

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE EN EXTRACTOS
ACUOSOS DE HOJAS DE NEEM (*Azadirachta indica*, A. Juss) FRESCAS Y
DESHIDRATADAS.

Por:

LAURA ISABEL LÓPEZ COVARRUBIAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Saltillo, Coahuila; México

Junio 2017

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Determinación de la actividad hipoglucemiante en extractos acuosos de hojas de neem
(*Azadirachta indica*, A. Juss) frescas y deshidratadas.

TESIS

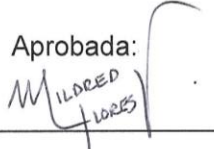
Por:

LAURA ISABEL LÓPEZ COVARRUBIAS

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprobada:


MILDRED
FLORES

M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui

Presidente del jurado



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Sinodal

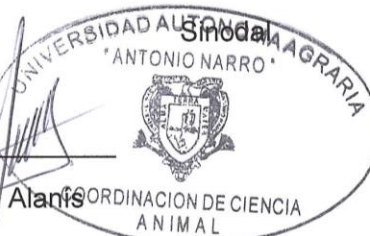


Dr. Armando Robledo Olivo

Sinodal


Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila, Junio 2017

Agradecimientos

Agradezco principalmente a Dios, por darme la fuerza necesaria para terminar lo que me parecía imposible. Por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento, ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mí persona.

A mi Familia, por apoyarme en todo momento durante estos 5 años de mi carrera, por haberme enseñado que con dedicación y constancia todo se consigue en esta vida.

A mi asesora la M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui, por brindarme su dedicación y orientación, su persistencia, su tiempo, pero sobre todo de su paciencia, sin su ayuda y conocimiento no hubiera sido posible concluir satisfactoriamente esta etapa y la más importante de mi carrera.

A mi Alma Terra Mater, por abrirme las puertas de mi formación profesional, su biblioteca, lo aprendido en las aulas, pero sobre todo por haberme permitido crecer profesionalmente.

A la Dra. Gabriela Martínez Vázquez, por sus enseñanzas y apoyo impartido en el aula; así como por su paciencia y conocimiento brindado, para la culminación de esta meta.

Al Dr. Armando Robledo Olivo, por su amistad, apoyo incondicional académicamente, sus conocimientos brindados en el aula, pero sobre todo por su contribución para la realización de este logro.

A mis Amigas, Nohemy Torres, Lizbeth García, Tamara Mendoza, Xitlalli Peralta, Marcela Gaona y Alejandra Rodríguez, por su apoyo y amistad incondicional en todo momento, que de una manera u otra hicieron de esta experiencia algo muy especial.

A mi hermano Armando Quintero Zavala, por su amistad y su desinteresada ayuda ante momentos difíciles dentro y fuera de las aulas de nuestra Alma Terra Mater.

A todos ustedes, ¡GRACIAS INFINITAS!

Dedicatorias

*Dedico esta tesis principalmente a mi tita: **Gloria Parra Rendón**, que, aunque ya no puede alegrarme con su presencia, sé que donde quiera que se encuentre estará muy orgullosa de mí. Fuiste mi motivación más grande para el cumplimiento de este logro. **La presencia de tu ausencia me vuelve aún más capaz. Te amaré por siempre.***

*A mis padres: **María Isabel Covarrubias Sánchez y Jorge Eduardo López Parra***

Por estar siempre a mi lado cuando más lo necesito en buenos y malos momentos de mi corta vida, por mostrarme su apoyo incondicional, por brindarme el interés para que estudie y me desarrolle profesional y personalmente. Han sabido guiarme por el camino del bien. ¡Gracias por mostrarme que todo lo que me proponga lo puedo lograr!

*A mis hermanas: **Marcela Isabel López Covarrubias y María Magdalena López Covarrubias***

Aunque la mayoría de las veces hay momentos que parecemos estar en batalla continua, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por su apoyo incondicional y todos los bonitos momentos que hemos pasado. ¡Las amo infinitamente!

*A mi abuelo: **Juan Bosco López Torres***

*Por su aporte significativo para cumplir esta meta, pero sobre todo
Por sus consejos, su apoyo y amor incondicional en todo momento a
lo largo de mi carrera profesional y en mi vida personal. ¡Te amo!*

¡Dedicado a ustedes, mi pequeña gran familia!

Indice General

Agradecimientos.....	iii
Dedicatorias.....	v
Indice General	vii
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras	xi
Resumen	xii
Capítulo 1	1
Introducción.....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo general	3
1.2.2. Objetivos específicos	3
Capítulo 2	4
Marco Teórico.....	4
2.1. Diabetes	4
2.1.1. Concepto.....	4
2.1.2. Generalidades	4
2.1.3 Tipos	4
2.1.4. Síntomas	5
2.1.5. Diagnóstico.....	5
2.1.6. Control.....	7
2.1.6.1. Diabetes tipo 1	7
2.1.6.2. Diabetes tipo 2	7
2.1.6.3. Diabetes gestacional.....	7
2.1.7 Medicina alternativa	7
2.2. Neem.....	8
2.2.1. Producción	9
2.2.2. Usos medicinales del neem.....	9
2.2.2.1. Semilla	10
2.2.2.2. Hojas.....	10
2.2.2.3. Flor.....	11

2.2.2.4. Corteza	11
2.3. Actividad hipoglucémica	12
2.3.1. Sulfonilureas	12
2.3.2. Biguanidas	12
2.3.3. Meglitinidas	13
2.3.4. Tiazolidinedionas	13
2.3.5. Insulina.....	13
2.4. Inhibición de la actividad enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa.....	14
2.4.1. Definición de enzima	14
2.4.1.1. α -amilasa	14
2.4.1.2. α -glucosidasa.....	15
Capítulo 3	17
Materiales y Métodos	17
3.1 Ubicación del sitio experimental	17
3.2 Material biológico	17
3.3 Materiales, equipos de laboratorio y reactivos empleados	17
3.4 Metodología.....	19
3.4.1. Determinación de pH	20
3.4.2 Determinación de SST	20
3.4.3 Determinación de color	21
3.4.4. Preparación de reactivos.....	22
3.4.4.1 Almidón 1%.....	22
3.4.4.2 D-Glucopiranosido	22
3.4.4.3 α -amilasa	23
3.4.4.4 α -glucosidasa.....	23
3.5 Determinación de inhibición de α -amilasa.....	23
3.6 Determinación de la inhibición de α -glucosidasa	24
3.7. Análisis estadístico	25
Capítulo 4	26
4.1 Resultados y Discusión	26
4.1.1 Determinaciones físico-químicas.....	26
4.1.1.1 Determinación de pH.....	26

4.1.1.2 Determinación de sólidos solubles totales (SST)	26
4.1.1.3 Determinación de color	27
4.2. Determinación del índice de inhibición	28
4.2.1 Índice de inhibición de α -amilasa	28
4.2.2. Índice de inhibición de α -glucosidasa.....	29
Capítulo 5	31
5.1. Conclusión.....	31
Capítulo 6	32
Bibliografía.....	32
Capítulo 7	36
Anexos	36
7.1. Anexo 1: Análisis estadístico para pH	36
7.2. Anexo 2: Análisis estadístico para sólidos solubles totales	37
7.3. Anexo 3: Análisis estadístico de las variables del color (L^* , a^* y b^*)	38
7.3.1. Variable L^*	38
7.3.2. Variable a^*	39
7.3.3. Variable b^*	40
7.4. Anexo 4: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de α -amilasa.....	41
7.5. Anexo 5: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de α -glucosidasa	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Pruebas de laboratorio para la detección de Diabetes mellitus.	6
Tabla 2. Niveles de control para detectar la Diabetes mellitus.	6
Tabla 3. Algunos usos de las partes del árbol de neem (<i>Azadirachta indica</i> , A. Juss). (Singh, 2008).....	10
Tabla 4. Relación de reactivos.	17
Tabla 5. Material.	18
Tabla 6. Equipo.	18
Tabla 7. Valores promedio para la variable color (L^* , a^* , b^*) en los extractos de hojas de neem.	27

Índice de Figuras

Figura 1. Semilla del neem.....	10
Figura 2. Hojas de neem.....	11
Figura 3. Flor del árbol de neem.....	11
Figura 4. Corteza del árbol de neem.....	12
Figura 5. Estructura de la α -amilasa.....	14
Figura 6. Hojas de neem en fresco.....	19
Figura 7. Hojas de neem en el proceso de deshidratación.....	19
Figura 8. Potenciómetro (Hanna) utilizado en esta determinación.....	20
Figura 9. Refractómetro utilizado en esta determinación.....	21
Figura 10. Colorímetro (KONICA MINOLTA) utilizado en esta prueba.....	21
Figura 11. Reactivo de almidón al 1% utilizado.....	22
Figura 12. Reactivo de glucopiranosido utilizado.....	22
Figura 13. Muestras, control y blanco de α -amilasa.....	23
Figura 14. Muestras, control y blanco de α -glucosidasa.....	25
Figura 15. Comparativo de pH entre hojas de neem frescas y deshidratadas.....	26
Figura 16. Comparativo de SST entre hojas de neem frescas y deshidratadas.....	27
Figura 17. Comparativo del índice de inhibición de α -amilasa entre hojas de neem frescas y deshidratadas.....	28
Figura 18. Comparativo del índice de inhibición de α -glucosidasa entre hojas de neem frescas y deshidratadas.....	29

Resumen

Hoy en día uno de los problemas de salud más inquietante a nivel mundial es la enfermedad llamada Diabetes mellitus, ésta se presenta cuando los niveles de azúcar (glucosa) en la sangre están muy elevados. Esta enfermedad es causada por factores genéticos, el sedentarismo, la obesidad, así como por malos hábitos alimenticios lo que ha ocasionado que se posicione como la segunda causa de mortalidad en México. Como sabemos, existe un tratamiento farmacológico específico para cada tipo de Diabetes, sin embargo, hoy en día la medicina alternativa es más común debido al interés de las personas en acceder a tratamientos más naturales y sanos para dejar a un lado los tratamientos de sustancias químicas y farmacológicas.

