Gálico (µg/mL)	B= -0.00590
A= Pendiente	
B= Intercepto	

**Datos para calcular fenoles totales en la muestra seca de *S. amarissima***

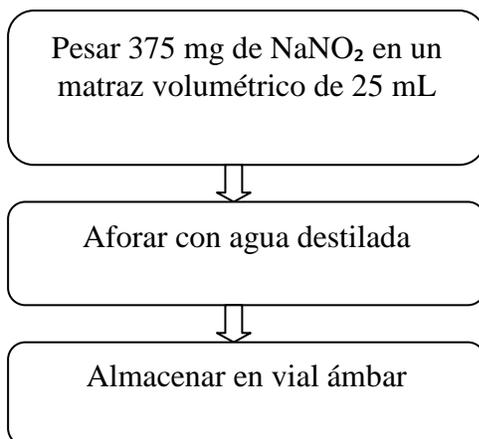
<b>Muestra</b>	<b>Concentración de FT en la muestra diluida <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Factor de dilución (FD)(<math>\mu\text{g EAG/mL}</math> de muestra concentrada)</b>	<b><math>\mu\text{g EAG/g}</math> de muestra (vol. De extracción/ masa de la muestra utilizada)</b>	<b>Mg EAG/g masa muestra (1mg/1000<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Mg EAG/g de masa seca</b>	<b>Mg EAG/100 g de masa seca de muestra</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desv. Std.</b>	<b>C.V.</b>
SPL1	20.848	542.045	27102.270	27.102	30.104	3010.360			
SPL2	20.848	542.045	27102.270	27.102	30.104	3010.360	3010.360	0	0
SPL3	20.848	542.045	27102.270	27.102	30.104	3010.360			

Curva de calibración de ácido gálico para extractos de *S. amarissima* fresca y seca.

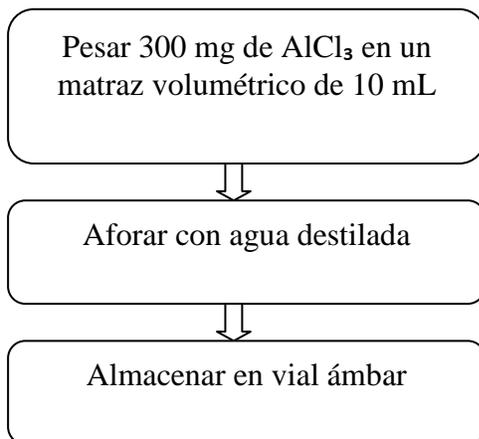


**Apéndice 6.** Preparación de soluciones para flavonoides totales y cuantificación de flavonoides

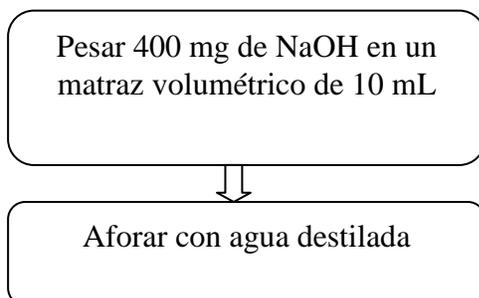
$\text{NaNO}_2$  al 1.5% (P/V)



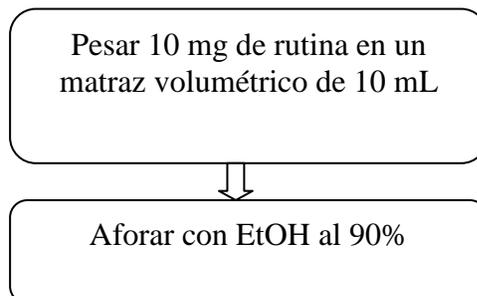
$\text{AlCl}_3$  al 3% (P/V)



$\text{NaOH}$  1M



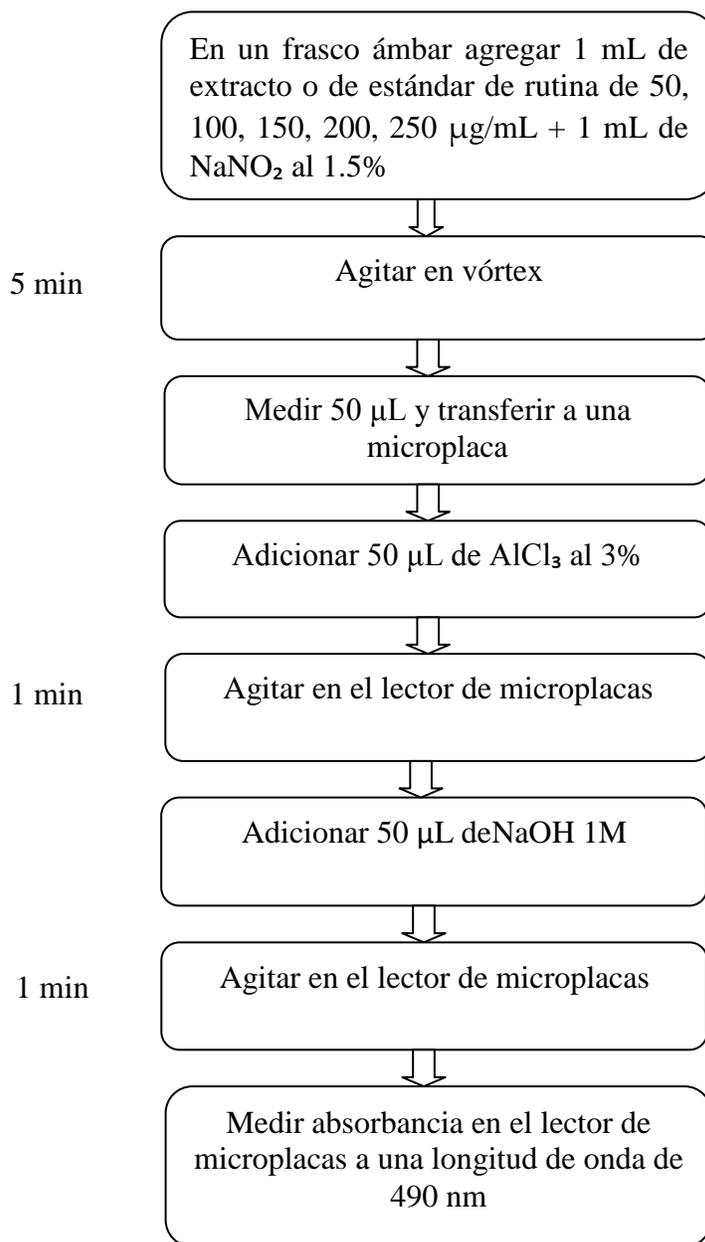
Rutina 1000  $\mu\text{g/mL}$



A partir de la disolución de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de rutina se prepararon los estándares de 50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{g/mL}$

Concentración de rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen de EtOH acuoso al 90% (m/L)	Volumen de disolución de rutina 1000 $\mu\text{g/mL(m/L)}$	Volumen total (m/L)
250	7.5	2.5	10
200	8	2	10
150	8.5	1.5	10
100	9	1	10
50	9.5	0.5	10

### Cuantificación de Flavonoides totales



Para el blanco de los estándares se utilizó el estándar de 250 $\mu\text{g/mL}$ . Al blanco de los estándares y de la muestra se le agrego 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada en lugar de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 3%

Cálculos para cuantificación de flavonoides totales en la muestra fresca de *S. amarissima* fresca.

