



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO EN QUÍMICA DE MEDICAMENTOS
OPCIÓN SÍNTESIS DE MEDICAMENTOS**



**Estudio mecanístico *in vitro* de la reacción de glucación
no enzimática de la hemoglobina con edulcorantes**

Tesis Doctoral

Licda. Johanna Peña Molina

Tutor: PhD. Herminia Gil Matos

**Mérida - Venezuela
Febrero, 2015**

ARTÍCULO CIENTÍFICO GENERADO DE PARTE DE LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

Peña, J., Gil, H. (2014). Effect of buffer phosphate in the reaction of hemoglobin with fructose. *Avances en Química*, 9(2), 49-53.

PROYECTOS APROBADOS

Proyecto con el Vicerectorado Académico. Programa de Formación de Personal e Intercambio Científico. (Plan II).

Título: Efecto de los edulcorantes sobre las complicaciones de la diabetes y el envejecimiento.

Responsable: Prof. Herminia Gil

Corresponsable: Johanna Peña

Aprobado: Mayo 2011

Culminado: Mayo 2013

www.bdigital.ula.ve

Dedicado con mucho amor a
Mis padres Elvira y Luis

AGRADECIMIENTOS

Cuando ya se está en este punto de un trabajo de tantos años de esfuerzo y dedicación quisiera agradecer:

A Dios todopoderoso y a nuestra madre celestial por guiarme e iluminarme por este largo camino lleno de fe y esperanza.

A mis padres, ejemplares que continúan apoyándome para alcanzar mis metas este triunfo es de ustedes.

A mis abuelos, Toto, Jesús, Isidra y Elisa quienes desde el cielo me siguen cuidando.

A mi hermanos Luis Miguel, Yamily y Wilmer quienes han estado conmigo ayudándome en cada sueño gracias.

A mi sobrina Paolita quien en medio de rizas y tremenduras este triunfo le sirva de ejemplo.

A la Prof. Herminia Gil, Gracias por brindarme la oportunidad de continuar con sus proyectos de investigación, ser la guía intelectual y facilitarme las herramientas necesarias para cumplir esta nueva meta.

A mi grupo de Laboratorio de Fisicoquímica Orgánica: Prof. Jorge Uzcategui, Licdo. Ali Sulbaran, Kati, Yasselys, Yesenia, Eveleidy, Aicha, Nicolas, Victor por colaboración y compañía.

Al Laboratorio Regional De Servicio Analíticos (LaRSA): Prof. Xiomara Romero, Licdo. William Velásquez, TSU. Karina Zavala y Ciro Rodríguez por su inmensa amistad y colaboración.

A todos los profesores del Postgrado en Química de Medicamentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por orientarme y brindarme sus conocimientos.

A los profesores de la Facultad de Ciencias: Prof. Ali Bahasa, Andrés Abad por seguir guiándome y orientarme a lo largo de este trabajo.

A Dra. Marcela Torres por ser una gran amiga, compañera y siempre darme ánimos en los momentos más difíciles de esta tesis.

Al Grupo del Laboratorio de Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencia Forestales y Ambientales por su colaboración prestada en la donación de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Al Prof. Pablo Meléndez del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por su colaboración en la identificación de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Al Dr. Alfredo Usubillaga del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por su colaboración en la donación de un reactivo importante.

Al Programa de Formación de Personal e Intercambio Científico. (Plan II), por el financiamiento de parte de este Postgrado.

Al Laboratorio de Genética y Química Celular por su colaboración prestada en la esterilización del material utilizado en este trabajo.

Al Laboratorio Microbiología de Microorganismos "SIXTO DAVID ROJO" por su colaboración prestada en la liofilización del extracto acuoso de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

A mis compañeros del Postgrado en Química de Medicamentos: Nicolás, Lucero Billmary, Patricia, Marietta por su amistad.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para que este trabajo se hiciera posible gracias.

Johanna

v

Johanna E. Peña M.

RESUMEN

La glucación no enzimática es una reacción que sufren las proteínas por medio de la unión covalente entre azúcares reductores simples y grupos amino libres de las proteínas, para formar estructuras cíclicas complejas sin la participación de la enzima. Esta reacción se encuentra relacionada con el desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer y el normal envejecimiento. El paso inicial de la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina es la formación de la base Schiff, produciéndose un reordenamiento de Amadori, para dar finalmente una cetoamida (hemoglobina glucada HbA_{1C}). La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Esto implica que sea este azúcar el considerado generalmente en las reacciones de glucación no enzimática de interés biológico. Sin embargo, cualquier azúcar que posea un grupo carbonilo libre puede reaccionar con los grupos aminos primarios de las proteínas para formar la base Schiff. La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo. Las moléculas de azúcar consiguen estabilizarse a través de un equilibrio entre la forma abierta y por lo menos dos formas cerradas (anómeros cíclicos) en las que el grupo carbonilo ha desaparecido. En el estudio de la hidrólisis ácida para el edulcorante con sucralosa comercial y sucralosa pura realizado al variar la concentración de ácido clorhídrico entre 2-8 N a 37°C, no se encontró ninguna variación en las rotaciones óptica observadas, lo cual confirma que dichos edulcorantes no presenta hidrólisis bajo estas condiciones de reacción. Se prepararon mezclas de reacción con varios azúcares o edulcorante utilizando las siguientes concentraciones; para sacarosa, sucralosa y fructosa de 40 mM y la hemoglobina a $9,3 \times 10^{-2}$ mM. Las concentraciones del buffer fosfato fueron variadas entre 1-8 mM permaneciendo esta mezcla de reacción por tres días para la fructosa y por 28 días para los demás azúcares a 37°C y pH 7,30. La hemoglobina glucada (HbA_{1C}) formada, fue separada por cromatografía de intercambio iónico (Teco Diagnostic) y cuantificada espectroscópicamente a 415 nm. Se encontró que la fructosa es catalizada por el buffer fosfato. La constante catalítica (k_B) para la fructosa es siete veces más rápida que la de glucosa y la reacción espontánea (k_0) para la fructosa es nueve veces más grande que la de glucosa bajo las mismas condiciones de reacción para los demás azúcares las constantes de velocidad no superaron la reportada para la glucosa, resultado que sugiere una reacción

de hidrólisis muy lenta. Además no se encontró efecto isotópico de solvente para ninguno de los azúcares en estudio. La reacción con el liofilizado de *Stevia rebaudiana* a concentraciones entre (5, 10, 20) mg/mL, la glucosa a 40 mM, el buffer fosfato 4,8 mM y la hemoglobina $9,3 \times 10^{-2}$ mM, bajo las mismas condiciones de reacción que el caso anterior, presentó un efecto inhibitorio sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina *in vitro* y, además podría ser de valor terapéutico en el tratamiento de la diabetes, ya que las constantes de velocidad para la reacción disminuyen en presencia de la especie vegetal, y con el aumento de la concentración de la misma. Observando también que los valores obtenidos para la concentración de la glucosa total disminuyen al aumentar la concentración de la *Stevia rebaudiana*, lo que es indicativo de la actividad hipoglicemiante que presenta la planta.