Dentro de estas prácticas medicinales se encuentra el neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) el cual es un árbol de hoja perenne originario de Asia y el sur de la India. Los compuestos hallados en la semilla, corteza y hojas del neem han sido probados como antisépticos, antifebriles, antiinflamatorios, antivirales y fungicidas.

La presente investigación se enfoca en la obtención de extractos acuosos a base de hojas de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) frescas y deshidratadas para determinar la actividad hipoglucemiante de estos extractos y su posible efecto en el control de la Diabetes mellitus.

Los resultados encontrados en el producto elaborado a partir de hojas deshidratadas muestran una inhibición de la enzima α -amilasa y α -glucosidasa, estableciendo así el mecanismo de su efecto hipoglucemiante.

Palabras clave: Diabetes, neem, actividad hipoglucemiante, inhibición enzimática, α -amilasa y α -glucosidasa.

Capítulo 1

Introducción

Las plantas medicinales han constituido la base del cuidado de la salud en todo el mundo desde los primeros días de la humanidad y siguen siendo ampliamente utilizadas y tienen una importancia considerable en el comercio internacional (Ebong, et al., 2008).

En algunos países africanos, por ejemplo, hasta el 90% de la población sigue dependiendo de las plantas como fuente de medicamentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de los habitantes del planeta confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud (González, et al., 2010).

La medicina alternativa se presenta de varias maneras: en obtener los componentes naturales directamente de la naturaleza y así ser aplicados, y la otra en cualquiera de las siguientes formas: gotas, ungüento, cremas, aerosoles, pastillas. Ha habido un enorme interés en el desarrollo de medicamentos alternativos para el control de la Diabetes mellitus, específicamente de fitoquímicos con la capacidad de retrasar o prevenir la absorción de glucosa.

Diversas especies vegetales han sido empleadas para uso medicinal, entre ellas se encuentra el árbol de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) originario de Asia y sur de la India. Es ampliamente conocido como bioinsecticida pues controla más de 400 especies de insectos, además de que cada parte de este árbol tiene propiedades medicinales y es comercialmente explotable (Biswas, et al., 2002).

Como sabemos, la Diabetes mellitus es un desorden metabólico en donde la acción de la insulina se ve afectada o existe deficiencia absoluta de ésta y como consecuencia da lugar al desequilibrio del metabolismo de la glucosa (Klein, et al., 2007). Si la Diabetes no es diagnosticada a tiempo se asocia con lesiones a largo plazo en diversos órganos, particularmente ojos, riñón, nervios, vasos sanguíneos y corazón.

Para el tratamiento farmacológico de la Diabetes mellitus se dispone de insulina en sus distintas presentaciones y de antidiabéticos orales. De estos últimos actualmente en el mercado se comercializan sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la alfa-glucosidasa, y, en un futuro próximo, las tiazolidinedionas (Ramírez Sotelo, et al., 2011).

Existen estudios de plantas que podrían representar alternativas eficaces y menos dañinas para enfermedades crónicas y degenerativas como lo son el extracto acuoso de Neem (*Azadirachta indica*, A. Juss), y de *Ibervillea sonora*, para su uso antidiabético en México y en el mundo. Por lo tanto, representan una alternativa viable para el control de la Diabetes mellitus (Ramírez Sotelo, et al., 2011).

Los fitofármacos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades crónicas como la Diabetes, deben ser prioridad para la comunidad científica mexicana interesada en la medicina tradicional, con la disposición de mejorar la condición de vida de sus semejantes y mostrar al mundo que nuestro país cuenta con una riqueza natural para el tratamiento de enfermedades de relevancia mundial.

Se estima que existen, en el mundo, 170 millones de personas son afectadas por Diabetes mellitus número que se duplicaría para el año 2030 (Wild, 2004).

1.1. Justificación

La Diabetes es una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que en el año 2014 en México el número de personas con diabetes aumentó de 108 millones en 1980 a 422 millones.

Se ha demostrado que medidas simples relacionadas con el estilo de vida son eficaces para prevenir la diabetes de tipo 2 o retrasar su aparición, como lo es llevar una dieta saludable baja en colesterol, realizar ejercicio, y evitar el consumo de tabaco (OMS, 2017). Así mismo existe el empleo de la medicina alternativa que implica el tomar diversos compuestos naturales tales como el extracto acuoso de diversas plantas, que ayudan a disminuir significativamente el nivel de azúcar en la sangre, es decir, la hiperglucemia inducida por la glucosa.

Estudios previos han demostrado el potencial antidiabético de (*Azadirachta indica*) pero hay escasez de información sobre el mecanismo de acción de esta planta. Por lo tanto, con esta investigación se busca obtener más conocimiento acerca de los beneficios que puede tener en la salud, al determinar si presenta la inhibición enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa brindando así el potencial de control diabético al extracto acuoso de hojas de neem, pudiendo disminuir significativamente el aumento de la glucosa en la sangre en personas diabéticas de tipo 2.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Obtener un extracto acuoso de hojas de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) frescas y deshidratadas para determinar la actividad hipoglucemiante de estos extractos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Elaborar extractos de neem a partir de hojas frescas y deshidratadas
- Determinar la inhibición de α -amilasa en el extracto acuoso de hojas de neem frescas y deshidratadas
- Determinar la inhibición de α -glucosidasa en el extracto acuoso de hojas de neem frescas y deshidratadas

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Diabetes

2.1.1. Concepto

La Diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (OMS, 2017).

2.1.2. Generalidades

Hace cientos de años, un médico griego llamó a esta enfermedad como: *diabetes*, que significa “que fluye a través”, debido a las cantidades tan grandes de orina que generan las víctimas. Después, se agregó la palabra *mellitus* que significa “con miel”, debido a la gran cantidad de glucosa en la orina (Roth, 2009).

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el número de personas con Diabetes en el mundo se ha incrementado vertiginosamente de 1995 a la fecha y se estima que para el 2030 habrá alrededor de 366 millones. Por lo anterior, la Diabetes se considera un problema de salud pública cuyo impacto en términos económicos, sociales y en la calidad de vida, la convierte en una prioridad nacional (Jiménez, 2013).

2.1.3 Tipos

Se conocen tres tipos de Diabetes:

La **Diabetes tipo I** se desarrolla cuando el sistema inmune del cuerpo destruye las células pancreáticas que producen la hormona insulina, la cual regula la glucosa en la sangre; Es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en infantes cuya incidencia está aumentando, especialmente en niños menores de 5 años. Se ha clasificado en dos tipos: “Diabetes inmuno mediada”, en la que la destrucción de las

células beta produce la deficiencia absoluta de insulina y “Diabetes idiopática”, sin evidencias de autoinmunidad. Este tipo de Diabetes constituye entre 1% y 10% de la población de diabéticos en el mundo (Stewart, 2009) (Dorado, 2008).

La **Diabetes tipo II** se presenta cuando el organismo no produce la insulina suficiente y/o no puede usarla correctamente, generalmente afecta a adultos, pero debido a la obesidad, hoy en día se presenta en personas más jóvenes. La incidencia de la Diabetes mellitus tipo II está aumentando en todo el mundo debido a la interacción entre una predisposición genética y factores de riesgo conductuales y ambientales (Tuomilehto, et al., 2001).

La **Diabetes gestacional** es una alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se manifiesta por hiperglucemia, que se descubre por primera vez durante un embarazo. Por lo regular este trastorno desaparece después del parto y por ello se considera un periodo de anormalidad condicionado por la gestación; los cambios en la acción de la insulina condicionan la adaptación del metabolismo materno para favorecer la disposición de los nutrientes que requiere el feto para su desarrollo (Valencia & Zárate, 2005).

2.1.4. Síntomas

Los síntomas más frecuentes y principales de la Diabetes son: sensación de mucha sed, producción de grandes cantidades de orina, cansancio, pérdida de peso y visión borrosa.

2.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico positivo de Diabetes mellitus es el acto de identificar o reconocer la existencia de esta enfermedad en un paciente. En el caso de nuestro país se realiza mediante la Norma Oficial Mexicana, NOM 015-SSA2-1994 Para La Prevención, Tratamiento y Control De La Diabetes Mellitus (Spezial, 2007).

Las pruebas de laboratorio son un elemento indispensable para detectar, confirmar, clasificar y controlar al paciente diabético; las pruebas más útiles para estos fines en

pacientes con Diabetes tipo 1 y 2 se muestran en la Tabla 1, mientras que en la Tabla 2 se presentan los rangos que permiten determinar si se presenta la enfermedad o no.

Tabla 1. Pruebas de laboratorio para la detección de Diabetes mellitus.

Pruebas de laboratorio
Glucemia Basal
Glicemia Post-Prandial 2 Horas
Curva De Tolerancia a La Glucosa
Hemoglobina Glucosilada: Hba1c
Examen General De Orina: Glucosuria, Cetonuria y Micro albuminuria
Evaluación de la función renal: Cistatina C
Evaluación De Riesgo Aterogénico: Colesterol Total, Índices LDL/HDL, Triglicéridos
Evaluación de Riesgo Coronario: PCR de alta sensibilidad.

Tabla 2. Niveles de control para detectar la Diabetes mellitus.