Concentración de Rutina. µg/ml	ABS R1	ABS R2	ABS R3	ABS Promedio	Des. Estd.	C.V.
BLK	0.075	0.076	0.073	0.075	0.002	2.046
50	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.000
100	0.101	0.101	0.101	0.101	0.000	0.000
150	0.132	0.133	0.133	0.133	0.001	0.435
200	0.15	0.151	0.151	0.151	0.001	0.383
250	0.18	0.183	0.18	0.181	0.002	0.957

Concentración de Rutina µg/ml	ABS R1- BLK STD	ABS R2- BLK STD	ABS R3- BLK STD	ABS Promedio	Des. Estd	C.V
50	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000
100	0.026	0.026	0.026	0.026	0.000	0.000
150	0.057	0.058	0.058	0.058	0.001	1.001
200	0.075	0.076	0.076	0.076	0.001	0.763
250	0.105	0.108	0.105	0.106	0.002	1.634

#### ABSORBANCIA DE LA MUESTRA

	SPLC1	SPLC2	SPLC3	promedio	Des. Estándar	C.V.
Ctrl BLK	0.079	0.079	0.079	0.07900		
muestra	0.121	0.119	0.121	0.12033	0.0011547	0.959584935

#### Datos generales de la muestra fresca de *S. amarissima*

Datos	Réplica1	Réplica2	Réplica3
ABS Ajustada	0.042	0.04	0.042
Factor de dilución	2	2	2
volumen de extracción mL	1	1	1
Masa en polvo (g)	0.05	0.05	0.05
% de humedad	95.12	95.12	95.12
% de masa seca en muestra	4.88	4.88	4.88
% de muestra	100	100	100

---

**Ecuación general de regresión lineal**

---

$Y = Ax + B$

Y= absorbancia

X= concentración de Rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )

A= Pendiente 0.00050

B= Intercepto -0.02303

---



---

**Datos para calcular flavonoides totales en la muestra fresca de *S. amarissima***

---

muestra	concentración de FT en la muestra diluida $\mu\text{g/mL}$	Factor de dilución (FD)( $\mu\text{g}$ rutina/ mL de muestra concentrada)	$\mu\text{g}$ rutina/g de muestra (vol. De extracción/ masa de la muestra utilizada)	Mg rutina/g masa muestra (1mg/1000 $\mu$ g)	Mg rutina/g de masa seca	Mg rutina/100 g de masa seca de muestra	promedio	Desv. Estándar	C.V.
SPL1	130.0667	260.1333	5202.6667	5.2027	106.6120	10661.2022			
SPL2	126.0667	252.1333	5042.6667	5.0427	103.3333	10333.3333	10551.9126	189.2951	0.0179
SPL3	130.0667	260.1333	5202.6667	5.2027	106.6120	10661.2022			

---

Cálculos para cuantificación de flavonoides totales en la muestra fresca de *S. amarissima* seca

Concentración de rutina. µg/ml	ABS R <sub>1</sub>	ABS R <sub>2</sub>	ABS R <sub>3</sub>	ABS Promedio	Des. Estd	C.V.
<b>BLK</b>	<b>0.075</b>	<b>0.076</b>	<b>0.073</b>	<b>0.075</b>	0.002	2.046
50	0.078	0.078	0.078	<b>0.078</b>	0.000	0.000
100	0.101	0.101	0.101	<b>0.101</b>	0.000	0.000
150	0.132	0.133	0.133	<b>0.133</b>	0.001	0.435
200	0.15	0.151	0.151	<b>0.151</b>	0.001	0.383
250	0.18	0.183	0.18	<b>0.181</b>	0.002	0.957

Concentración de rutina µg/ml	ABS R <sub>1</sub> -BLK STD	ABS R <sub>2</sub> -BLK STD	ABS R <sub>3</sub> -BLK STD	ABS Promedio	Des. Estd	C.V
50	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000
100	0.026	0.026	0.026	0.026	0.000	0.000
150	0.057	0.058	0.058	0.058	0.001	1.001
200	0.075	0.076	0.076	0.076	0.001	0.763
250	0.105	0.108	0.105	0.106	0.002	1.634

#### ABSORBANCIA DE LA MUESTRA

	SPLC1	SPLC2	SPLC3	promedio	Des. Estándar	C.V.
<b>Ctrl BLK</b>	0.081	0.082	0.08	0.08100		
<b>muestra</b>	0.137	0.136	0.138	0.13700	0.001	0.72992701

#### Datos generales de la muestra seca de *S. amarissima*

Datos	Réplica1	Réplica2	Réplica3
ABS Ajustada	0.056	0.055	0.057
Factor de dilución	13	13	13
volumen de extracción mL	1	1	1
Masa en polvo (g)	0.02	0.02	0.02
% de humedad	9.97	9.97	9.97
% de masa seca en muestra	90.03	90.03	90.03
% de muestra	100	100	100

---

**Ecuación general de regresión lineal**

---

$$Y = Ax + B$$

Y= absorbancia

X= concentración de rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )

A= Pendiente 0.00050

B= Intercepto -0.02303

---



---

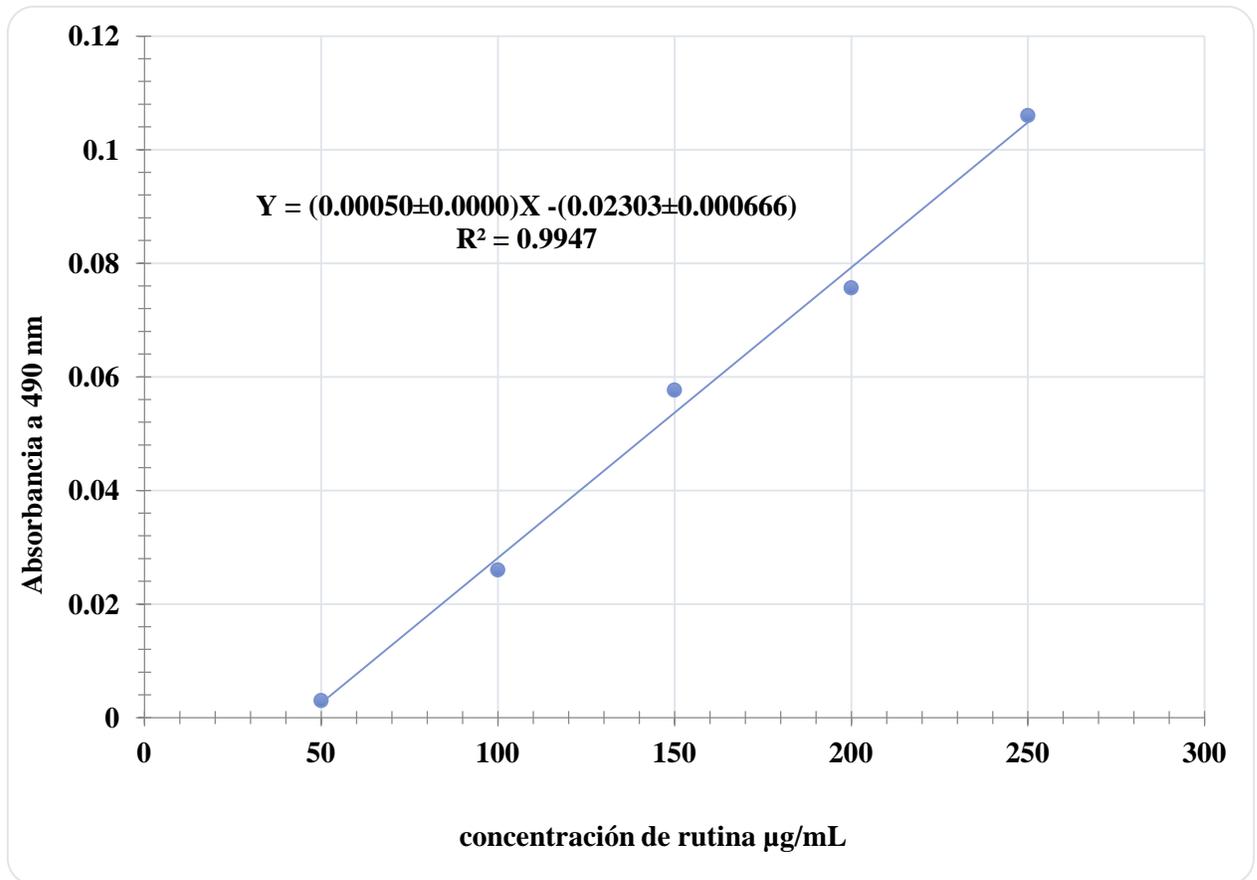
**Datos para calcular flavonoides totales en la muestra seca de *S. amarissima***

---

muestra	concentración de FT en la muestra diluida ( $\mu\text{g}$ de flavonoides/mL muestra diluida)	Factor de dilución (FD)( $\mu\text{g}$ rutina/mL de muestra concentrada)	$\mu\text{g}$ rutina/g de muestra (vol. De extracción/ masa de la muestra utilizada)	Mg rutina/g masa muestra ( $1\text{mg}/1000\mu\text{g}$ )	Mg rutina/g de masa seca	Mg rutina/100 g de masa seca de muestra	promedio	Desv. Estándar	C.V.
SPL1	158.0667	2054.8667	102743.3333	102.7433	114.1213	11412.1219			
SPL2	156.0667	2028.8667	101443.3333	101.4433	112.6773	11267.7256	11412.1218	144.3964	1.2653
SPL3	160.0667	2080.8667	104043.3333	104.0433	115.5652	11556.5182			

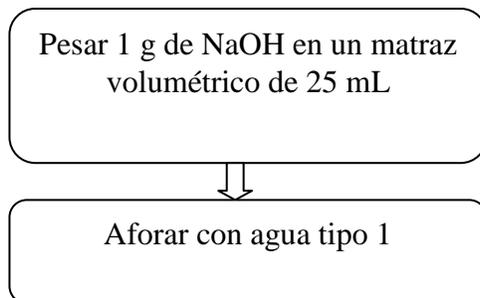
---

Curva de calibración de rutina para extractos de *S. amarissima* fresca y seca

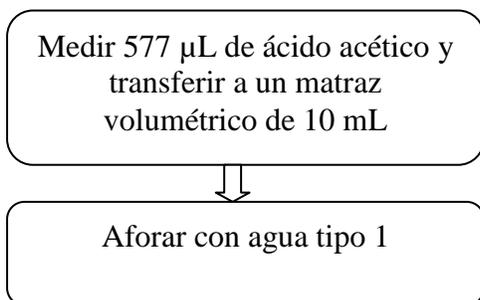


**Apéndice 7.** Preparación de soluciones para determinación del % de amilosa en la fécula de papa

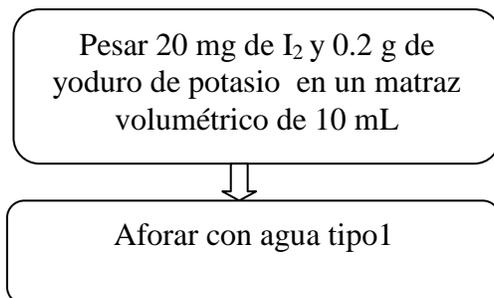
NaOH 1N



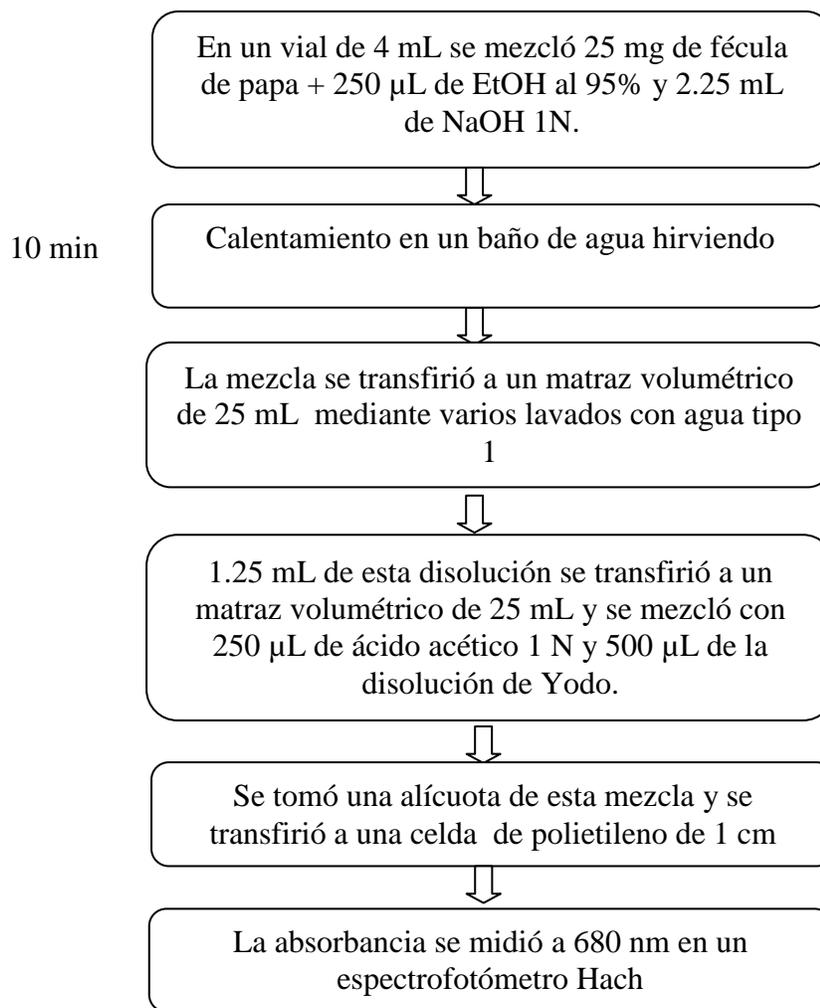
Ácido acético 1 N



Disolución de yodo



Determinación del porcentaje de  $\alpha$ -amilosa en fécula de papa a partir del valor azul

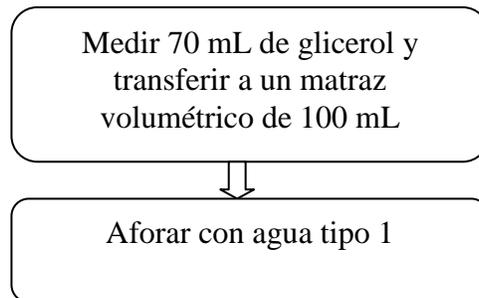


Cálculos para determinar el porcentaje de la  $\alpha$ -amilosa presente en la muestra.