www.bdigital.ula.ve

ABSTRACT

Nonenzymatic glycation is a reaction experienced by proteins by simple covalent linkage between reducing sugars and free amino groups of proteins to form complex ring structures without involving the enzyme. This reaction are related to the development of secondary complications of diabetes mellitus, Alzheimer's disease and normal aging. The initial step of the reaction of nonenzymatic glycation of hemoglobin is the Schiff base formation, producing an Amadori rearrangement, to finally give a ketoamide (glycated hemoglobin HbA_{1C}). Glucose is the most abundant in the body reducing sugar. This implies that this sugar is generally considered in the non-enzymatic glycation reactions of biological interest. No clutch, any sugar possessing a free carbonyl group can react with the primary amino groups of proteins to form a Schiff base. The reactivity of the different sugars is given by the availability of its carbonyl group. Sugar molecules get stabilized by a balance between the open form and at least two closed forms (cyclic anomers) in which the carbonyl group has disappeared. In the study of the acid hydrolysis to the commercial sweetener sucralose and sucralose pure performed by varying the concentration of hydrochloric acid at 2-8 N at 37 °C, no variation was found in the observed optical, which confirms that these sweeteners no hydrolysis under these reaction conditions. Reaction mixtures were prepared with various sugars or sweetener using the following concentrations; 40 mM for sucrose, sucralose and fructose and $9,3 \times 10^{-2}$ mM hemoglobin were prepared. Phosphate buffer concentrations were varied between 1-8 mM remaining this reaction mixture for three days for fructose and 28 days for all other sugars at 37 °C and pH 7,30. The glycated hemoglobin (HbA_{1C}) formed was separated by ion exchange chromatography (Teco Diagnostic) and quantified spectrophotometrically at 415 nm. It was found that fructose is catalyzed by the phosphate buffer. The catalytic constant (k_B) for fructose is seven times faster than glucose and spontaneous reaction (k_0) for fructose is nine times larger than that of glucose under same reaction conditions other sugars rate constants did not exceed that reported for glucose, result suggesting of slow hydrolysis reaction. Also not isotopic solvent effect for any of the sugars found in study. Reaction with Stevia rebaudiana lyophilized at concentrations between (5, 10, 20) mg/mL, 40 mM glucose, 4.8 mM phosphate buffer and $9,3 \times 10^{-2}$ mM hemoglobin under the same conditions reaction above, showed an inhibitory effect on the non-enzymatic

glycation of the hemoglobin in vitro and in addition may be of therapeutic value in the treatment of diabetes, because the rate constants for the reaction decreases in the presence of the species plant, and with the increase in concentration thereof. Noting also that the values obtained for the total glucose concentration decrease with increasing concentration of *Stevia rebaudiana*, which is indicative of the hypoglycemic activity with the plant.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	vi
Abstract	viii
Índice general	x
Abreviaturas y símbolos	xii
Índice de ecuaciones	xvi
Índice de esquemas	xvii
Índice de figuras	xviii
Índice de gráficos	xix
Índice de tablas	xxi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
II.1 La diabetes mellitus	3
II.1.1 Clasificación de la diabetes mellitus	3
II.1.2 La insulina, biosíntesis y secreción	4
II.2 Glucación no enzimática de las proteínas en la diabetes y otras enfermedades	6
II.3 Reacción de glucación no enzimática de las proteínas	12
II.3.1 Factores que determinan el grado de glucación	14
II.4 Glucación no enzimática de la hemoglobina	15
II.4.1 Cinética de la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina	19
II.4.2 Reactividad de algunos azúcares con la hemoglobina	23
II.4.2.1 La fructosa	25
II.4.2.2 La sacarosa	29
II.4.2.3 La sucralosa	30
II.5 Importancia de las plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes mellitus	33

II.5.1 La <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	35
II.5.2 Ruta biosintética de los principales productos naturales	37
II.5.3 Algunos compuestos aislados de la <i>Stevia rebaudiana</i>	39
II.5.4 Actividades antihiperlipémicas de la <i>Stevia rebaudiana</i>	43
III. Hipótesis	47
IV. Objetivos	48
IV.1 Objetivos generales	48
IV.2 Objetivos específicos	48
V. Metodología	50
V.1 Reactivos	50
V.2 Equipos	51
V.3 Desarrollo experimental	51
V.3.1 Hidrólisis de la sacarosa y sucralosa	51
V.4 Determinación de la reactividad de los edulcorantes fructosa, sacarosa y sucralosa con la hemoglobina	54
V.5 Determinación de la concentración de hemoglobina glucada	55
V.6 Determinación de la constante cinética	56
V.7 Metodología para observar la efectividad de la especie <i>S. rebaudiana</i> en la disminución de la glucosa y posible inhibición en la reacción	58
V.7.1 Recolección de la planta	58
V.7.2 Obtención del extracto acuoso	58
V.7.3 Liofilización del extracto acuoso	59
V.7.4 Reactividad de la especie <i>S. rebaudiana</i> con la hemoglobina	59
V.7.5 Evaluación de la inhibición de la glucación no enzimática de la hemoglobina	60
V.7.6 Evaluación de la disminución de la glucosa	60
VI. Resultados y discusión	61
VI.1 Pruebas de la hidrólisis ácida para la sacarosa, edulcorante con sucralosa comercial y sucralosa pura	61
VI.1.1 Hidrólisis ácida para la sacarosa	62
VI.1.2 Hidrólisis ácida del edulcorante con sucralosa comercial	69

VI.1.3 Hidrólisis ácida con sucralosa	72
VI.2 Constantes cinéticas obtenidas para los edulcorantes a diferentes concentraciones de buffer fosfato	74
VI.2.1 Constantes cinéticas con fructosa	75
VI.2.1.1 Constante catalítica con fructosa a distintas concentraciones de buffer fosfato	77
VI.2.1.2 Efecto isotópico de solvente para la fructosa	79
VI.2.2 Constantes cinéticas con sacarosa	82
VI.2.2.1 Constante catalítica con sacarosa a distintas concentraciones de buffer fosfato	84
VI.2.2.2 Efecto isotópico de solvente para la sacarosa	85
VI.2.3 Constantes cinéticas con sucralosa	88
VI.2.3.1 Constante catalítica con sucralosa a distintas concentraciones de buffer fosfato	89
VI.2.3.2 Efecto isotópico de solvente para la sucralosa	90
VI.2.4 Evaluación de la inhibición de la glucación no enzimática de la hemoglobina con la <i>Stevia rebaudiana</i>	93
VI.2.4.1 Constantes cinéticas con la <i>Stevia rebaudiana</i>	93
VI.2.5 Evaluación de la disminución de la glucosa	95
VII. Conclusiones	102
VIII. Referencias Bibliohemerográficas	104
IX. Apéndices	119
Apéndice 1. Aminoácidos presentes en las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina A	119
Apéndice 2. Estructura de rayos X de la hemoglobina	120
Apéndice 3. Kit para determinación cuantitativa de hemoglobina glucada (HbA _{1c}) en sangre humana <i>Teco diagnostics</i>	121
Apéndices 4. Kit para la determinación enzimática cuantitativa de glucosa Método Gol-PAP 900. <i>BIOSCIENCE</i>	123
Apéndices 5. Artículo científico generado de parte de los resultados de la presente investigación	124

Abreviaturas y símbolos

α	Rotación óptica
Abs	Absorbancia
ADAG	A _{1C} -Derived Average Glucose
ADN	El ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin Difosfato
AGEs	Advanced Glycation End-Products, Productos de glucación avanzada
ATP	Trifosfato de Adenosina
[Azúcar]	Concentración del azúcar
°C	Grados Centígrados
Ca ²⁺	Ion calcio
C ₆ H ₁₂ O ₆	D-fructosa
C ₆ H ₁₂ O ₆ . H ₂ O	D-glucosa 2- <i>h</i>
C ₁₂ H ₉ Cl ₃ O ₈ .	Sucralosa
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarosa
Cm	Centímetro
D ₂ O	Agua deuterada
DPG	2,3-difosfoglicerato
F	Factor de corrección por la dilución
Fruc	Fructosa
g	Gramo
g/mol	Gramo por mol
GGPP	Geranilgeranil Difosfato
GK	Wistar Goto-kakizaki
Gluc	Glucosa
GOD	Enzima Glucosa Oxidasa
GLUT1	Transportador uno de glucosa en seres humanos
HbA ₀	Hemoglobina nativa o pura
HbA _{1C}	Hemoglobina glucada
HbA _{total}	Hemoglobina total
[H ₃ O ⁺]	Concentración del ácido