Pruebas	Control	Bueno	Aceptable	Malo
Glucemia basal en ayuno	mg/dl	< 115	115 - 140	> 140
Glucemia post prandial (2 h)	mg/dL	< 140	140 - 200	> 200
Colesterol total	mg/dL	< 200	200 - 240	> 240
HDL colesterol	mg/dL	> 45	35 - 45	< 35
LDL colesterol	mg/dL	< 160	160 - 190	> 190
CT/ HDL-c	Índice 1	< 4	4 - 7	> 7
LDL-c / HDL-c	Índice 2	< 3	3 - 4	> 4
PCR HS	mg/l	< 1	1 - 3	> 3
Triglicéridos	mg/dL	< 150	150 - 250	> 250
Creatinina	mg/dL	< 1	1 - 2	> 2
Hb glucosilada (HbA _{1c})	%	< 6	6 - 7	> 7
Glucosuria	mg/dL	< 50	50 - 100	> 100
	Tira reactiva	Negativa	1+	> 1+
Cetonuria	mg/dL	< 5	5 - 40	> 40
	Tira reactiva	Negativa	1+	> 1+
Microalbuminuria	mg/dL	< 2	2 - 20	> 20
	Tira reactiva	Negativa	1+	> 1+
Proteinuria	mg/dL	< 30	30 - 100	> 100
	Tira reactiva	Negativa	1+	> 1+

2.1.6. Control

Si la Diabetes no se trata, puede causar problemas de salud prolongados por los altos niveles de glucosa en la sangre. El tratamiento nutricional debe ser individualizado tomando en cuenta el metabolismo de la persona y los objetivos del tratamiento (Roth, 2009). Las estrategias de tratamiento se dividen en no farmacológicas como la dieta y el ejercicio y las farmacológicas que se dividen en medicamentos orales e insulina (Cruz & Zacarías Castillo, 2002). Por lo tanto, para cada tipo de diabetes existe un control específico, que se describe a continuación:

2.1.6.1. Diabetes tipo 1

Se recomienda llevar un control con tratamiento solamente de insulina, así como una dieta balanceada baja en grasas.

2.1.6.2. Diabetes tipo 2

Puede controlarse llevando una dieta con bajo contenido calórico, y alto contenido de frutas y verduras, cereales y pescado debido a la presencia de obesidad, aparte de la realización de ejercicio para lograr la reducción de medidas, así como la ingesta de medicamento oral farmacológico y/o insulina (Massó & Escobar Jiménez, 2009).

2.1.6.3. Diabetes gestacional

Dieta saludable baja en grasas, poco ejercicio y medicamentos orales como la metformina para bajar el nivel de glucosa.

2.1.7 Medicina alternativa

El término de “medicina alternativa” o “medicina complementaria” se refiere a las prácticas de salud que no forman parte de la medicina convencional (OMS, 2014). Es difícil distinguir si los primeros usos de plantas fueron alimentos, medicinas o amuletos mágicos.

Existen diferentes maneras en que los nativos usan las plantas medicinales: Un 32% de las medicinas alternativas se hacen de hojas, el 26% de cortezas, el 19% de raíces, el 7% de frutos, otro 7% de savia o látex, 5% de tallos y 4% de flores. En base a los datos anteriores, el 83% de las medicinas populares son mezclas o infusiones y el 17%

restante consiste de partes de la planta usadas directamente. Alrededor de un 64% de las sustancias se toman internamente y 36% se aplican externamente (Kreig, 1970).

De acuerdo con un artículo publicado por la OMS (2002), las medicinas tradicionales (Indo-americana, China, Ayurveda, Homeopática, etc.), llamadas complementarias o alternativas, se utilizan cada vez más, tanto en países “desarrollados” como en los que se encuentran “en desarrollo” (Gómez, 2003).

Se han registrado más de 400 tratamientos tradicionales para la Diabetes mellitus, pero sólo un pequeño número de ellos han recibido evaluación científica y médica para determinar su eficacia. Se ha confirmado una acción hipoglucémica de algunos tratamientos en modelos animales y en pacientes diabéticos no insulino dependientes, y se han identificado varios compuestos hipoglucémicos. Un sustituto botánico para la insulina parece poco probable, pero los tratamientos tradicionales pueden proporcionar pistas valiosas para el desarrollo de nuevos agentes hipoglucemiantes orales y complementos dietéticos simples (Bailey & Day, 1989).

Una enfermedad compleja como la Diabetes mellitus, en la que poco se habla en aspectos de prevención y curación, sino más bien de gestión, hay un mayor enfoque en las plantas en la búsqueda de hipoglucémicos o anti hiperglucémicos.

2.2. Neem

El neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) es un árbol de hoja perenne originario de Asia y del sur de la India, pero cultivada en la mayoría de otros países del mundo, es perteneciente a la familia de plantas *Meliaceae*. En la república mexicana sólo se encuentra en el centro y sur del país.

Se han revisado las actividades biológicas y propiedades medicinales de la planta, así como los efectos hipoglucémicos de sus hojas, tallo y corteza y aceite de semilla. (Biochem & Biotech, 2008). Existen estudios que indican que *Azadirachta indica* A. Juss podría ser beneficiosa en la Diabetes mellitus en el control del azúcar en la sangre o también para prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad (Koshla, et al., 2000).

Desde la antigüedad cada parte del árbol se ha utilizado en la medicina tradicional para remedios caseros contra varias enfermedades, por sus grandes beneficios tanto en el área agrícola como medicinal se ha convertido en un tema de investigación muy amplio (Cruz & Del Angel, 2004).

Los árboles de neem son atractivos, de hojas siempre verdes que pueden llegar a crecer hasta 30 metros de alto. El tronco tiene una corteza dura y escamosa. Sus flores son pequeñas, blancas y bisexuales. La fruta es una drupa elipsoidal, lisa, de hasta casi 2 cm de largo. Cuando madura, es amarilla-verdosa y tiene una pulpa dulce que incluye una semilla. La semilla se compone de una cáscara y de un núcleo. El núcleo se utiliza mayormente en el control de plagas. Aunque los compuestos bioactivos se encuentran en todo el árbol, en los núcleos de la semilla están más concentrados y accesibles (Vargas López, et al., 2008).

2.2.1. Producción

El neem inicia su producción de frutos después de 3 a 5 años de plantado, alcanzando su máximo potencial a los 10 años, en el cual puede alcanzar más de 50 kg de frutos por árbol anualmente. La floración y formación de frutos ocurre normalmente una vez al año, algunas veces dos, y su rendimiento depende de las condiciones ambientales, la precipitación, así como del tipo de suelo de la región de establecimiento (Fernández, 1998).

2.2.2. Usos medicinales del neem

La primera indicación de que el neem estaba siendo utilizado como tratamiento medicinal fue hace unos 4.500 años (Conrick, 2001).

Son bien conocidas diversas actividades farmacológicas y aplicaciones medicinales del neem. El extracto crudo de diferentes partes del árbol de neem se ha utilizado como medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades (Biswas, et al., 2002). A continuación, en la Tabla 3, se presentan algunos de los usos medicinales de cada parte del árbol de neem:

Tabla 3. Algunos usos de las partes del árbol de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss). (Singh, 2008)

Parte del neem	Usos
Hojas	Malaria, purificación de la sangre, problemas cardíacos, enfermedades de la piel, diabetes, sarampión, reumatismo.
Flores	Diarrea, diabetes, lepra.
Tallos	Infecciones bucales
Aceite de la semilla	Ulceras, hemorroides, como anticonceptivo, pesticidas, espermicidas, antibacteriano, cicatrizante y antidiabético.
Corteza	Sangrado de encías, hemorroides.

2.2.2.1. Semilla

(Figura 1). Es una excelente fuente de aceite con un alto contenido de compuestos triterpenoides, se utiliza en la medicina tradicional por sus propiedades antidiabéticas, espermicidas, anti fertilidad, antibacterianas y cicatrizantes, además, para controlar el crecimiento de hongos en las plantas. (Vargas López, et al., 2008)

Las cremas de la piel que incorporan aceite del neem se utilizan para controlar el acné y otros problemas de la piel.



Figura 1. Semilla del neem.

2.2.2.2. Hojas

En la India, alimentan a sus hijos con hojas de neem (Figura 2) y aceite para tratar o prevenir una variedad de dolencias, incluyendo gusanos intestinales, malaria, encefalitis y meningitis. Una pasta hecha de hojas de neem se utiliza para tratar la sarna, hongos

externos, viruela y piojos en la cabeza. Los adultos comen hojas de neem para controlar la diabetes, epilepsia, úlceras, dolores de cabeza y fiebres (Conrick, 2001).

También se utiliza para la malaria, purificación de la sangre, problemas cardíacos, enfermedades de la piel, diabetes, sarampión, reumatismo (Singh, 2008).



Figura 2. Hojas de neem.

2.2.2.3. Flor

Tiene uso medicinal contra las flemas, gusanos intestinales, diarrea, diabetes y lepra. (Figura 3).



Figura 3. Flor del árbol de neem

2.2.2.4. Corteza

Esta parte del neem se usa principalmente para el sangrado de encías, hemorroides, úlceras cutáneas, sensación de ardor y lepra. (Figura 4).



Figura 4. Corteza del árbol de neem.

A medida que el panorama mundial está cambiando ahora hacia el uso de productos vegetales no tóxicos con uso medicinal tradicional, el desarrollo de fármacos modernos a partir de neem debe enfatizarse para el control de diversas enfermedades.

2.3. Actividad hipoglucémica

Las sustancias hipoglucemiantes son aquellas capaz de reducir los niveles de azúcar (glucosa) en la sangre. A continuación, de acuerdo a (Cruz & Zacarías Castillo, 2002), se enlistan las sustancias hipoglucemiantes de origen farmacológico:

2.3.1. Sulfonilureas

Actúan aumentando la liberación de insulina a través de un canal de potasio ATP dependiente, y pueden disminuir la resistencia periférica a la insulina. Se administran vía oral. En promedio, las sulfonilureas reducen la glucosa plasmática de ayuno de 50-70mg/dL.