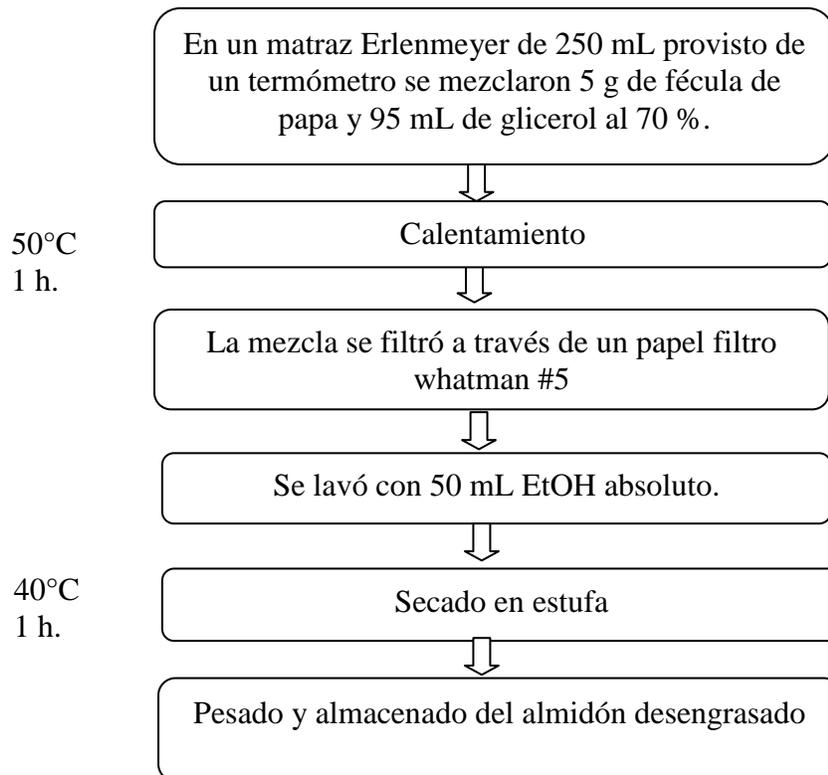
<b>Determinación del % de <math>\alpha</math>-amilosa en fécula de papa a partir del valor azul.</b>						
<b>Blk</b>	<b>r<sub>1</sub></b>	<b>r<sub>2</sub></b>	<b>r<sub>3</sub></b>	<b>Promedio</b>	<b>Des. Std.</b>	<b>Cv</b>
0	0.367	0.368	0.365	0.367	0.002	0.417
%amilosa= 56.203 (absorbancia promedio) + 5.0051						
	25.632	25.688	25.519	25.613	0.086	0.003

## Preparación de soluciones para el pretratamiento del almidón

### Glicerol al 70%



### Pretratamiento del almidón



## Preparación de soluciones para la separación de $\alpha$ -amilosa y $\alpha$ -amilopectina

Disolución buffer de fosfatos a un pH de 6.15.

Pesar 1.2477 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 0.3430 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y transferir a un matraz de 100 mL



Aforar con agua tipo 1

Separación de  $\alpha$ -amilosa

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocó 2 g de almidón desengrasado y 100 mL de disolución buffer de fosfatos a un pH de 6.15.



200 rpm  
98°C  
15 min.

Agitación



Enfriamiento en baño de hielo



4500 rpm  
1 h.

Centrifugación.



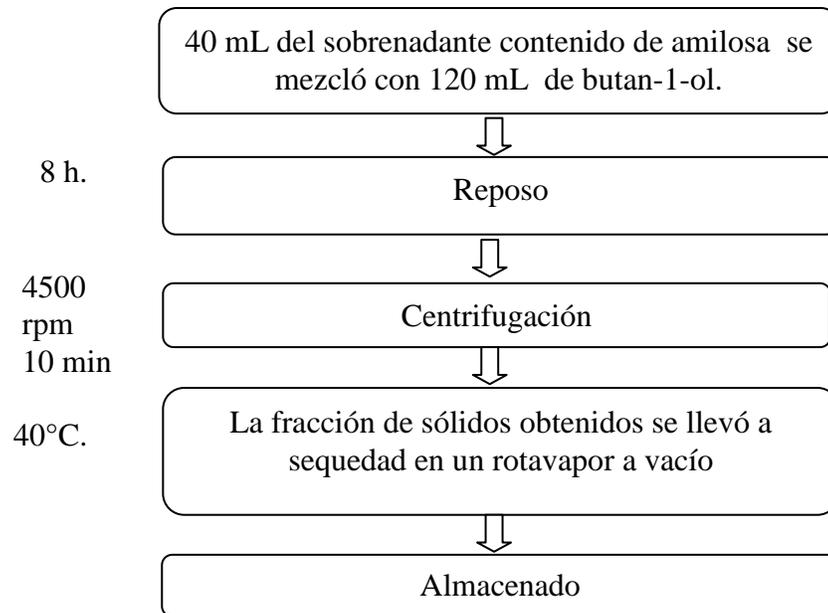
Decantación del sobre nadante (amilosa)



8°C

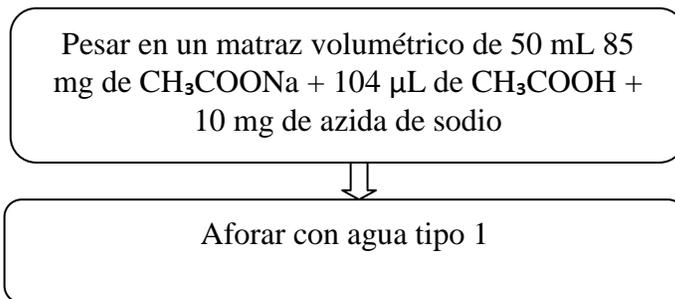
Almacenado

### Obtención de $\alpha$ -amilasa en polvo

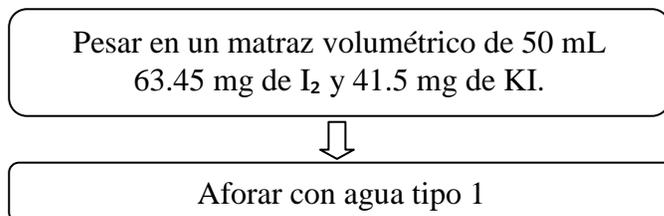


**Apéndice 8.** Preparación de soluciones para reacción enzimática de  $\alpha$ -amilosa

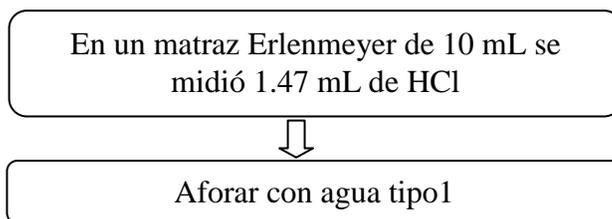
Disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5