HSA	Albumina Sérica Humana
K^+	Ion potasio
K_{ATP}	Conductos de K^+ sensibles a ATP
KCN	Cianuro de potasio
Kir6.2	Conducto rectificado al interior de la célula
k	Constante de velocidad
k_B	Constante de velocidad de la reacción catalizada
k_{D_2O}	Constante de velocidad en agua deuterada
k_{H_2O}	Constante de velocidad en agua
k_{obs}	Constante de velocidad observada
k_o	Constante de velocidad de la reacción no catalizada
Ln	Logaritmo neperiano
M^{-1}	Molar a la menos uno
mg/mL	Miligramos por mililitros
Min	Minutos
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
mL	Mililitros
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
Nm	Nanómetro
MKC	Sal sódica del ácido monocetocolico
MOPS	3-morfolinopropano-1-ácido sulfónico
NaCl	Cloruro de Sodio
NaH_2PO_4	Fosfato de sodio monobásico
Na_2HPO_4	Fosfato de sodio dibásico
Ω	Ómega
PM	Peso molecular
%	Porcentaje
R	Relación entre las absorbancia de HbA _{1C} y el patrón

R _{muestra}	Relación entre las absorbancia de HbA _{1C} y el patrón en la muestra
RNAsa	Ribonucleasa
R _{patrón}	Relación entre las absorbancia de la HbA _{1C} y el patrón en el patrón
s ⁻¹	Segundos a la menos uno
Sac	Sacarosa
Suc	Sucralosa
SUR1	Receptor Sulfonilureas
TAPSO	3-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil) propan-2-il]amino]-2-hidroxiopropane-1-ácido sulfónico
UDP	Uridin Difosfato
UGT	Uridina Difosfato Dependientes Glicosiltransferasas
UV	Ultravioleta
UV-V	Ultravioleta-Visible

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Pag.
Ecuación 1. La constante de velocidad de pseudo primer orden k_{obs}	20
Ecuación 2. La constante de hidrólisis k_1	53
Ecuación 3. La constante catalítica del azúcar k_2	53
Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de hemoglobina glucada (%HbA _{1C}) utilizando el patrón	56
Ecuación 5. Cálculo de la relación (R) entre la AbsHbA _{1C} y Abstotal	55
Ecuación 6. Cálculo del porcentaje de hemoglobina glucada (%HbA _{1C}) utilizando el factor de dilución F	56
Ecuación 7. Constantes de velocidad de pseudo primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina	56
Ecuación 8. Cálculo del factor de dilución (F)	122
Ecuación 9. Concentración de glucosa en la muestra	123
Ecuación 10. Rotación óptica específica	61

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Mecanismo general de glucación de las proteínas	12
Esquema 2. Forma abierta y cerrada de la glucosa	13
Esquema 3. Reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina	18
Esquema 4. Reordenamiento de Amadori catalizado por fosfato	20
Esquema 5. Reordenamiento de Amadori y efecto isotópico	21
Esquema 6. Equilibrio entre la forma abierta y cerrada de la fructosa	25
Esquema 7. Reacción de Maillard con fructosa origina dos (a y b) productos Heyns	26
Esquema 8. Formas abiertas y cerradas de la sacarosa una vez separadas las unidades de glucosa y fructosa	29
Esquema 9. La sucralosa y sus productos de hidrólisis	31
Esquema 10. Síntesis de la sucralosa a partir de la sacarosa	32
Esquema 11. Ruta biosintética de los glicósidos de esteviol en la especie <i>Stevia rebaudina</i>	38
Esquema 12. Hidrólisis ácida de la sacarosa	51
Esquema 13. Hidrólisis ácida de la sucralosa	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura de la insulina; el péptido C está representado por la línea continua a partir de los dos puntos negros	4
Figura 2. Regulación de la secreción de insulina de las células β del páncreas	5
Figura 3. Algunos productos de glucación avanzada	7
Figura 4. Algunos medicamentos orales para la diabetes	8
Figura 5. Estructura de la hemoglobina	15
Figura 6. Los sitios más probables para la unión entre la fructosa y la hemoglobina	28
Figura 7. <i>Galega officinalis</i> L. (Fabaceae) 1753	34
Figura 8. <i>Bauhinia variegata</i> L. (Fabaceae) 1953. “Casco de vaca”	34
Figura 9. <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni	35
Figura 10. Flavonoides presentes en la <i>Stevia rebaudiana</i>	42
Figura 11. Diagrama esquemático de un polarímetro	52
Figura 12. Partes aéreas y <i>Voucher Specimen</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada en función del tiempo en minutos (min)	54
Gráfico 2. Constante de hidrólisis k_1 en función de las concentraciones de ácido clorhídrico (HCl)	54
Gráfico 3. Concentración de HbA _{1c} en función del tiempo	57
Gráfico 4. Constantes de velocidad en función de la concentración del buffer	58
Gráfico 5. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa a 0,4 g/mL con HCl 2N en función del tiempo a 37 °C	62
Gráfico 6. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa a 0,4 g/mL con HCl 3N en función del tiempo a 37 °C	63
Gráfico 7. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa a 0,4 g/mL con HCl 4N en función del tiempo a 37 °C	64
Gráfico 8. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 6N en función del tiempo a 37 °C	65
Gráfico 9. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 7N en función del tiempo a 37 °C	66
Gráfico 10. Logaritmo neperiano ($\ln$) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 8N en función del tiempo a 37 °C	67
Gráfico 11. Constantes de velocidad en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL en función de la concentración de ácido clorhídrico (HCl) a 37 °C	68
Gráfico 12. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	76
Gráfico 13. Constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación no enzimática de la hemoglobina con la fructosa en función de la concentración de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	77
Gráfico 14. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa en solvente H ₂ O y D ₂ O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84	80
Gráfico 15. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	83

Gráfico 16.	Constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación no enzimática de la hemoglobina con sacarosa en función de la concentración de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	84
Gráfico 17.	Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa en los solventes H ₂ O y D ₂ O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84	86
Gráfico 18.	Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	88
Gráfico 19.	Constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación no enzimática de la hemoglobina con sucralosa en función de la concentración de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	89
Gráfico 20.	Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa en los solventes H ₂ O y D ₂ O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84	91
Gráfico 21.	Efecto de la concentración de <i>S. rebaudiana</i> sobre la glucación no enzimática de hemoglobina con glucosa en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	94
Gráfico 22.	Porcentaje de hemoglobina glucada en buffer fosfato 4,8 mM a diferentes concentraciones de <i>S. rebaudiana</i> a 37 °C y pH 7,3	94
Gráfico 23.	Concentración consumida de glucosa al variar la concentración de <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	96
Gráfico 24.	Concentración final de glucosa al variar la concentración de <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	97
Gráfico 25.	Glucosa consumida en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina al variar la concentración de <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	99
Gráfico 26.	Glucosa final en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina al variar la concentración de <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	100
Gráfico 27.	Glucosa consumida en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina sin la <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	101