2.3.2. Biguanidas

Son compuestos que tienen 2 moléculas de guanidina, los fármacos de esta clase son: buformina, fenformina y metformina. La metformina es el más utilizado ya que posee menor riesgo de asociarse a acidosis láctica. Este fármaco estimula la captación celular de glucosa, incrementa la unión de insulina-receptor.

2.3.3. Meglitinidas

Actúan a través del cierre del canal ATP sensible en la membrana de la célula beta, uniéndose a receptores distintos de las sulfonilureas. Las drogas que pertenecen a este grupo son la repaglinida y la nateglinida. Estos fármacos restauran la primera fase de secreción de insulina disminuyendo la hiperglicemia postprandial, sin pico hiperglicémico entre las comidas.

2.3.4. Tiazolidinedionas

Actúan aumentando la sensibilidad a la insulina, sin afectar la secreción de la misma. Su mecanismo de acción es promover la captación de glucosa en músculo esquelético, tejido adiposo, y en el hígado a través de los receptores celulares nucleares conocidos como receptores gamma proliferador activado del peroxisoma. Se administran por vía oral.

2.3.5. Insulina

La insulina es necesaria para el metabolismo normal de carbohidratos, proteínas y grasas. Es necesaria para tener un color glucémico. En base a la farmacodinamia las insulinas se clasifican en: acción rápida, acción intermedia y acción prolongada.

Así también existen sustancias hipoglucémicas de manera natural como lo es en este caso en específico, el árbol de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss). Existen estudios donde se comprueba que el extracto acuoso de hojas de neem disminuye significativamente el nivel de azúcar en sangre y previene la adrenalina, así como la hiperglucemia inducida por glucosa. El extracto acuoso de hoja cuando se administra vía oral, también produce hipoglucemia en ratas normales y disminución de los niveles de glucosa en sangre en la Diabetes inducida experimentalmente en ratas (Biswas, et al., 2002).

2.4. Inhibición de la actividad enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa

2.4.1. Definición de enzima

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y, actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. Muchas de las enzimas no trabajan solas, se organizan en secuencias, también llamadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática (Franklin, 2017).

2.4.1.1. α -amilasa

La α -amilasa (1,4, α -glucanohidrolasa) es una enzima extracelular que hidroliza los enlaces α 1-4 glucosídicos de polisacáridos, tales como el almidón, glicógeno o productos de degradación de los mismos (Figura 5). Esta enzima tiene importancia en la industria alimentaria como en cervecería, dulcería, cereales y panadería, y específicamente en la sacarificación malto génica, sin embargo, su producción es limitada y es un producto de exportación (Andrea Guadarrama, et al., 2017).

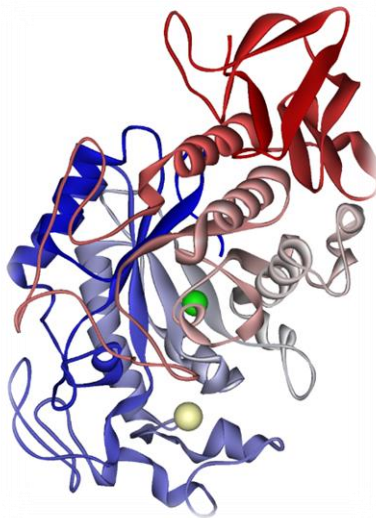


Figura 5. Estructura de la α -amilasa.

La amilasa es una enzima hidrolasa que se produce en el páncreas, sirve para descomponer los carbohidratos complejos en azúcares simples, esto es necesario para

que el organismo pueda absorber los azúcares y convertirlos en energía (Franklin, 2017).

La digestión empieza en la boca con la α -amilasa, primer enzima en ser identificada y aislada en 1833, secretada por las glándulas salivales, que hidroliza las uniones glucosídicas internas del almidón dando lugar a fragmentos cortos de polisacáridos y oligosacáridos. Al llegar al estómago esta enzima se mezcla con el bolo alimenticio y el jugo gástrico inhibiéndose debido al pH ácido, ya que ésta se inactiva cuando el pH es de 4 o menos.

Una segunda forma de α -amilasa la cual es secretada por el páncreas al intestino delgado y continúa el proceso de degradación, la α -amilasa pancreática da lugar principalmente a maltosa, malto triosa y oligosacáridos llamados dextrinas límite.

La maltosa y las dextrinas son degradadas a glucosa por enzimas de las microvellosidades intestinales. La amilasa puede ser detectada en la sangre en pequeñas cantidades, pero si se encuentra a niveles altos puede servir para el diagnóstico y control de la inflamación del páncreas llamado pancreatitis (Aviles, 2014).

La inactivación de la función de la enzima alfa-amilasa es una estrategia coherente para el control de la Diabetes mellitus tipo 2, al impedir o retrasar la absorción de carbohidratos ingeridos, consiguiendo efectos favorables como evitar el incremento postprandial de la glicemia y disminuir los efectos de la hiperglucemia. Un efecto desfavorable de la inhibición excesiva de la alfa-amilasa puede ser diarrea, hinchazón, flatulencia y distensión abdominal, debido a la fermentación anormal de los hidratos de carbono no digeridos, llevada a cabo por la flora normal de microorganismos en el colon. Algunos compuestos naturales derivados de plantas tienen actividad inhibidora contra la α -amilasa (Ojeda, 2008).

2.4.1.2. α -glucosidasa

Las α -glucosidasas, están presentes en una amplia gama de seres vivos como microorganismos, hongos, plantas y animales (Yamamoto , et al., 2004). Es una de las enzimas clave involucradas en el metabolismo y digestión de los carbohidratos en los seres humanos. Cataliza la hidrólisis de residuos de una variedad de sustratos, incluidos los disacáridos, oligosacáridos, y otros como los alquil-aril-glucopiranósidos;

esta enzima está presente en la región de borde del cepillo del intestino delgado. Los inhibidores de esta enzima retrasan su actividad y por lo tanto la absorción de los hidratos de carbono, es por ello que inhiben los picos de glucosa postprandial y esto lleva a la disminución de los niveles postprandiales de glucosa (Van de Laar, 2009).

El estudio de la actividad de inhibición de la α -glucosidasa está asociada con las siguientes actividades biológicas: anti-alimentaria en animales herbívoros, anti-hiperglicemia (Raju B. C., et al., 2010), anti-infecciosa, antimetásica, anti-viral (VIH), (Wrodnigg, et al., 2006) y desarrollo de enfermedades por almacenamiento excesivo en los lisosomas (Sawkar, et al., 2006).

Los inhibidores de alfa-glucosidasa son fármacos que retrasan la digestión de carbohidratos complejos actuando como inhibidores competitivos de las enzimas alfa-glucosidasa intestinales que hidrolizan los oligosacáridos en monosacáridos (Levobitz, 1998).

Existen inhibidores farmacológicos que tienen un efecto anti-hiperglucemiante. Inhiben de forma competitiva y reversible las α -glucosidasa presentes en las microvellosidades intestinales, responsables de la degradación de los oligosacáridos de la dieta (sacarosa, maltosa, etc.), en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa), retrasando la absorción de los hidratos de carbono complejos y disminuyendo el pico glucémico postprandial.

A nivel farmacológico, dentro de los inhibidores naturales de esta enzima, existen compuestos de origen bacteriano como la acarbosa, el miglitol y la voglibosa (hemi-sintético) (Naik & Kokil, 2013); son ingredientes activos en medicamentos contra la diabetes tipo II; su utilidad clínica es la corrección de hiperglucemias postprandiales (Llave Gomero, 2008).

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1 Ubicación del sitio experimental

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de bromatología y balanzas del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

3.2 Material biológico

Para esta investigación se evaluaron las hojas de la planta de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) proveniente del estado de Veracruz.

3.3 Materiales, equipos de laboratorio y reactivos empleados

En las Tablas 1, 2 y 3, se presentan los materiales, equipos de laboratorio y reactivos utilizados durante esta investigación.

Tabla 4. Relación de reactivos.

REACTIVOS
Almidón 1%
Solución buffer PH 7
Ácido Dinitrosalicílico
Glucopiranosido (5mmol/L)
α -amilasa (4.5 unidades/ml)
α -glucosidasa (1 unidad/ml)
Agua destilada
Agua potable

Tabla 5. Material.

MATERIAL
Papel aluminio
Tubos de ensaye
Micro espátula
Papel secante
Celdillas
Vaso de precipitado de 50 ml
Vaso de precipitado de 250 ml
Matraz de aforación de 10 ml con tapón de vidrio
Baño maría
Probeta de 25 ml
Probeta de 100 ml
Frascos de plástico
Gradilla
Puntillas

Tabla 6. Equipo.

EQUIPO	MARCA
Colorímetro	KONICA MINOLTA
Espectrofotómetro	GENESYS 10UV
Balanza analítica	Adventurer OHAUS
Parrilla	
Refractómetro	ATAGO PAL-1 Y ATAGO PAL-3
Estufa	
Medidor de PH	HANNA
Micropipeta	
Vortex	Benchmark Research Products (BRP)

3.4 Metodología

Para la realización de las determinaciones de pH, color e inhibición enzimática en esta investigación, se llevó a cabo una separación manual de las hojas de la planta de neem. Una vez obtenida la materia prima, se colocaron en charolitas de aluminio, previamente pesadas (como se observa en la Figura 6) hasta obtener 1 gramo y utilizarlo para la preparación de infusiones, las cuales se prepararon cada una en 200 ml de agua potable.



Figura 6. Hojas de neem en fresco.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 7, el proceso de deshidratación de las hojas se llevó a cabo en una estufa de secado por gravedad a 60°C por 24 horas para la eliminación del agua contenida en las mismas.



Figura 7. Hojas de neem en el proceso de deshidratación.

Transcurrido el tiempo establecido, se tomó registro del peso de la materia prima en la charola y se continuó con el procedimiento correspondiente para la realización de las infusiones.