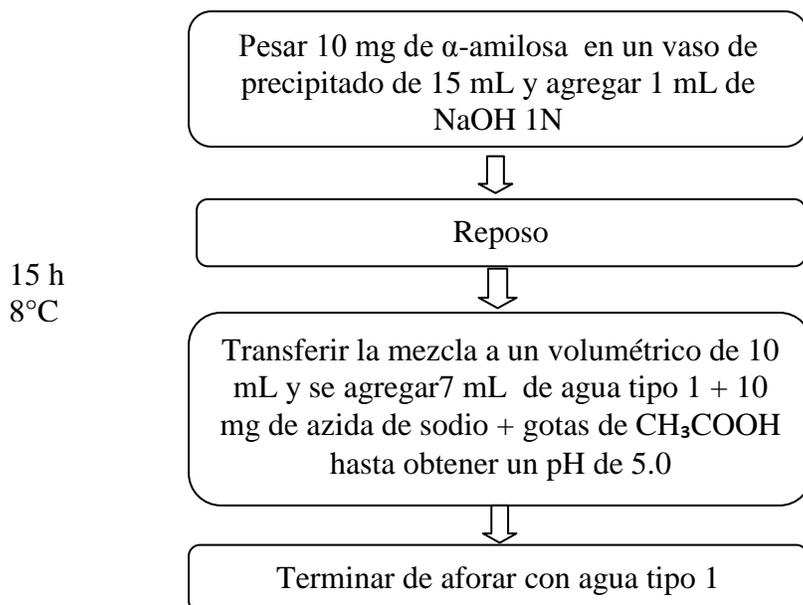
Disolución de triyoduro



Disolución de  $\text{HCl}$  1.5 M



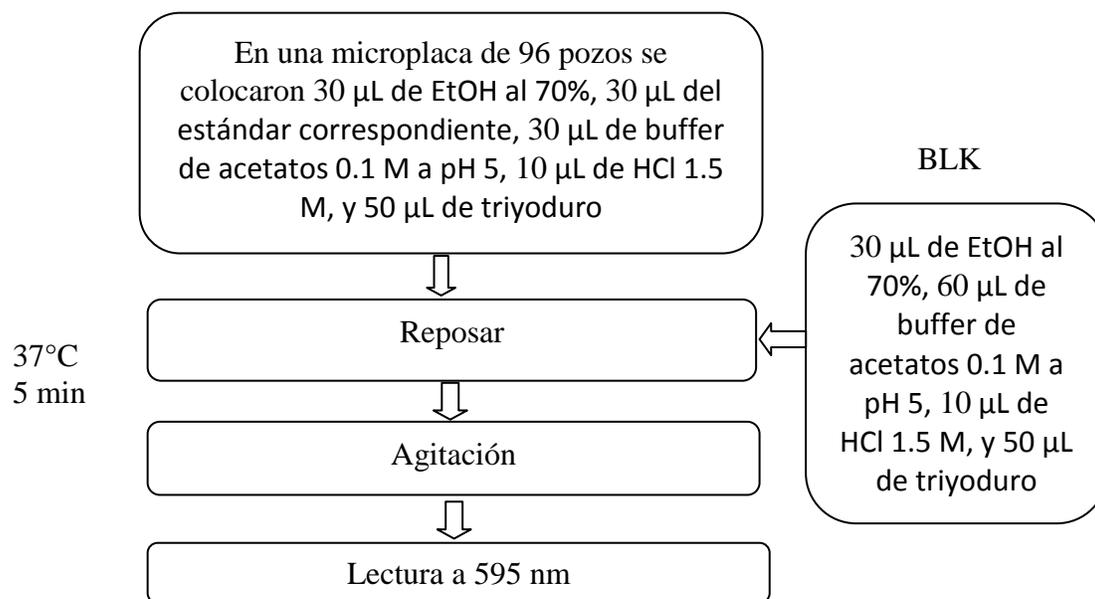
### Solubilidad de la $\alpha$ -amilosa



A partir de la disolución se prepararon los estándares de 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$  para construir la curva de calibración

disolución estándar $\mu\text{g/mL}$	vol. de disolución de amilosa 1000 $\mu\text{g/ml}$ ( $\mu\text{L}$ )	vol. de disolución amortiguadora de acetato 0.1m ( $\mu\text{L}$ )
100	50	450
200	100	400
300	150	350
400	200	300
500	250	250

### Reacción enzimática de la $\alpha$ -amilosa



### Cálculos de la reacción enzimática de $\alpha$ -amilosa

CONCENTRACIÓN	ABS		PROMEDIO	DES. STD	CV
BLK	0.046	0.045	0.046	0.001	1.264
100	0.093	0.095	0.093	0.001	1.233
200	0.148	0.148	0.149	0.001	0.389
300	0.246	0.246	0.245	0.001	0.235
400	0.309	0.307	0.307	0.001	0.375
500	0.387	0.387	0.386	0.001	0.149

CONCENTRACIÓN	ABS AJUSTADAS		PROMEDIO	DES. STD	CV
100	0.047	0.049	0.047	0.001	2.422
200	0.102	0.102	0.103	0.001	0.564
300	0.200	0.200	0.199	0.001	0.289
400	0.263	0.261	0.261	0.001	0.441
500	0.341	0.341	0.340	0.001	0.169

## Apéndice 9. Preparación de soluciones para reacción enzimática de $\alpha$ -amilasa

Disolución de  $\alpha$ -amilasa 1000 ppm.