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Cambios funcionales y los efectos perjudiciales de la glucación no enzimática en la diabetes mellitus	10
Tabla 2. Parámetros que determinan el grado de la glucación no enzimática, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	14
Tabla 3. Correlación de los niveles de hemoglobina glucada (HbA _{1c}) con el promedio de los niveles de glucosa en plasma	17
Tabla 4. Constantes de la reacción catalizada, geometría y pka de los iones carbonato, fosfato y arseniato	23
Tabla 5. Velocidad relativa de algunos monosacáridos con la hemoglobina	24
Tabla 6. Descripción taxonómica de la <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni	36
Tabla 7. Estructuras de esteviósidos y compuestos presentes en <i>Stevia rebaudiana</i>	40
Tabla 8. Diterpenos no glucósidos del núcleo Labdano (esterbinos A-H) presentes en la <i>Stevia rebaudiana</i>	41
Tabla 9. Preparación de los tubos de ensayo blanco, patrón y muestra para la determinación de la glucosa	123
Tabla 10. Rotación observada (α) y rotación específica $[\alpha]_D^{37}$ para la sacarosa a 37 °C	61
Tabla 11. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL con HCl 2 N a 37 °C	62
Tabla 12. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL en HCl 3 N a 37 °C	63
Tabla 13. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL con HCl 4 N a 37 °C	64
Tabla 14. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL en HCl 6 N a 37 °C	65
Tabla 15. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 7 N a 37 °C	66

Tabla 16. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL con HCl 8 N a 37 °C	67
Tabla 17. Constantes de velocidad en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) a 37 °C	68
Tabla 18. Constantes catalítica de la sacarosa 0,4 g/mL a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) a 37 °C	69
Tabla 19. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial 0,4 g /mL en HCl 2 N a 37 °C	69
Tabla 20. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 3 N a 37 °C	70
Tabla 21. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 5 N a 37 °C	70
Tabla 22. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 6 N a 37 °C	70
Tabla 23. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 7 N a 37 °C	71
Tabla 24. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial 0,4 g /mL en HCl 8 N a 37 °C	71
Tabla 25. Rotación observada (α) en función del tiempo para sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 2 N a 37 °C.	72
Tabla 26. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g /mL en HCl 3 N a 37 °C	72
Tabla 27. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g /mL en HCl 5 N a 37 °C	73
Tabla 28. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g /mL en HCl 6 N a 37 °C	73
Tabla 29. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura 0,2 g /mL en HCl 7 N a 37 °C	73
Tabla 30. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g /mL en HCl 8 N a 37 °C	74

Tabla 31. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	76
Tabla 32. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con fructosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	77
Tabla 33. Constantes catalíticas con fructosa en función buffer fosfato	78
Tabla 34. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa en solvente H ₂ O y D ₂ O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84	80
Tabla 35. Constantes de velocidad de primer orden en H ₂ O y D ₂ O para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con fructosa en buffer fosfato 4,8 mM pH 7,3 y pD 7,84 a 37 °C	81
Tabla 36. Efecto isotópico con fructosa para buffer fosfato 4,8 mM	81
Tabla 37. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	83
Tabla 38. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sacarosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	84
Tabla 39. Constantes catalíticas con sacarosa en función buffer fosfato	85
Tabla 40. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa en los solvente H ₂ O y D ₂ O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84	86
Tabla 41. Constantes de velocidad de primer orden en H ₂ O y D ₂ O para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sacarosa en buffer fosfato 4,8 mM pH 7,3 y pD 7,84 a 37 °C	87
Tabla 42. Efecto isotópico con sacarosa para buffer fosfato 4,8 mM	87
Tabla 43. Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	88
Tabla 44. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sucralosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3	89
Tabla 45. Constantes catalíticas con sucralosa en función buffer fosfato	90

Tabla 46. Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa en los solvente H ₂ O y D ₂ O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84	90
Tabla 47. Constantes de velocidad de primer orden en H ₂ O y D ₂ O para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sucralosa en buffer fosfato 4,8 mM pH 7,3 y pD 7,84 a 37 °C	91
Tabla 48. Efecto isotópico con sucralosa para buffer fosfato 4,8 mM	92
Tabla 49. Resumen de las constantes catalíticas encontradas para los diferentes azúcares	92
Tabla 50. Porcentaje de hemoglobina glucada a diferentes concentraciones <i>S. rebaudiana</i> en función del tiempo a 37 °C y pH 7,3	93
Tabla 51. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina a diferentes concentraciones de <i>S. rebaudiana</i> a 37 °C y pH 7,3	95
Tabla 52. Concentración de glucosa consumida y final variando la concentración de <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	96
Tabla 53. Concentración de glucosa consumida y final durante la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina, variando la concentración de <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	98
Tabla 54. Concentración de glucosa consumida y final, durante la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina, sin <i>S. rebaudiana</i> en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3	100

I. Introducción

Una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad hoy en día, es la diabetes mellitus, la cual consiste en un aumento del nivel de glucosa en la sangre (hiperglucemia) y es provocada por la baja producción de la insulina y su escasa utilización por el organismo. Hace menos de 30 años, era común el pensamiento entre los investigadores de la medicina que no había relación entre la hiperglucemia y las complicaciones de la diabetes. Sin embargo, estudios posteriores en epidemiología, bioquímicos y ensayos con animales, sugieren que existe una fuerte relación (Brownlee *et al*, 1981; Gil *et al*, 1988; Nathan, 1994; Skyler, 1990).

Actualmente la glucación no enzimática de las proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*, es el mecanismo que mejor explica la relación entre la hiperglucemia y las complicaciones de la diabetes. Las investigaciones en los últimos años se han orientado hacia los aspectos: mecanísticos, estructurales, funcionales y farmacológicos de las proteínas y su interacción con los azúcares.

La glucación es un fenómeno natural el cual ocurre en una gran variedad de proteínas y se define como la unión covalente de moléculas de azúcares libres con ciertos residuos de amino ácidos en las proteínas (Furth *et al*, 1988). Esta condensación de azúcares libres constituye un mecanismo por el cual las proteínas son sujetas a modificaciones postribosomales sin la ayuda enzimática. Esta “lesión bioquímica” es termodinámicamente irreversible, y de graves consecuencias cuando ocurre en tejidos con proteínas que tienen un tiempo de vida media alto.

El alto consumo de azúcares y edulcorantes tanto de origen natural como sintético entre los cuales tenemos: la glucosa o dextrosa, la fructosa o azúcar de la fruta, la sacarosa, y la sucralosa son asociados a diversas enfermedades. Estos azúcares no han sido estudiados desde el punto de vista mecanístico, para analizar si ellos reaccionan más rápido que la glucosa con las proteínas, entonces no deberían ser sustitutos por la glucosa ya que acelerarían las reacciones secundarias de la diabetes y el normal envejecimiento.

Las plantas son una rica fuente para explorar como antidiabéticos potencialmente útiles. El efecto antihiper glucémico de estas plantas es debido a su capacidad para restaurar la función de tejidos pancreáticos mediante el aumento de la producción de insulina o de inhibir la absorción intestinal de la glucosa. Tal es el caso de la especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) conocida también como hoja dulce de Paraguay (Kingham *et al*, 1991). Las hojas de esta planta, se han utilizado tradicionalmente como edulcorante en distintas regiones del mundo, teniendo grandes beneficios en la salud, además de tener actividad antihiper glucemiante (Gregersen *et al*, 2004), también presenta actividad antihipertensiva (Chan *et al*, 2000), su extractos crean defensas impidiendo el crecimiento de organismos patógenos que afectan el sistema inmunológico (Tomita *et al*, 1997).

Además la *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni no ha sido estudiada como posible inhibidor de la glucación de proteínas, y por tal motivo pudiera presentar dicha inhibición en la glucación no enzimática de la hemoglobina, cuyos productos finales de reacción llamados productos de glucación avanzada son irreversibles, estos se acumulan en el organismo y a nivel fisiológico son altamente perjudiciales, ya que tienen un papel fundamental en el desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, del normal envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer (Brownlee, 1994; Frye *et al*, 1998; González *et al*, 2000; Vitek *et al*, 1994; Vlassara *et al*, 1994).