Una vez preparadas las infusiones con los dos tipos de hojas (frescas y deshidratadas) se colocaron en envases de plástico (previamente identificados) y se realizó un análisis fisicoquímico a cada infusión registrando su pH, color y contenido de sólidos solubles totales (SST).

3.4.1. Determinación de pH

Se colocó cada muestra en vasos de precipitado de 250ml para posteriormente realizar esta determinación mediante un potenciómetro (Hanna) previamente calibrado.

Se realizó la lectura del pH en cada extracto (de hojas frescas y hojas deshidratadas) y se registraron los datos obtenidos. Después de cada lectura se enjuagó el potenciómetro con agua destilada (Figura 8).

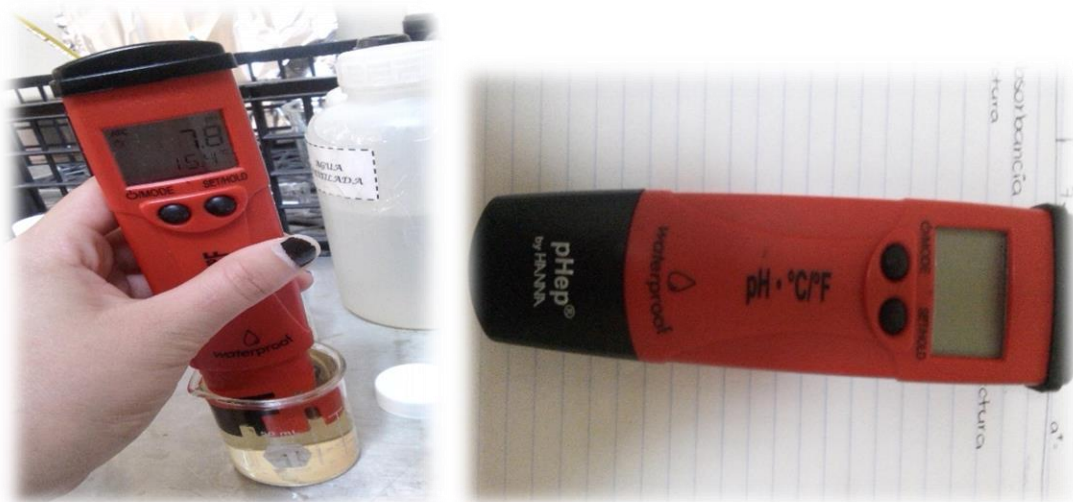


Figura 8. Potenciómetro (Hanna) utilizado en esta determinación.

3.4.2 Determinación de SST

En esta determinación se utilizó un refractómetro (ATAGO, Pocket PAL-1) previamente calibrado con agua destilada y lectura a cero (Figura 9). Posteriormente se colocó la

cantidad suficiente de cada muestra para cubrir el campo de lectura (por separado) y se registraron los datos obtenidos. Entre cada lectura el refractómetro se enjuagó con agua destilada y se secó el exceso de agua con papel secante.

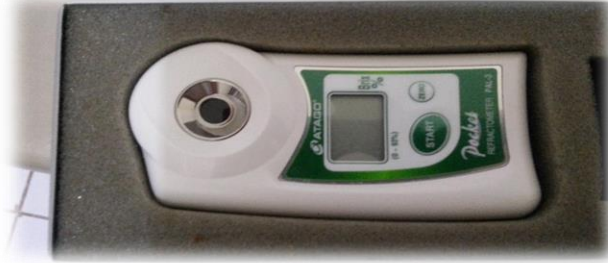


Figura 9. Refractómetro utilizado en esta determinación.

3.4.3 Determinación de color

Se colocaron las muestras en vasos de precipitado de 250ml. Para esta determinación se utilizó un colorímetro (KONICA MINOLTA) previamente calibrado con su blanco correspondiente (Figura 10).

Se registran los datos obtenidos de L^* , a^* y b^* ; entre cada lectura se enjuaga con agua destilada y con papel secante se quita el exceso de agua en el campo de lectura.



Figura 10. Colorímetro (KONICA MINOLTA) utilizado en esta prueba.

3.4.4. Preparación de reactivos

3.4.4.1 Almidón 1%

Se pesaron 0.1063gr de almidón en una charolita de aluminio (previamente pesada) en la balanza analítica y se registró el peso obtenido.

Posteriormente se colocó en un matraz de aforación de 10 ml y se aforó con agua destilada para después ponerse en un envase de plástico previamente identificado como se puede observar en la Figura 11.



Figura 11. Reactivo de almidón al 1% utilizado.

3.4.4.2 D-Glucopiranosido

Se pesaron 0.0150gr de glucopiranosido en una charolita de aluminio (previamente pesada) en la balanza analítica y se registró el peso obtenido.

Se colocó en un matraz de aforación de 10 ml y se aforó con agua destilada para después colocarse en un envase de plástico previamente identificado (Figura 12).



Figura 12. Reactivo de glucopiranosido utilizado.

3.4.4.3 α -amilasa

Se pesaron 0.0016gr de la enzima α -amilasa en una charolita de aluminio, previamente pesada en la balanza analítica y se registró el peso obtenido.

Se colocó en un matraz de aforación de 10 ml y se aforó con agua destilada para después ponerse en un envase de plástico previamente identificado.

3.4.4.4 α -glucosidasa

Se pesaron los gramos equivalentes a 10 unidades de la enzima α -glucosidasa en una charolita de aluminio, previamente pesada en la balanza analítica y se registró el peso obtenido.

Se colocó en un matraz de aforación de 10 ml y se aforó con agua destilada para después ponerse en un envase de plástico previamente identificado.

3.5 Determinación de inhibición de α -amilasa

Para esta determinación enzimática se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se colocaron los tubos de ensaye uno por cada extracto obtenido, en la gradilla y a cada uno se le agregaron 100 μ l de extracto, 100 μ l de buffer pH 7, 100 μ l de α -amilasa (pre-incubada en agua a 25°C por 10 minutos), así como 100 μ l de almidón al 1%; posteriormente se homogenizaron con ayuda de un vortex.

Como se muestra en la Figura 13; se prepararon de igual manera los controles (utilizando agua destilada en vez de extracto) y el blanco (utilizando solución buffer pH 7 en lugar de extracto y añadiendo la α -amilasa en el minuto 4 de la incubación).



Figura 13. Muestras, control y blanco de α -amilasa.

Teniendo las muestras, los controles y el blanco listos se incubaron en agua a 25°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo establecido se les añadieron 1000µl de ácido dinitrosalicílico (DNS) a cada tubo de ensaye y posteriormente se homogenizaron con ayuda del vortex.

Se colocaron en un baño maría por 5 minutos, (en el minuto 4 se le agregó al blanco la α-amilasa); se llevaron a temperatura ambiente, enseguida se les agregaron 5.6ml de agua destilada y se homogenizaron con ayuda del vortex. Finalmente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm, previamente calibrado con el blanco correspondiente.

Registradas las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro se realizaron los cálculos correspondientes, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \right] \times 100$$

3.6 Determinación de la inhibición de α-glucosidasa

Para esta determinación enzimática se cumplió con el siguiente procedimiento:

Se colocó un tubo de ensaye por cada extracto obtenido en la gradilla, se les agregó 100µl de extracto, 100µl de solución buffer pH 7, y 100µl de α-glucosidasa; se homogenizaron con ayuda de un vortex como se muestra en la Figura 14.

Se prepararon de igual manera los controles (utilizando agua destilada en lugar de extracto) y el blanco (utilizando solución buffer pH 7 en lugar de extracto y añadiendo la α-glucosidasa en el minuto 9 de la incubación).



Figura 14. Muestras, control y blanco de α -glucosidasa.

Posteriormente se llevaron a incubación a 25°C por 5 minutos. Se les añadió 100 μ l de D-glucopiranosido y se homogenizaron de nuevo. Enseguida se llevaron a una incubación de 25°C por 10 minutos (en el minuto 9 se le agregó al blanco la α -glucosidasa).

Transcurrido el tiempo establecido finalmente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 405 nm, previamente calibrado con el blanco correspondiente.

Se realizaron los cálculos correspondientes con los datos obtenidos, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \right] \times 100$$

3.7. Análisis estadístico

Para esta investigación, se determinó la media aritmética \pm desviación estándar de las determinaciones fisicoquímicas: pH, sólidos solubles totales (SST) y color de las hojas de neem en fresco y deshidratado, así como para el porcentaje de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa mediante un diseño experimental completamente al azar. Los resultados obtenidos se compararon por medio del análisis de varianza (ANOVA) con una prueba de medias por el método Tukey, en variables con distribución normal. Las diferencias estadísticas demostraron un 95% de confianza en los datos obtenidos.

Capítulo 4

4.1 Resultados y Discusión

4.1.1 Determinaciones físico-químicas

4.1.1.1 Determinación de pH

Los resultados obtenidos para la variable pH y analizados mediante el análisis de varianza (Anexo 1) no presentan diferencia significativa entre los extractos obtenidos de hojas de neem frescas y hojas de neem deshidratadas, como puede observarse en la Figura 15.

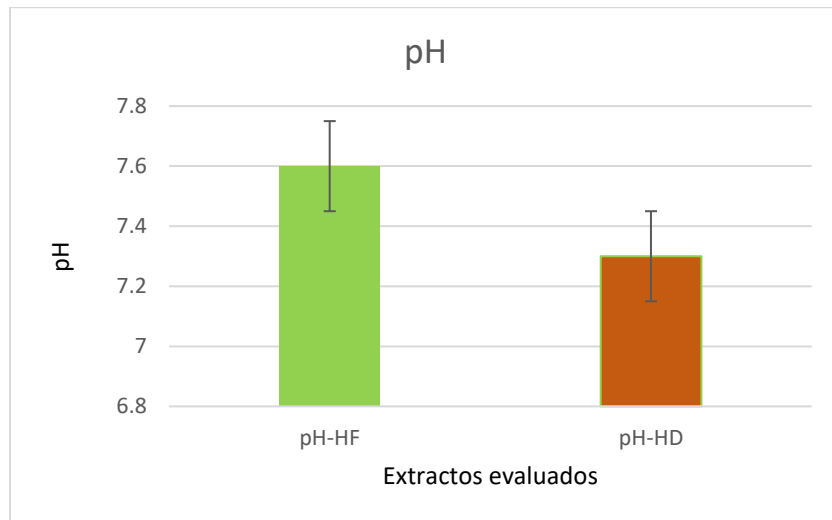


Figura 15. Comparativo de pH entre hojas de neem frescas y deshidratadas.