En un matraz volumétrico de 10 mL se pesó 10 mg de  $\alpha$ -amilasa

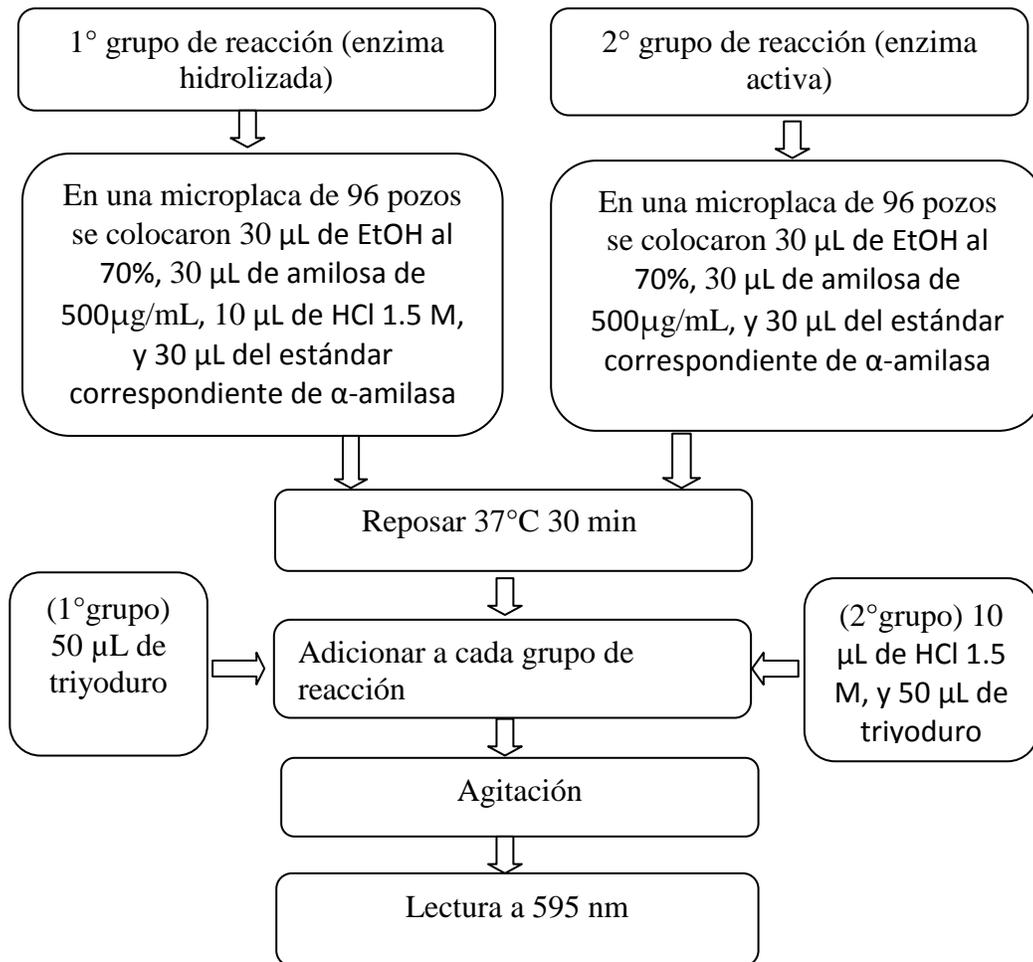


Aforar con disolución amortiguadora de acetato 0.1M.

A partir de esta solución se prepararon estándares de 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$  para construir la curva de calibración

<b>disolución estándar <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>vol. de disolución de <math>\alpha</math>- amilasa 1000 <math>\mu\text{g/ml}</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>vol. De disolución amortiguadora de acetato 0.1m (mL)</b>
100	100	900
200	200	800
300	300	700
400	400	600
500	500	500

### Reacción enzimática de la $\alpha$ -amilasa



### Cálculos para la reacción enzimática de $\alpha$ -amilasa

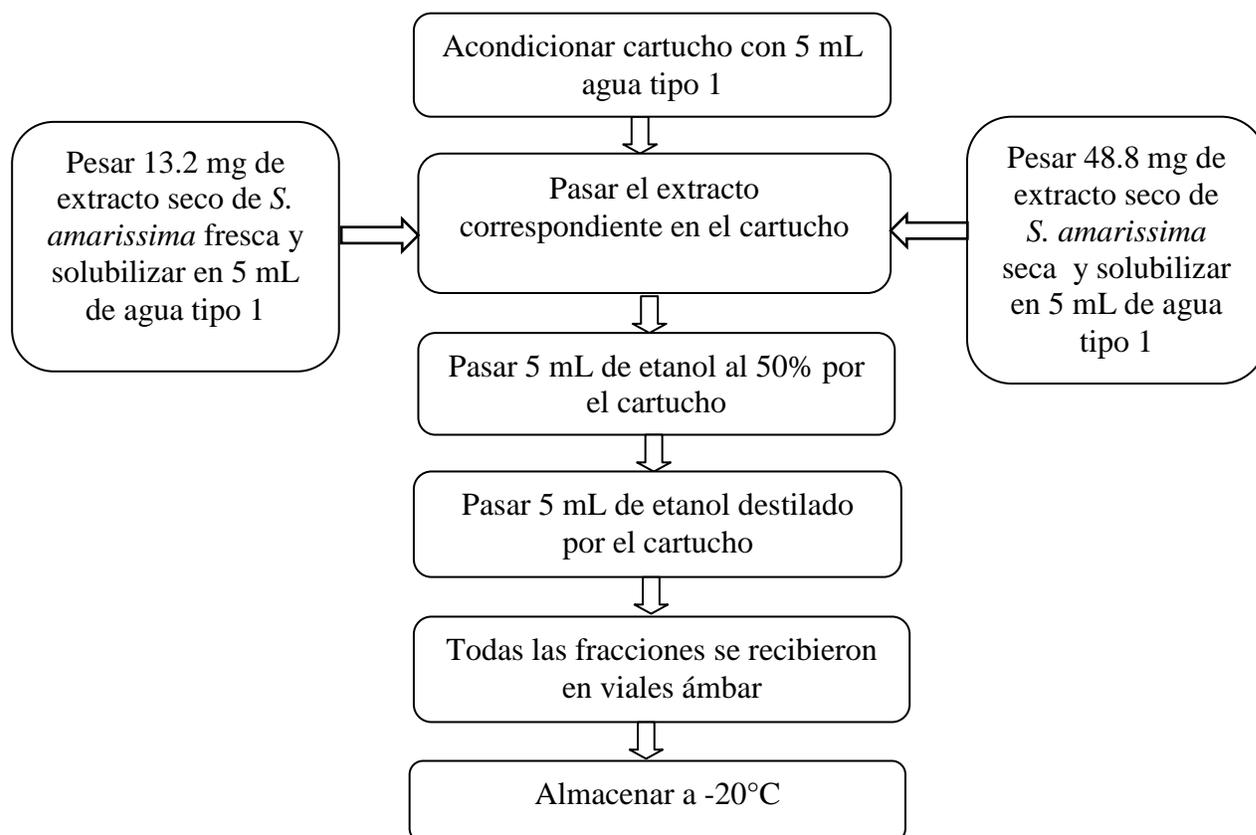
CONCENTRACIÓN	ABS ENZIMA HIDROLIZADA			PROMEDIO	DES. STD	CV
500	0.373	0.371	0.370	0.371	0.002	0.411
400	0.377	0.374	0.380	0.377	0.003	0.796
300	0.386	0.374	0.385	0.382	0.007	1.745
200	0.388	0.369	0.356	0.371	0.016	4.338
100	0.388	0.397	0.392	0.392	0.005	1.149

<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS ENZIMA ACTIVA</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>
500	0.129	0.126	0.126	0.127	0.002	1.364
400	0.128	0.129	0.127	0.128	0.001	0.781
300	0.148	0.147	0.148	0.148	0.001	0.391
200	0.153	0.143	0.143	0.146	0.006	3.945
100	0.168	0.171	0.174	0.171	0.003	1.754

<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS AJUSTADA</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>
	<b>(HIDROLIZADA -ACTIVA)</b>					
500	0.244	0.245	0.244	0.244	0.001	0.236
400	0.249	0.245	0.253	0.249	0.004	1.606
300	0.238	0.227	0.237	0.234	0.006	2.599
200	0.235	0.226	0.213	0.225	0.011	4.923
100	0.220	0.226	0.218	0.221	0.004	1.881

### Apéndice 10. Lavado de extractos de *S. amarissima*

#### Lavado de extractos de *S. amarissima*



A partir de la fracción obtenida de etanol al 50% se realizaron las disoluciones de los extractos correspondientes.