En este trabajo se propone realizar un estudio mecanístico de la hemoglobina con diferentes edulcorantes, para determinar si estos azúcares reaccionan con la hemoglobina y por ende con otras proteínas en el organismo, si esta reacción ocurre se compararía la velocidad de formación de la hemoglobina con los edulcorantes y la glucosa (Gil *et al*, 1988, 1991, 2012). En caso que las reacciones de la hemoglobina con los edulcorantes fueran mayores que con la glucosa, estarían contraindicados para las personas con diabetes ya que acelerarían las complicaciones secundarias que presenta esta enfermedad.

II. Antecedentes

II.1 La diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una gama de trastornos metabólicos comunes, que se origina de diversos mecanismos y todos tienen por consecuencia la hiperglucemia. El número de individuos con diabetes se incrementa con rapidez en todo el mundo. Los factores genéticos y ambientales contribuyen también a su patogenia, lo que incluye secreción insuficiente de insulina, reducción de la respuesta a la insulina, incremento en la producción de glucosa o modificación en el metabolismo de grasas y proteínas (Goodman y Gilman, 2012).

II.1.1 Clasificación de la diabetes mellitus (American Diabetes Association, 2012).

Esta clasificación incluye cuatro tipologías clínicas:

Diabetes mellitus tipo 1: representa 5 a 10% de los casos diabetes y es consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β de los islotes pancreáticos, lo que produce deficiencia total o casi total de insulina. También fue llamada diabetes mellitus juvenil o diabetes mellitus dependiente de insulina. De forma tradicional se consideraba como una enfermedad de los niños y adolescentes, pero la destrucción autoinmunitarias de las células β puede ocurrir a cualquier edad (Goodman y Gilman, 2012; American Diabetes Association, 2012).

Diabetes mellitus tipo 2: es mucho más frecuente, en general de aparición más tardía, suele asociarse a la obesidad y previamente fue denominada diabetes no dependiente de insulina. En este tipo, el páncreas segrega cantidades muy variables de insulina, de forma que su concentración plasmática puede ser normal e incluso superior a la normal, pero relativamente insuficiente para mantener los niveles normales de glicemia. Esto indica que en el tipo 2 puede existir una resistencia a la acción de la insulina, es decir, una excesiva producción hepática de glucosa y una deficiente utilización periférica a pesar de la presencia de la insulina, por lo que se puede hablar de una deficiencia relativa en la secreción pancreática de la hormona (Flórez *et al*, 1997).

Diabetes gestacional: Detectada durante el embarazo; no llega hacer diabetes claramente manifestada (American Diabetes Association, 2012).

Otros tipos específicos de diabetes: producidos por otras causa como alteraciones genéticas producida por las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina,

enfermedades de páncreas exocrino, diabetes inducida por drogas o por compuestos químicos (American Diabetes Association, 2012).

II.1.2 La insulina, biosíntesis y secreción

La biosíntesis de la insulina se inicia en el retículo endoplásmico rugoso en la célula β pancreáticas, donde se sintetiza un precursor denominado preproinsulina, que consta de una cadena de 110 aminoácidos. Inmediatamente, después la preproinsulina se transforma en proinsulina en la que ya existen puentes disulfuros entre las cadenas A y B de la insulina, luego abandona el retículo en microvesículas y se transfiere al aparato de Golgi, donde se lleva a cabo el almacenamiento en los gránulos todavía inmaduros. Es aquí donde comienza la conversión de proinsulina en insulina y péptido C (Figura 1), siendo segregadas cantidades equimolares de ambos péptidos; también son segregadas pequeñas cantidades de proinsulina (Flórez *et al*, 1997; Goodman y Gilman, 2012)

La insulina en los gránulos maduros es almacenada en forma cristalina, donde están unidos dos átomos de cinc con seis moléculas de insulina (Flórez *et al*, 1997), esto le confiere gran estabilidad hasta cuando las condiciones favorecen su secreción al plasma.

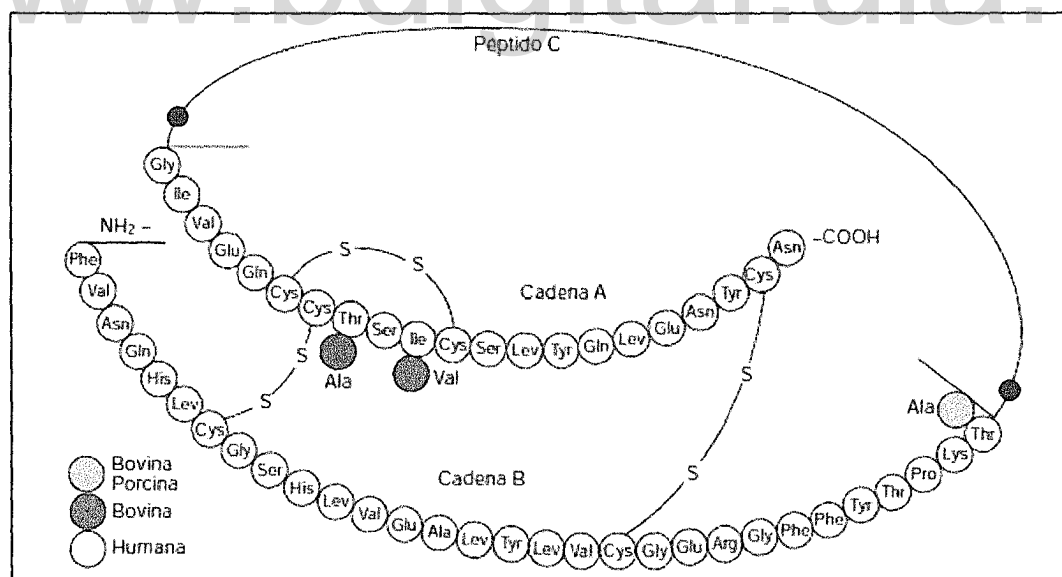


Figura1: Estructura de la insulina; el péptido C está representado por la línea continua a partir de los dos puntos negros (Flórez *et al*, 1997).

Regulación y secreción de la insulina: la liberación de insulina en el páncreas está sometida a múltiples factores de regulación, químicos, nerviosos y hormonales, pero, como es lógico, son las modificaciones de los principales sustratos energéticos (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres), los que inducen modificaciones inmediatas en la respuesta al proceso de secreción de insulina (Flórez *et al*, 1997).

En la Figura 2, las células β del páncreas en estado de reposo (glicemia en ayunas) se encuentran hiperpolarizadas. La glucosa entra a la célula a través de los transportadores GLUT (principalmente GLUT1 en seres humanos), que contribuye a equilibrar la glucosa a ambos lados de la membrana plasmática (Goodman y Gilman, 2012; Velázquez, 2008). Luego ocurre la fosforilación de glucosa para dar glucosa-6-fosfato es catalizada por la glucocinasa, se metaboliza e incrementa el ATP celular, con lo que se inhibe. El potasio entra a través de los conductos K_{ATP} ; la disminución de la conductancia de K^+ ocasiona despolarización, dando origen a la exocitosis (liberación celular) de la insulina almacenada en un proceso dependiente de Ca^{2+} . (Velázquez, 2008; Goodman y Gilman, 2012).

El conducto de K_{ATP} , en realidad es un heterooctámero compuesto de SUR1 y subunidades Kir6.2 y es el sitio de acción de varios fármacos: el ATP se une e inhibe a Kir6.2, las sulfonilureas y las meglitinidas se unen a SUR1 y lo inhiben favoreciendo la secreción de insulina (Goodman y Gilman, 2012).