4.1.1.2 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

De acuerdo al análisis de varianza para esta variable (Anexo 2), los datos obtenidos no presentan diferencia significativa entre los SST encontrados en los extractos preparados con las hojas de neem frescas y las hojas de neem deshidratadas (Figura 16).

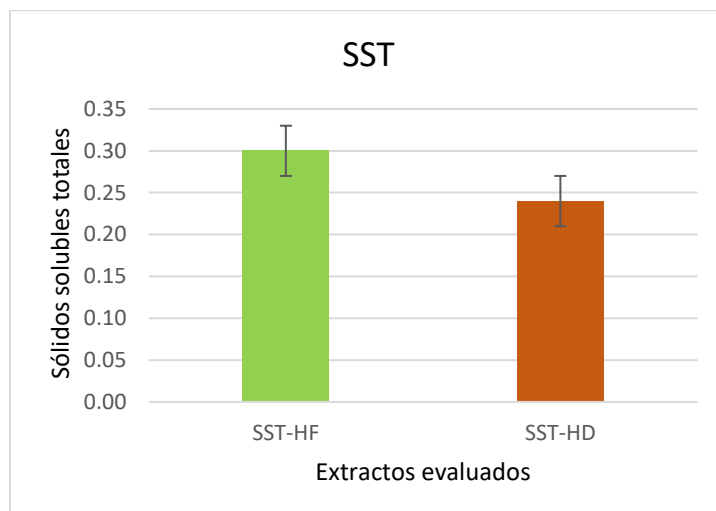


Figura 16. Comparativo de SST entre hojas de neem frescas y deshidratadas.

4.1.1.3 Determinación de color

El análisis de varianza, ubicado en el Anexo 3 y la prueba de medias de Tukey realizadas, dan como resultado que no existe diferencia estadística significativa entre el color de ambos extractos, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores promedio para la variable color (L^* , a^* , b^*) en los extractos de hojas de neem.

Tratamiento	L^*	a^*	b^*
Extractos evaluados de hojas frescas	25.364a	4.314a	4.470a
Extractos evaluados de hojas deshidratadas	22.252a	4.426a	5.968a

De acuerdo a la Tabla 7, se puede observar que aún y cuando no existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la variable L^* , el extracto proveniente de hojas frescas de neem es 3 puntos más brillante que el extracto de hojas secas; en relación a las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* , el extracto acuoso elaborado a partir de hojas secas de neem presentan un color con mayor saturación de rojo y amarillo en comparación con el otro tratamiento.

4.2. Determinación del índice de inhibición

4.2.1 Índice de inhibición de α -amilasa

En la Figura 17 se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado y la prueba de medias, (Anexo 4) los cuales establecen una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos para la inhibición de α -amilasa.

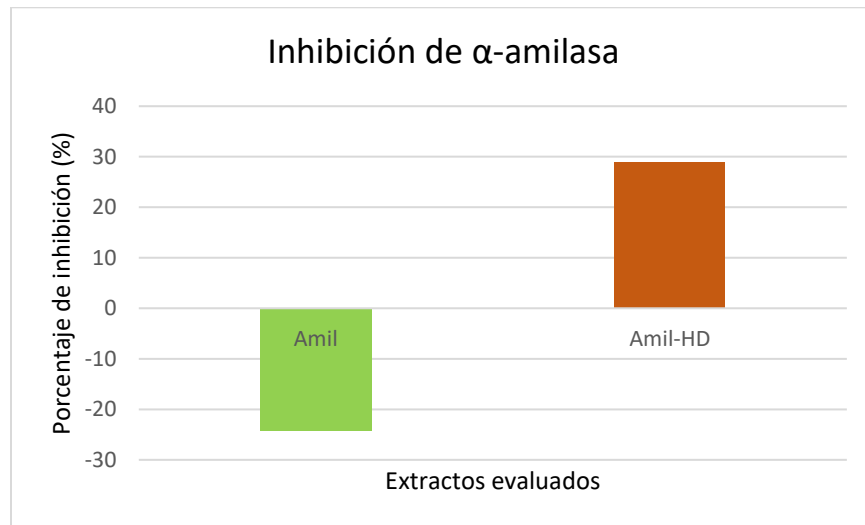


Figura 17. Comparativo del índice de inhibición de α -amilasa entre hojas de neem frescas y deshidratadas.

Como se muestra en la gráfica de barras de la Figura 17, los extractos preparados con la hoja fresca de neem tienen un efecto negativo en la inhibición de la enzima α -amilasa. Por el contrario, las hojas deshidratadas de neem presentan una inhibición positiva de esta enzima del 28.88%, esto puede deberse a que los extractos provenientes de plantas deshidratadas poseen características hipoglucemiantes.

De acuerdo a (Kazeem, et al., 2013), el extracto acuoso de hoja de morinda tiene una capacidad inhibidora de un 80% sobre la enzima α -amilasa, que comparado con extractos acetónicos y etanólicos de la misma planta brinda un mejor efecto de inhibición; (Abirami , et al., 2014), encontraron que la actividad inhibitoria de esta enzima por parte de jugos frescos de cítricos nativos, fue de un 75.5-79.9%.

Por lo tanto, los resultados encontrados en esta investigación, aún y cuando presentan menor porcentaje de inhibición, permiten establecer que los extractos acuosos de neem deshidratado producen un efecto hipoglucemiante al igual que los de morinda y de jugos frescos de cítricos.

4.2.2. Índice de inhibición de α -glucosidasa

Mediante el análisis estadístico de varianza (Anexo 5), se pudo determinar que sí existe diferencia significativa en la inhibición de α -glucosidasa entre los extractos acuosos de hojas de neem frescas y deshidratadas, lo cual puede observarse en la Figura 18.

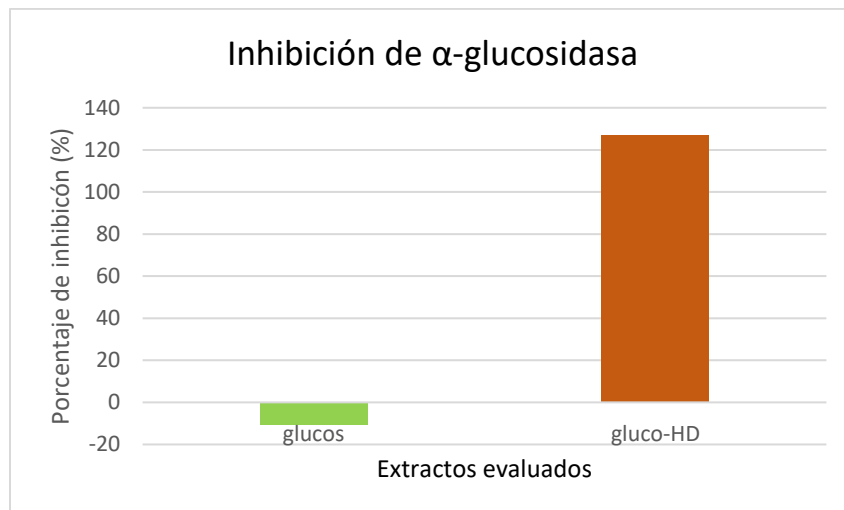


Figura 18. Comparativo del índice de inhibición de α -glucosidasa entre hojas de neem frescas y deshidratadas.

Como se observa en la Figura 18, los extractos preparados con hojas frescas presentan un notable efecto negativo ante la inhibición de la enzima α -glucosidasa; por lo contrario, los extractos preparados con hojas secas presentaron una favorable inhibición de esta enzima mayor al 100 por ciento.

En el año 2008, (Subramanian, et al., 2008) reportó que el extracto etanólico de *Andrographis paniculata* presentó efecto inhibidor de α -glucosidasa de una manera dependiente de la concentración, siendo 17.2 mg/ml la mejor de ellas, en un estudio

realizado a ratas diabéticas; los datos reportados son inferiores a la actividad de inhibición de α -glucosidasa de esta investigación. Para (Kazeem, et al., 2013), la inhibición de la enzima α -glucosidasa se puede tomar como un mecanismo para la reducción de glucosa en la sangre y con esto generar un tratamiento alternativo para las personas con Diabetes efectivo a partir de productos naturales.

Por lo tanto, la inhibición de esta enzima puede ser uno de los mecanismos de acción para que el extracto acuoso de hojas de neem deshidratadas presente actividad antidiabética y pueda considerarse con potencial para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo II.

Capítulo 5

5.1. Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos determinar que los extractos acuosos de las hojas deshidratadas de neem, poseen un efecto inhibitor en las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa lo que permite establecer su potencial como producto alternativo para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo II.

Capítulo 6

Bibliografía

Ramírez Sotelo, M. G., Castañeda Martínez, A. T. & Piña Guzmán, A. B., 2011. Un tratamiento natural para la diabetes. Issue 27, pp. 7-15.

Vargas López, J. M. y otros, 2008. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LAS SEMILLAS DEL ÁRBOL DE NEEM SOBRE EL DESARROLLO DE LARVAS DE *Aedes Aegypti*. *EPISTEMUS, ciencia, tecnología y salud*, Issue 4, pp. 6-12.