CONCENTRACIÓN	VOL. SOL.50 mg/mL (mL)	VOL. DISOL. 70% (mL)	VOL. TOTAL (mL)
1000 µg/ ml	602	398	1 mL
500 µg/ ml	1510	3490	5 ml
250 µg/ ml	500	500	1 ml
100 µg/ ml	1000	4000	5 ml
50 µg/ ml	500	500	1 ml
10 µg/ ml	100	900	1 mL

---

<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>VOL. SOL. 20 MG/ML (mL)</b>	<b>VOL DISOL. 70% (mL)</b>	<b>VOL TOTAL (mL)</b>
1000 µg/ ml	1807.2	1192.8	3 mL
400 µg/ ml	400	600	1 mL
200 µg/ ml	600	2400	3 ml
40 µg/ ml	200	800	1 ml
20 µg/ ml	100	900	1 ml
5 µg/ ml	25	975	1 mL

---

## Apéndice 11. Inhibición de $\alpha$ -amilasa

Disolución de acarbosa 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Pesar 10 mg de acarbosa pura en un matraz volumétrico de 10 mL.

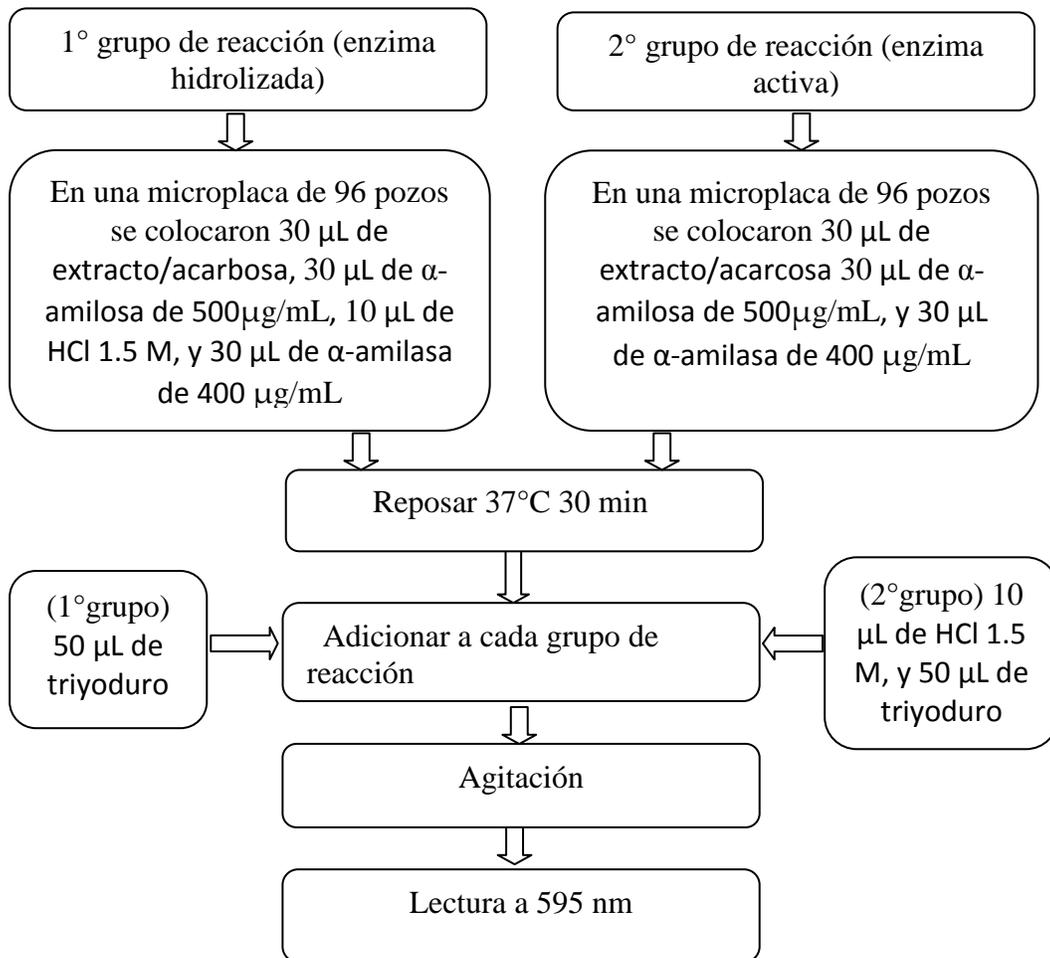


Aforar con disolución de buffer de fosfatos pH 5

A partir de la disolución de acarbosa 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se prepararon los estándares para la curva de calibración.

<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>CANTIDAD DE BUFFER DE ACETATOS PH 5 (mL)</b>	<b>CANTIDAD DE ACARBOSA 1000 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>VOL. TOTAL (mL)</b>
75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250	750	1 mL
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500	500	1 mL
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	750	250	1 mL
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	900	100	1 mL
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	950	50	1 mL
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	980	20	1 mL

## Inhibición de $\alpha$ -amilasa



Cálculos para determinar el porcentaje de inhibición de los extractos de *s. amarissima* en extracto fresco

<b>ENZIMA HIDROLIZADA</b>						
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS</b>		<b>PROMEDIO</b>		<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>
blk	0.363	0.363	0.361	0.362	0.001	0.319
1000	0.267	0.261	0.26	0.263	0.004	1.441
500	0.294	0.295	0.292	0.294	0.002	0.520
250	0.32	0.325	0.316	0.320	0.005	1.408
100	0.32	0.32	0.32	0.320	0.000	0.000
50	0.34	0.346	0.339	0.342	0.004	1.108
10	0.372	0.375	0.378	0.375	0.003	0.800

<b>ENZIMA ACTIVA</b>						
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS</b>		<b>PROMEDIO</b>		<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>
blk	0.160	0.158	0.153	0.157	0.004	2.297
1000	0.178	0.178	0.177	0.178	0.001	0.325
500	0.190	0.188	0.186	0.188	0.002	1.064
250	0.198	0.197	0.198	0.198	0.001	0.292
100	0.185	0.184	0.183	0.184	0.001	0.543
50	0.187	0.180	0.180	0.182	0.004	2.217
10	0.185	0.189	0.187	0.187	0.002	1.070

<b>EXTRACTO FRESCO</b>			
<b>Concentración</b>	<b>%EA</b>	<b>%Aerel disol</b>	<b>% de inhibición</b>
blk	56.670	100.000	0.000
1000	32.360	57.104	42.896
500	35.982	63.494	36.506
250	38.293	67.573	32.427
100	42.500	74.996	25.004
50	46.634	82.291	17.709
10	50.133	88.466	11.534

Cálculos para determinar el porcentaje de inhibición de los extractos de *s. amarissima* en extracto seco