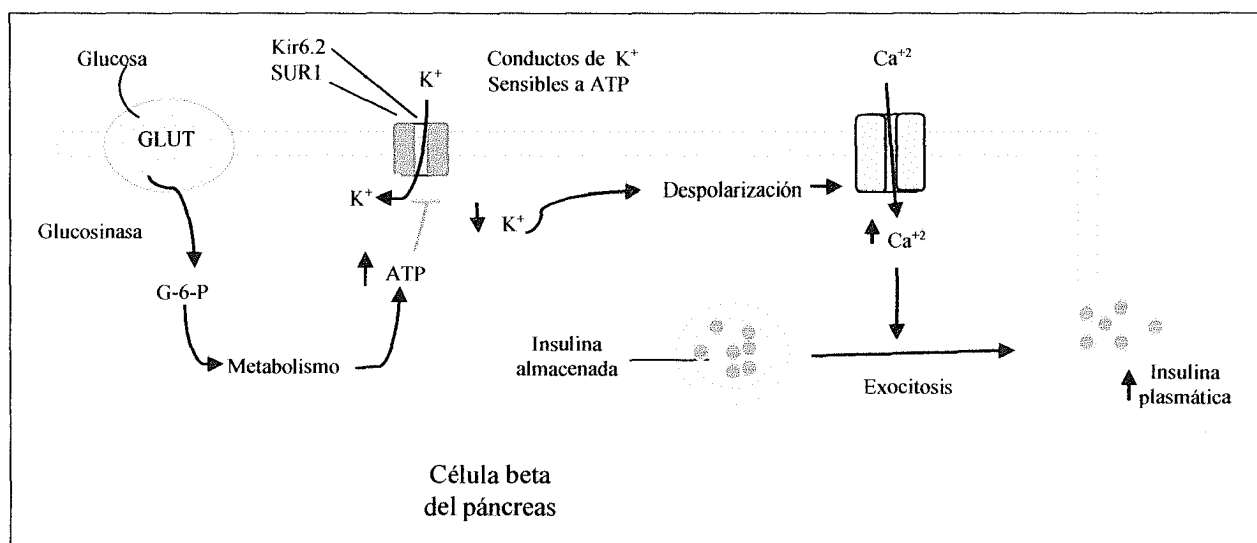


Figura 2. Regulación de la secreción de insulina de las células β del páncreas (Goodman y Gilman, 2012).

II.2 Glucación no enzimática de las proteínas en la diabetes y otras enfermedades.

La Glucación no enzimática, es un fenómeno natural, que puede definirse como la unión covalente de azúcares reductores simples con grupos amino libres de ciertos residuos de aminoácidos presentes en las proteínas, para formar estructuras cíclicas complejas sin la participación de las enzimas. Este proceso puede ser llevado a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* sobre las proteínas (Bernstein *et al*, 1987; Furth *et al*, 1988). La glicación es por consiguiente un término genérico, mientras que la glucación se refiere específicamente a la condensación de la glucosa con las proteínas (González *et al*, 2000).

Esta reacción fue descrita por primera vez en 1912 por el químico francés Louis Camille Maillard, quién observó los efectos producidos por el calentamiento y el almacenamiento de algunos alimentos que contenían mezclas de glucosa u otros azúcares reductores con los aminoácidos, para formar aductos que sufrían una serie de deshidrataciones y reordenamientos obteniendo productos poliméricos de color marrón oscuro o “browning”, variando su velocidad de formación de acuerdo a la composición de la mezcla aminoácido-azúcar (Vlassara *et al*, 1994).

Las etapas iniciales de la reacción de Maillard y la glucación no enzimática son prácticamente las mismas en las proteínas, sin embargo *in vivo* se obtienen productos finales distintos, estos productos son denominados Productos de Glucación Avanzada o por sus siglas en Ingles Advanced Glycation End Products (AGEs) que se muestran en la Figura 3, los cuales son diferentes a los formados en la reacción de oscurecimiento no enzimático (Reynolds *et al*, 1963).

En las últimas décadas se han encontrado evidencias que sostienen, que la glucación puede alterar las funciones y/o estructuras características de las proteínas, cuyos productos finales (AGEs) de reacción son irreversibles y a nivel fisiológico altamente perjudiciales, además de jugar un papel fundamental en el desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, del normal envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer (Brownlee, 1994; Frye *et al*, 1998; González *et al*, 2000; Vitek *et al*, 1994; Vlassara *et al*, 1994). Estos cambios funcionales de las proteínas ocurren en mayor proporción en pacientes diabéticos.

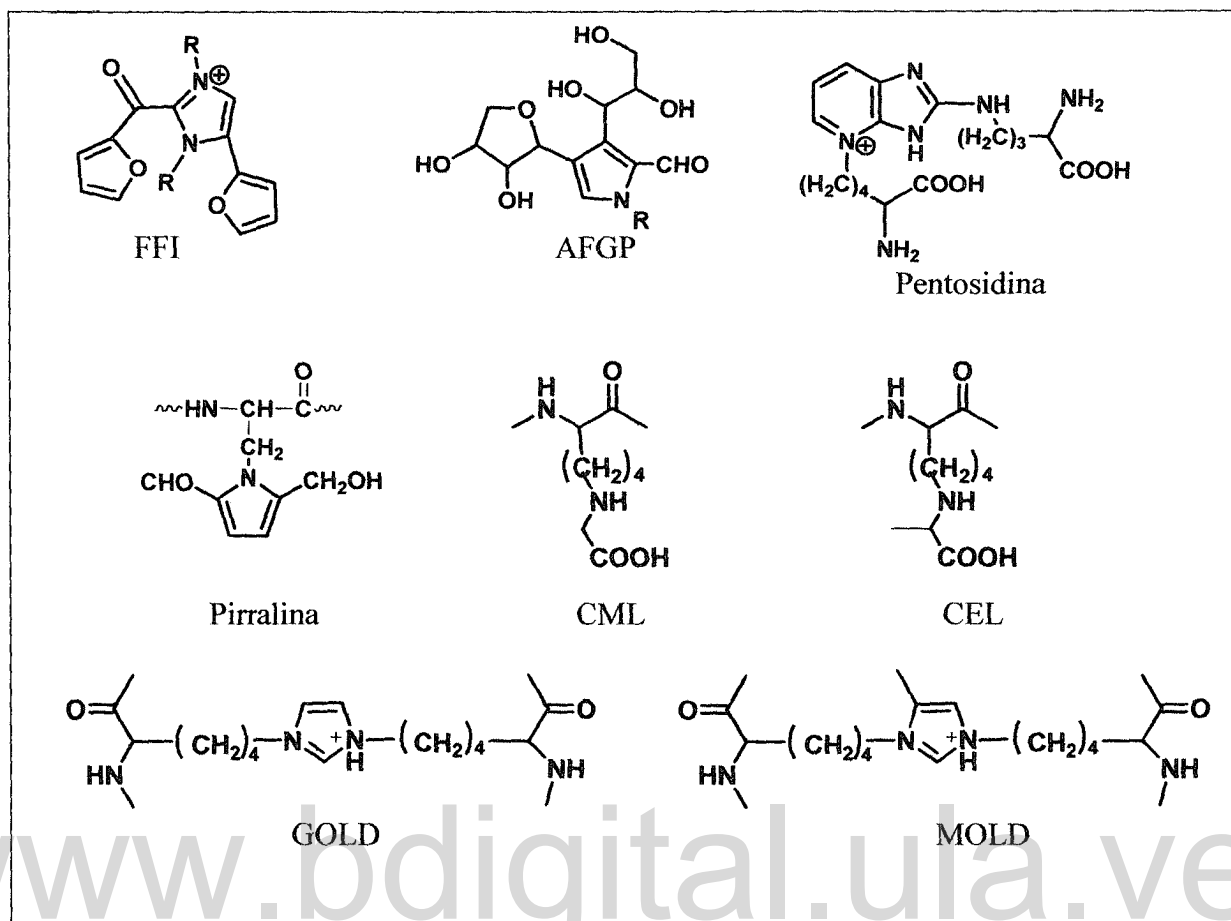


Figura 3. Algunos productos de glucación avanzada. FFI: 2-(2-Furoilo)-4(5)-2-furanilo)- 1H-imidazola, AFGP: 1-Alquilo-2-formilo-3,4-diglicosilpirrol, CML: N- ε-carboxi-metil-lisina, CEL: N- ε-carboxi-etil-lisina, GOLD: Glioxal-lisina dimero, MOLD: Metil-glioxal-lisina dimero (Basta *et al*, 2004).