Abirami, A., Nagarani, G. & Siddhuraju, P., 2014. "In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from citrus hystrix and *C. maxima* fruits". *Food Science and human wellness*.

Andrea Guadarrama, Orozco, J. & Morales, M., 2017. OBTENCIÓN DE α -amilasa A PARTIR DE *Aspergillus oryzae*.

Aviles, A., 2014. *Actividad enzimática de la alfa-amilasa salival*, México, D.F.: s.n.

Bailey, C. J. & Day, C., 1989. Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care*, 12(8), pp. 553-564.

Barrabí-Puertal, M. & Arece-García, J., 2013. Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. *Salud Animal*, 35(2).

Biochem, A. J. & Biotech, 2008. The Antidiabetic Efficacy of Combined Extracts from Two Continental Plants: *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) and *Vernonia amygdalina* (Del.) (African Bitter Leaf). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), pp. 239-244.

Biswas, K., Chattopadhyay, I., K. Banerjee, R. & Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current science*, 82(11), pp. 1336-1345.

Conrick, J., 2001. *Neem: the ultimate herb*. Wisconsin, USA.: s.n.

Cruz, F. M. & Del Angel, S. R., 2004. *El árbol de nim, establecimiento y aprovechamiento en la hasteca potosina*. s.l.:s.n.

Cruz, N. M. S. & Zacarías Castillo, R., 2002. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Medicina Interna*, 5(1 y 2), pp. 33-41.

Dorado, J. P. H., 2008. Diabetes mellitus tipo 1. *Revista de la sociedad boliviana de pediatría*, 47(2).

Ebong, P. E., Item, J. A., Eyong, U. E. & Godwin, E. E., 2008. The Antidiabetic Efficacy of Combined Extracts from Two Continental Plants: *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) and *Vernonia amygdalina* (Del.) (African Bitter Leaf). *Science publication*, 4(3), pp. 239-244.

F.M, C. & del Angel S., R., 2004. *El árbol de Nim, Establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina*, San Luis Potosí, México: s.n.

- Fernández, M. C., 1998. *DINAMICA DE LA AZADIRACTINA EN ARBOLES DE NIM (Azadirachta indica A. Juss) DE MEXICO Y SU EFECTO CONTRA DOS INSECTOS DE ALMACEN*. Nuevo, León: s.n.
- FJ, L. G., 2008. Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en Atención Primaria. *Medicina de Familia*, 8(2).
- Franklin, B., 2017. *Las enzimas*, s.l.: s.n.
- Gómez, M. B. D., 2003. Medicina occidental y otras alternativas: ¿es posible su complementariedad? Reflexiones conceptuales. 19(2), pp. 635-643.
- González, E. d. O., Carrillo Pérez, M. & Aguilera Gumpert, S., 2008. Actualización del tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2. 32(3-16).
- González, M. S., Marquez, A. A., Meléndez, C. E. & López Ortega, A., 2010. Nim y Diabetes mellitus. *Gaceta de ciencias veterinarias*, 15(2), pp. 64-71.
- HE, L., 1998. ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORS AS AGENTS IN THE TREATMENT OF DIABETES. *Glucobay*, 6(2), pp. 132-145.
- Jiménez, A., 2013. Diabetes mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones para su prevención y control. Volumen 55.
- Kazeem, M. I., Adamson, J. O. & Ogunwande, I. A., 2013. "Modes of inhibition of amilase and glucosidase by aqueous extract of Morinda lucida Benth leaf". *Bio Med Research International*.
- Klein, G. y otros, 2007. Antidiabetes and anti-obesity activity of Lagerstroemia speciosa.. Volumen 4, pp. 401-407.
- Koshla, P. y otros, 2000. A STUDY OF HYPOGLYCAMIC EFFECTS OF AZADIRACHTA INDICA (NEEM) IN NORMAL AND ALLOXAN DIABETIC RABBITS.. Volumen 1, p. 44.
- Kreig, M. B., 1970. *Medicina Verde. La búsqueda de plantas que curan..* segunda ed. México: Continental S.A..
- Levobitz, H. E., 1998. Alpha- glucosidase inhibitors as agents in the treatment of Diabetes.
- Lifshitz, A., 2017. *El ejercicio actual de la medicina. Diabetes Mellitus*, s.l.: s.n.
- Llave Gomero, F. J., 2008. Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en atención primaria.
- Massó, F. T. & Escobar Jiménez, F., 2009. *La diabetes mellitus en la practica clínica*. Buenos Aires: panamericana.
- Miguel, M. G. F. S., García Sancho , M. C. & Cobo Abreu, C., 2010. Prevalencia de síntomas de ansiedad y depresión. *Medicina Interna de México*, 26(2).
- M, W. T., Stütz,, A., Tarling,, C. & Withers, , S., 2006. Fine tuning of β -glucosidase inhibitory activity in the 2,5-dideoxy-2,5-imino-Dmannitol (DMDP) system. *Carbohydrate Research*, Volumen 341, pp. 1717-1722.
- Naik, S. & Kokil, G. R., 2013. Development and discovery avenues in bioactive natural products for glycemic novel therapeutics.

Ojeda, R., 2008. Inhibición de la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa a partir de los extractos totales de justicia colorata (nees) wassh (insulina), artocarpus altilis (parkinson) fosberg (fruto del pan) y adiantum poiretti wikstr (culantrillo).. p. 2 y 3.

OMS, 2014. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional*, s.l.: s.n.

OMS, 2016. *Diabetes tipo I*, s.l.: s.n.

OMS, 2017. *Informe mundial sobre la diabetes*, s.l.: s.n.

P. KHOSLA, S. B. J. S. S. A. R. K. S., SANGEETA , . B., SINGH, J. & SETH AN, S., s.f.

R., N. S. & G.R, K., 2013. Development and discovery avenues in bioactive natural products for glycemic novel therapeutics. *Elsevier*, Volumen 39, pp. 431-466.

Raju B. C., y otros, 2010. Alpha glucosidase inhibitory antihyperglycemic. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volumen 18, pp. 358-365.

Roth, R. A., 2009. *Nutrición y dietoterapia*. novena ed. México, D.F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V..

R, S. A. y otros, 2006. Chemical chaperones and permissive temperatures alter the cellular localization of gaucher disease associated glucocerebrosidase variants.. *ACS Chemical Biolog*, Volumen 1, pp. 235-251. .

S., W., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, Volumen 27, pp. 1047-1053.

S., W., 2004. Global prevalence of Diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.

Sawkar, A., Schmitz, M. & Zimmer , K. P., 2006. Chemical chaperones and permissive temperatures alter the cellular localization of gaucher disease associated glucocerebrosidase variants.

Singh, K. K., 2008. *Neem a treatise*. s.l.:I.K. INTERNATIONAL PUBLISHING HOUSE .

Spezial, A. M. T., 2007. DIABETES MELLITUS: PRUEBAS DE LABORATORIO PARA SU DIAGNÓSTICO Y VIGILANCIA MÉDICA. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, pp. 1-37.

Stewart, G. L., 2009. *Revista biomédica MEDWAVE*, 9(12).

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

S, W., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.

Torres, M. A. R., 2005. Diabetes mellitus gestacional. Experiencia en una institución de tercer nivel de atención. *Ginecol Obstet Mex*, 73(9).

Tuomilehto, J., Lindström, J. & Eriksson, J. G., 2001. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *The new england journal of medicine*, pp. 1343-1350.

- T, Y., Watanabe, T., Yamamoto, Y. & Okuyama, M., 2004. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3glucosidic linkage. pp. 189-198.
- Valencia, M. H. & Zárate, A., 2005. Conceptos recientes en la etiopatogenia de la diabetes gestacional. *Revista Médica Mexicana*, 73(7).
- Van de Laar, F. A., 2009. "Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus". *The Cochrane Library*, Volumen 1.
- Varela, B. R. D., Rivera Chavira, B. & Franco Gallegos, E., 2001. Apego al tratamiento farmacológico en pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. *Salud Pública de México*, 43(3).
- Wild, S., 2004. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030.
- Wrodnigg, T., Stuts, A. E. & Tarling, C. A., 2006. Fine tuning of beta-glucosidase inhibitory activity in the 2,5-dixeoxy-2,5-imino-Dmannitol (DMDP) system.
- Yamamoto, T., Watambe, T. & Yamamoto, Y., 2004. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* alpha-glucosidase having regioselectivity for alpha-1,3glucosidic linkage.