<b>ENZIMA HIDROLIZADA</b>						
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS</b>		<b>PROMEDIO</b>	<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>	
EtOH	0.34	0.337	0.341	0.3393	0.0021	0.6135
1000 µg/ ml	0.308	0.309	0.307	0.3080	0.0010	0.3247
400 µg/ ml	0.31	0.312	0.309	0.3103	0.0015	0.4922
200 µg/ ml	0.32	0.329	0.332	0.3270	0.0062	1.9098
40 µg/ ml	0.338	0.338	0.339	0.3383	0.0006	0.1706
20 µg/ ml	0.387	0.381	0.388	0.3853	0.0038	0.9825
5 µg/ ml	0.411	0.42	0.414	0.4150	0.0046	1.1042

<b>ENZIMA ACTIVA</b>						
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS</b>		<b>PROMEDIO</b>	<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>	
EtOH	0.163	0.169	0.16	0.1640	0.0046	2.7943
1000 µg/ ml	0.198	0.195	0.198	0.1970	0.0018	0.8792
400 µg/ ml	0.192	0.193	0.188	0.1910	0.0027	1.3852
200 µg/ ml	0.198	0.192	0.197	0.1957	0.0032	1.6429
40 µg/ ml	0.192	0.199	0.19	0.1937	0.0048	2.4402
20 µg/ ml	0.217	0.218	0.215	0.2167	0.0015	0.7050
5 µg/ ml	0.224	0.226	0.221	0.2237	0.0025	1.1251

<b>EXTRACTO SECO</b>			
<b>Concentración</b>	<b>%EA</b>	<b>%Aerel disol</b>	<b>% de inhibición</b>
blk	51.67	100	0
1000 µg/ mL	36.039	69.748	30.252
400 µg/ mL	38.453	74.421	25.579
200 µg/ mL	40.163	77.73	22.270
40 µg/ mL	42.759	82.753	17.247
20 µg/ mL	43.772	84.714	15.286
5 µg/ mL	46.104	89.229	10.771

Cálculos para determinar el porcentaje de inhibición de la acabosa

<b>ENZIMA HIDROLIZADA</b>						
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS</b>		<b>PROMEDIO</b>	<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>	
buffer	0.578	0.575	0.578	0.577	0.002	0.300
75	0.529	0.525	0.520	0.525	0.005	0.859
50	0.520	0.520	0.522	0.521	0.001	0.222
25	0.529	0.522	0.520	0.524	0.005	0.902
10	0.569	0.575	0.570	0.571	0.003	0.563
5	0.577	0.575	0.577	0.576	0.001	0.200
1	0.596	0.598	0.596	0.597	0.001	0.194

<b>ENZIMA ACTIVA</b>						
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ABS</b>		<b>PROMEDIO</b>	<b>DES. STD</b>	<b>CV</b>	
buffer	0.092	0.092	0.093	0.092	0.001	0.625
75	0.118	0.120	0.122	0.120	0.002	1.667
50	0.125	0.125	0.124	0.125	0.001	0.463
25	0.119	0.117	0.115	0.117	0.002	1.709
10	0.115	0.116	0.121	0.117	0.003	2.740
5	0.110	0.112	0.111	0.111	0.001	0.901
1	0.103	0.103	0.100	0.102	0.002	1.698

<b>concentración</b>	<b>%EA</b>	<b>%Aerel disol</b>	<b>% de inhibición</b>	<b>% de inhibición</b>
buffer	83.998	100.000	0.000	0
75	77.128	91.822	8.178	8.1780
50	76.056	90.546	9.454	9.4542
25	77.658	92.452	7.548	7.5480
10	79.463	94.602	5.398	5.3983
5	80.740	96.122	3.878	3.8780
1	82.905	98.699	1.301	1.3009

## Apéndice 12. Análisis estadísticos

Análisis comparativo de pares de media t de Student, para los resultados obtenidos de fenoles totales en muestra fresca y seca.

Replica	Fenoles totales de muestra fresca	Fenoles totales de muestra seca
SPL1	4676.24	3010.36
SPL2	4594.37	3010.36
SPL3	4676.24	3010.36

Prueba F para varianzas de dos muestras del contenido de Fenoles totales de la muestra fresca y seca.

	Variable 1	Variable 2
Media	4648.947667	3012.026667
Varianza	2234.28688	8.333333336
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	268.1144256	
P(F<=f) una cola	0.003715891	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales para el contenido de Fenoles totales de la muestra fresca y seca.

	Variable 1	Variable 2
Media	4648.947667	3010.36
Varianza	2234.28688	0
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	60.04278682	
P(T<=t) una cola	0.000138633	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.000277267	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Análisis comparativo de pares de media t de Student, para los resultados obtenidos de flavonoides en muestra fresca y seca.

<b>Replica</b>	<b>Flavonoides de muestra fresca</b>	<b>Flavonoides de muestra fresca</b>
SPL1	10661.2022	11412.1219
SPL2	10333.3333	11267.7256
SPL3	10661.2022	11556.5182

Prueba F para varianzas de dos muestras del contenido de Flavonoides de la muestra fresca y seca.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	10551.91257	11412.1219
Varianza	35832.67186	20850.29145
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1.718569352	
P(F<=f) una cola	0.367840533	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales del contenido de Flavonoides de la muestra fresca y seca.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	10551.91257	11412.1219
Varianza	35832.67186	20850.29145
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	28341.48166	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-6.258042446	
P(T<=t) una cola	0.001662767	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846782	
P(T<=t) dos colas	0.003325534	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Análisis comparativo de pares de media t de Student, para los resultados del porcentaje de inhibición enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a la misma concentración utilizando la ecuación de los extractos secos.

ECUACIÓN		
$y = 4.3109\ln(x) - 0.2482$		
Concentración	Muestra seca	Muestra fresca
1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40.641	40.641
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$	37.374	38.169
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.902	35.698
40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	29.163	32.430
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	26.691	29.958
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	21.747	24.219

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de los resultados del porcentaje de inhibición enzimática de la  $\alpha$ -amilasa

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	31.75296371	33.5193317
Varianza	50.59092633	35.4898301
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	0.992131838	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-3.058114454	
P(T<=t) una cola	0.014081235	
Valor crítico de t (una cola)	2.015048372	
P(T<=t) dos colas	0.028162471	
Valor crítico de t (dos colas)	2.570581835	

Análisis comparativo de pares de media t de Student, para los resultados del porcentaje de inhibición enzimática de la  $\alpha$ -amilasa a la misma concentración utilizando la ecuación de los extractos frescos.

ECUACIÓN		
$y = 5.9819x^{0.2933}$		
Concentración	Muestra seca	Muestra fresca
1000 $\mu\text{g/ ml}$	45.367	45.367
500 $\mu\text{g/ ml}$	34.676	37.021
250 $\mu\text{g/ ml}$	28.296	30.210
100 $\mu\text{g/ ml}$	17.649	23.091
50 $\mu\text{g/ ml}$	14.402	18.843
10 $\mu\text{g/ ml}$	9.591	11.753

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	24.99681619	27.71408748
Varianza	184.6177894	151.8615371
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0.993504147	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-3.426367205	
P(T<=t) una cola	0.00935444	
Valor crítico de t (una cola)	2.015048372	
P(T<=t) dos colas	0.01870888	
Valor crítico de t (dos colas)	2.570581835	