A diferencia de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 puede responder al tratamiento con ejercicio, dieta y/o medicamentos orales como se pueden observar en la Figura 4, sin embargo, ellos no previenen completamente las complicaciones secundarias que surgen con el tiempo. Tales trastornos traen como resultado que las expectativas de vida para los diabéticos sean solo dos tercios en relación a una persona no diabética.

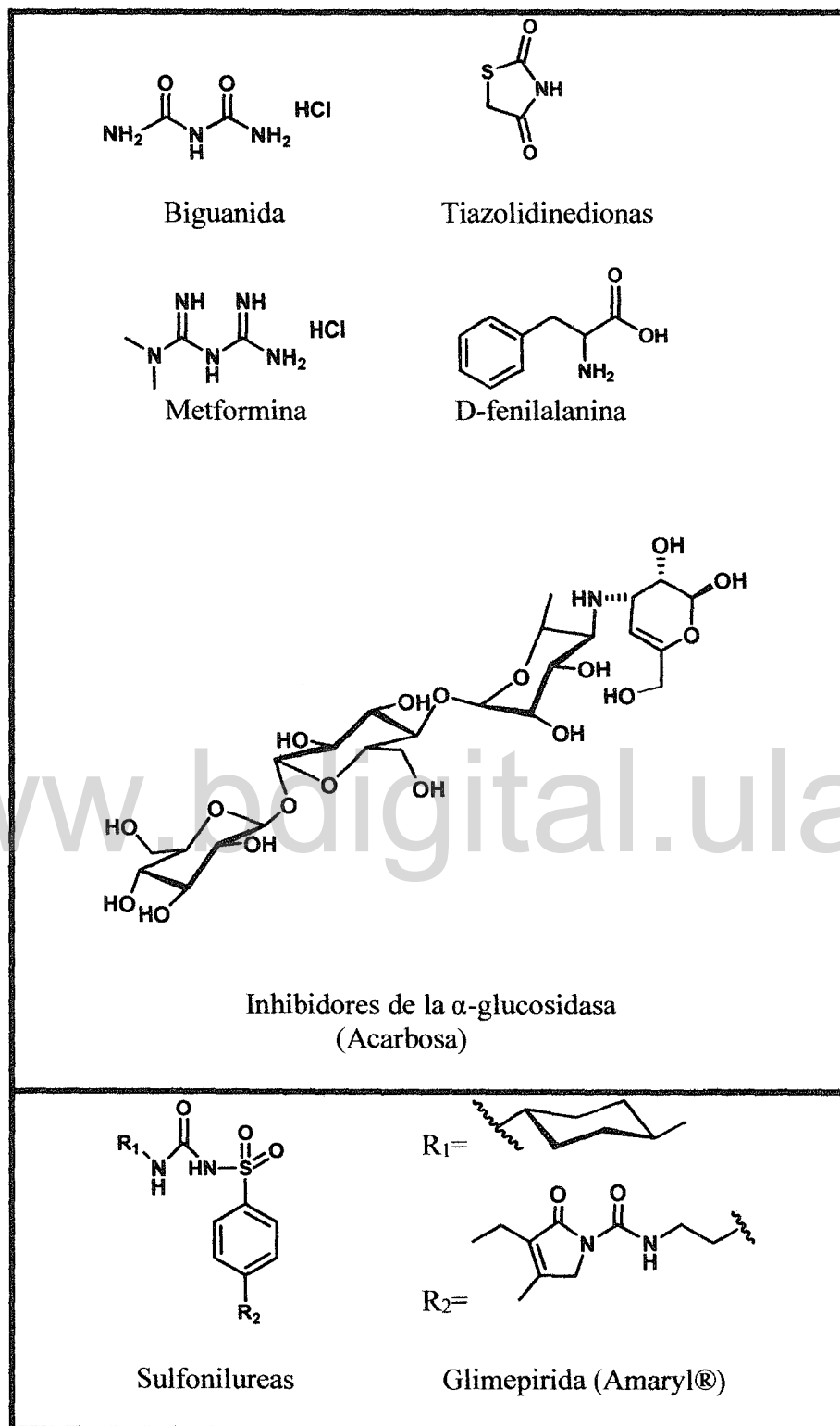


Figura 4. Algunos medicamentos orales para la diabetes.

La diabetes es una enfermedad que afecta a múltiples órganos, puede presentar secuelas en los ojos, riñones (Sigurd *et al*, 2006), corazón y extremidades, provocando enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis) (Actis *et al*, 2000), microangiopatía, retinopatía, neuropatía periférica y cataratas, todas estas desarrolladas muy lentamente. Los cambios funcionales de las proteínas causados por la glucación no enzimática tienen una contribución directa con las complicaciones antes mencionadas (Brownlee, 1994; Brownlee *et al*, 1981; Stevens *et al*, 1978; Taylor *et al*, 1988). A continuación en la Tabla 1 se describen algunos de estos casos.

En proteínas de larga vida, en el curso de meses y años, el producto Amadori se reordena para formar compuestos como cetoaldehídos que son mucho más estables (irreversibles). Se forman así los productos de glucación avanzada (Figura 3), que son proteínas que sufren una serie de cambios a consecuencia de este proceso: formación de puentes anormales entre péptidos, alteración de la estructura secundaria, terciaria y alteraciones funcionales.

Las proteínas de vida media larga como el colágeno, la mielina y la proteína del cristalino del ojo pueden llegar a transformarse en productos de glucación avanzada. Algunos ejemplos que permitirán una mejor visualización sobre cómo operan estos mecanismos, en la proteína del cristalino provoca un lento giro, debido a la formación de puentes de disulfuros intramoleculares, que hace a dicha proteína menos soluble, para que se formen agregados que contribuyen a las cataratas (González *et al*, 2000; Stevens *et al*, 1978).

La glucación no enzimática del colágeno, una proteína estructural de la piel de bajo recambio (vida media larga), genera la formación del colágeno unidos a los productos de glucación avanzada (colágeno-AGEs) o colágeno glucado, que es distinto gracias al aumento del entrecruzamiento y disminución de la solubilidad (Sabban, 2011). Es así que se alteran sus propiedades mecánicas, con pérdida de la elasticidad y fuerza tensora al mismo tiempo que se incrementa la rigidez, lo que determina la pérdida de su funcionalidad. Todos estos cambios de las características del colágeno lo hacen más resistente a la digestión por colagenasas, por lo cual en vez de degradarse como es natural, se acumula y origina el engrosamiento cutáneo, que es una de las complicaciones de la diabetes de larga evolución (Sabban, 2011).