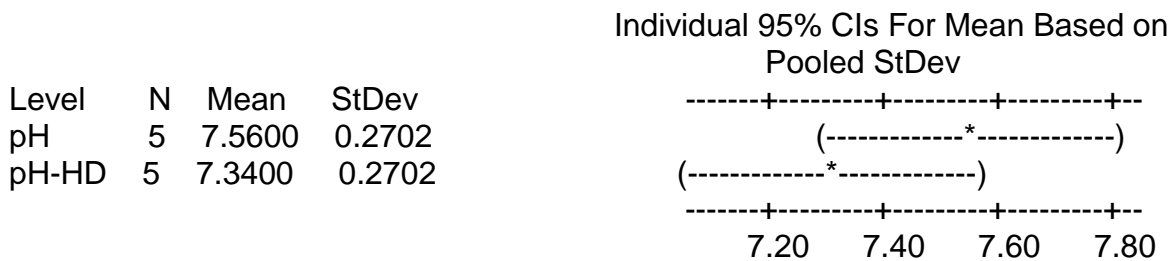
Capítulo 7

Anexos

7.1. Anexo 1: Análisis estadístico para pH

Source	DF	SS	MS	F	P
pH	1	0.1210	0.1210	1.66	0.234
Error	8	0.5840	0.0730		
Total	9	0.7050			

S = 0.2702 R-Sq = 17.16% R-Sq(adj) = 6.81%



Pooled StDev = 0.2702

Prueba Tukey

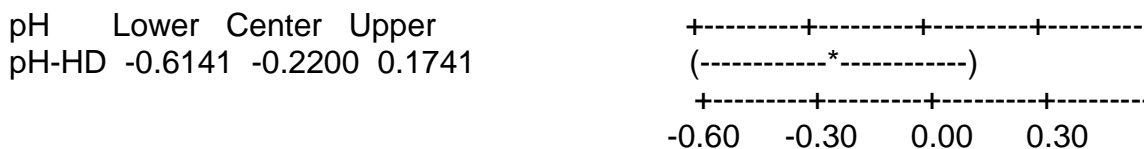
Grouping Information Using Tukey Method

pH	N	Mean	Grouping
pH	5	7.5600	A
pH-HD	5	7.3400	A

Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

All Pairwise Comparisons among Levels of pH

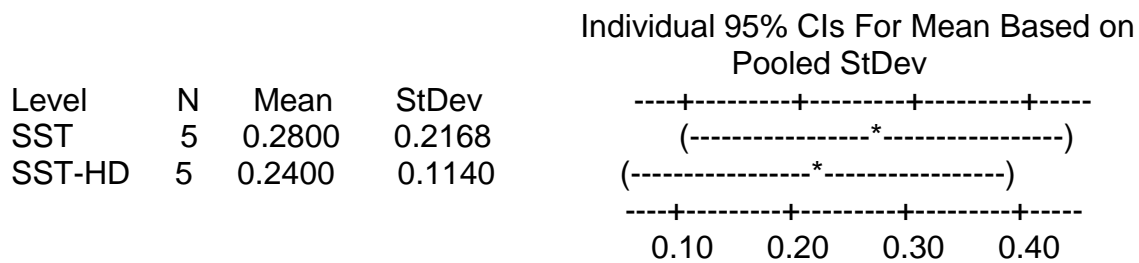
Individual confidence level = 95.00%
pH = pH subtracted from:



7.2. Anexo 2: Análisis estadístico para sólidos solubles totales

Source	DF	SS	MS	F	P
SST	1	0.0040	0.0040	0.13	0.724
Error	8	0.2400	0.0300		
Total	9	0.2440			

S = 0.1732 R-Sq = 1.64% R-Sq(adj) = 0.00%



Pooled StDev = 0.1732

Prueba Tukey

Grouping Information Using Tukey Method

SST	N	Mean	Grouping
SST	5	0.2800	A
SST-HD	5	0.2400	A

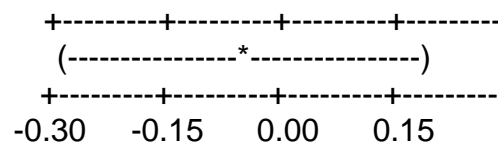
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of SST

Individual confidence level = 95.00%

SST = SST subtracted from:

SST	Lower	Center	Upper
SST-HD	-0.2926	-0.0400	0.2126



7.3. Anexo 3: Análisis estadístico de las variables del color (L*, a* y b*)

7.3.1. Variable L*

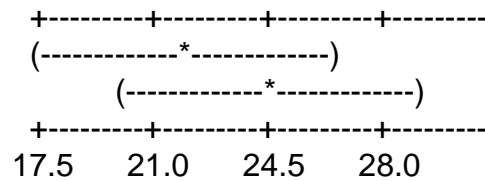
Source	DF	SS	MS	F	P
Color	1	24.2	24.2	1.08	0.330
Error	8	179.9	22.5		
Total	9	204.1			

S = 4.742 R-Sq = 11.86% R-Sq(adj) = 0.85%

StDev

Level	N	Mean	StDev
Color-HD	5	22.252	2.874
Color-HF	5	25.364	6.059

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled



Pooled StDev = 4.742

Prueba Tukey

Grouping Information Using Tukey Method

Color	N	Mean	Grouping
Color-HF	5	25.364	A
Color-HD	5	22.252	A

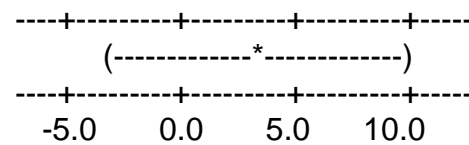
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Color

Individual confidence level = 95.00%

Color = Color-HD subtracted from:

Color	Lower	Center	Upper
Color-HF	-3.804	3.112	10.028



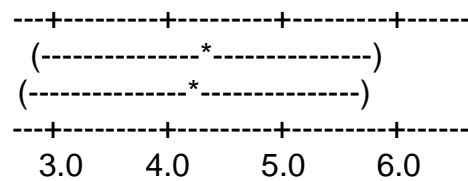
7.3.2. Variable a*

Source	DF	SS	MS	F	P
Color	1	0.03	0.03	0.01	0.911
Error	8	19.01	2.38		
Total	9	19.05			

S = 1.542 R-Sq = 0.16% R-Sq(adj) = 0.00%

Level	N	Mean	StDev
Color-HD	5	4.426	1.218
Color-HF	5	4.314	1.808

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev



Pooled StDev = 1.542

Prueba Tukey

Grouping Information Using Tukey Method

Color	N	Mean	Grouping
Color-HD	5	4.426	A
Color-HF	5	4.314	A

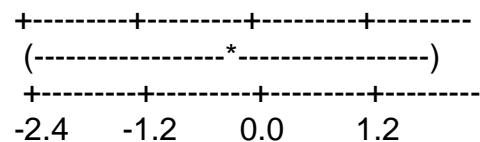
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Color

Individual confidence level = 95.00%

Color = Color-HD subtracted from:

Color	Lower	Center	Upper
Color-HF	-2.360	-0.112	2.136

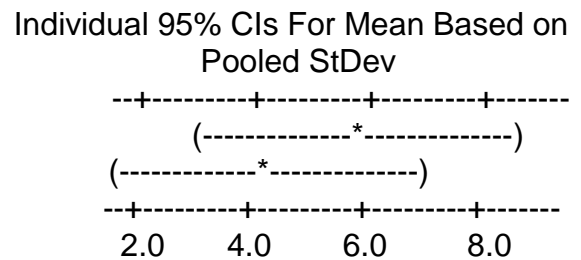


7.3.3. Variable b*

Source	DF	SS	MS	F	P
Color	1	5.61	5.61	0.69	0.430
Error	8	65.03	8.13		
Total	9	70.64			

S = 2.851 R-Sq = 7.94% R-Sq(adj) = 0.00%

Level	N	Mean	StDev
Color-HD	5	5.968	1.538
Color-HF	5	4.470	3.727



Pooled StDev = 2.851

Prueba Tukey

Grouping Information Using Tukey Method

Color	N	Mean	Grouping
Color-HD	5	5.968	A
Color-HF	5	4.470	A

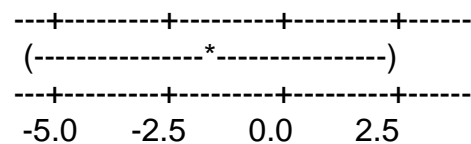
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Color

Individual confidence level = 95.00%

Color = Color-HD subtracted from:

Color	Lower	Center	Upper
Color-HF	-5.656	-1.498	2.660

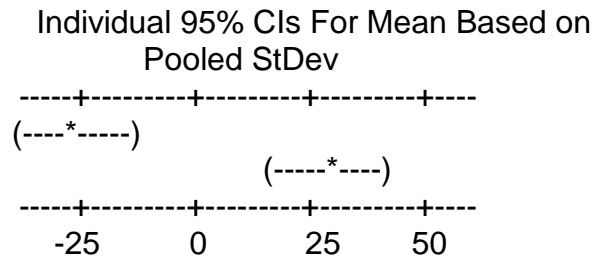


7.4. Anexo 4: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de α -amilasa

Source	DF	SS	MS	F	P
A-Amil	1	7069	7069	36.56	0.000
Error	8	1547	193		
Total	9	8616			

S = 13.91 R-Sq = 82.05% R-Sq(adj) = 79.80%

Level	N	Mean	StDev
Amil	5	-24.29	12.98
Amil-HD	5	28.89	14.78



Pooled StDev = 13.91

Prueba Tukey

Grouping Information Using Tukey Method

A-Amil	N	Mean	Grouping
Amil-HD	5	28.89	A
Amil	5	-24.29	B

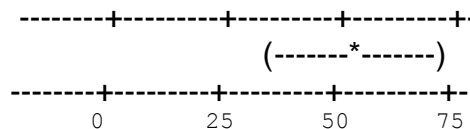
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of A-Amil

Individual confidence level = 95.00%

A-Amil = Amil subtracted from:

A-Amil	Lower	Center	Upper
Amil-HD	32.89	53.17	73.46



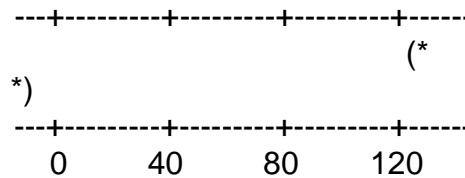
7.5. Anexo 5: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de α -glucosidasa

Source	DF	SS	MS	F	P
A-Gluc	1	42153.98	42153.98	12519.06	0.000
Error	7	23.57	3.37		
Total	8	42177.55			

S = 1.835 R-Sq = 99.94% R-Sq(adj) = 99.94%

Level	N	Mean	StDev
gluco-HD	4	126.87	2.11
glucos	5	-10.86	1.60

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev



Pooled StDev = 1.83

Prueba Tukey

Grouping Information Using Tukey Method

A-Gluc	N	Mean	Grouping
gluco-HD	4	126.87	A
glucos	5	-10.86	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of A-Gluc

Individual confidence level = 95.00%

A-Gluc = glucos subtracted from:

A-Gluc	Lower	Center	Upper
glucos	-140.64	-137.73	-134.82