Tabla 1. Cambios funcionales y los efectos perjudiciales de la glucación no enzimática en la diabetes mellitus.

Proteína	Función fisiológica	Cambios funcionales y posibles implicaciones
Proteínas Estructurales		
Hemoglobina	Intercambio de oxígeno.	Aumento en la afinidad por el oxígeno
Cristalino y membranas del ojo	Permite enfocar la luz para que sobre la retina se forme una imagen nítida	Opacidad y aumento en la vulnerabilidad al estrés oxidativo
Membranas basales	Adhesión celular, barrera de difusión y regulación del crecimiento celular	Aumento de la permeabilidad y disminución de la regeneración.
Matriz extracelular	Unión de la células por una red laxa de moléculas orgánicas extra celulares	Cambio en la capacidad para enlazar otras proteínas
Fibrina	Mantenimiento de los coágulos	Dificultad para ser degradada por las enzimas
Membrana de los eritrocitos	Permite a los eritrocitos atravesar capilares más angostos	Aumento de la rigidez
Proteínas de transporte		
Lipoproteínas de baja densidad	Trasporte de lípidos y metabolismo	Alteración de los mecanismos degradantes y metabólicos por los macrófagos y células endoteliales
Seroalbúmina	Transporta y acumula ácidos grasos, fármacos y sustancias tóxicas en la sangre	Alteración en las propiedades de enlace a drogas y su manejo por el hígado
Enzimas		
Fibrinógeno	Viscosidad plasmática y formación de coágulo	Alteración en la coagulación
Purina fosfocilosa	Tiene una actividad catalítica con los eritrocitos	Envejecimiento de los eritrocitos
Ribonucleasa A	Participa en reacciones bioquímicas degradación del ARN	Pérdida de la actividad
Alcohol deshidrogenasa	Oxidación de sustratos que participan en el metabolismo de esteroides y ácidos biliares	Altera el metabolismo del sustrato
Otras		
Ácidos nucleicos	Trasmitir las características hereditarias de una generación a la siguiente y dirigir la síntesis de proteínas	Cambios relacionados con la edad malformaciones congénitas

El colágeno es un componente fundamental de la matriz extracelular. Cuando la glucación se produce en el colágeno localizado en las paredes arteriales y en los capilares sanguíneos pueden aparecer productos de entrecruzamiento no solo con otras moléculas de colágeno sino también con algunas proteínas plasmáticas (González *et al*, 2000), que en circunstancias normales son de vida media corta, como por ejemplo la albúmina, las inmunoglobulinas y las lipoproteínas de baja densidad. Estas estructuras producen el engrosamiento, disminuyen la flexibilidad y la permeabilidad de dichos tejidos, y se ha sugerido que estarían involucradas en el desarrollo de enfermedades vasculares (Wautier *et al*, 1998), aterosclerosis y glomeruloesclerosis (Vlassara, 1996).

La enfermedad de Alzheimer: es la principal causa de demencia entre los adultos mayores. Es una enfermedad de compleja patogenia, a veces hereditaria, que se caracteriza desde el punto de vista anatómico, por pérdida de neuronas, sinapsis y la presencia de placas seniles y de degeneración neurofibrilar (Boller *et al*, 1997; Donoso, 2003). Clínicamente se expresa como una demencia que comienza lentamente con un aumento progresivo, que habitualmente se inicia con fallas de la memoria reciente y termina con demencia (Donoso, 2001; 2003).

La acumulación de productos de glucación avanzada en el cerebro es una característica presente durante el envejecimiento normal. En el caso del Alzheimer, se ha observado glucación no enzimática en los filamentos tau y amiloide β (péptidos que forman las placas seniles). El estrés oxidativo y los productos de glucación avanzada inician un ciclo vicioso en el que los cambios normales relacionados con la edad desembocan en una cascada de eventos patofisiológicos (Munch *et al*, 1997; Martínez *et al*, 2002).

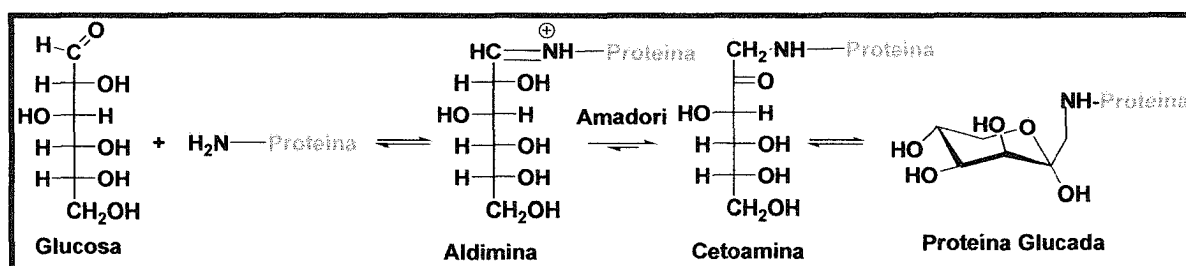
La detección de productos de glucación avanzada en el cerebro de individuos con enfermedad de Alzheimer y otras patologías neurodegenerativas, mediante anticuerpos específicos (Sasaki *et al*, 1998), ha permitido determinar la localización de algunas estructuras características de estas enfermedades (placas seniles y manojos neurofibrilares). Además los productos de glucación avanzada inducen el estrés oxidativo con el consecuente daño neuronal (Yan *et al*, 1994). Si bien estas evidencias no establecen un papel causal preponderante de estos productos de glucación en la enfermedad de Alzheimer, son consistentes con tal hipótesis (Brownlee, 1995).

Los efectos biológicos de los productos de glucación no se restringen exclusivamente a personas diabéticas o de edad avanzada. En personas no diabéticas con deficiencia renal se observa la acumulación plasmática de proteínas debido a la falla de los mecanismos responsables de la transformación y eliminación de compuestos carbonílicos altamente reactivos (estrés carbonílico) (Miyata *et al*, 1999). Tampoco se trata de un proceso que afecta sólo a las proteínas.

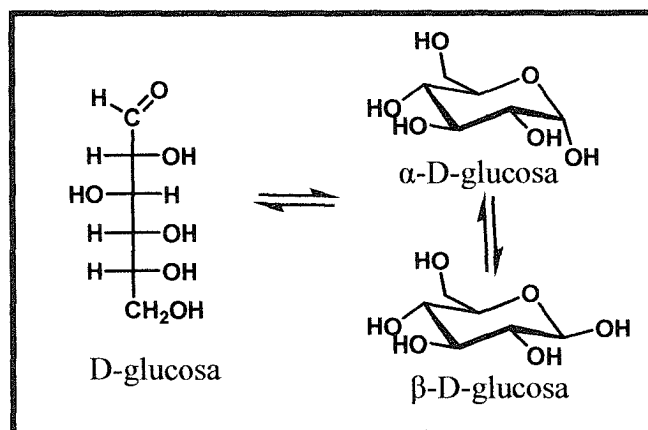
El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula de bajo recambio, al menos en células que no se encuentran en pleno proceso de división, posee grupos amino primarios y se encuentra dentro del núcleo celular en contacto con el adenosin difosfato (ADP) es un nucleótido constituido por un azúcar, una base nitrogenada (Cervantes *et al*, 1996), por lo que es un blanco potencial para la formación de productos de glucación avanzada. Estos productos de glucación contribuirían al incremento de las alteraciones cromosómicas y al deterioro de la reparación, replicación y transcripción del ADN. Dichos cambios genéticos disminuirían la capacidad de las células para renovar sus proteínas y por lo tanto comprometen la supervivencia del organismo (Cerami *et al*, 1987).

II.3 Reacción de glucación no enzimática de las proteínas

La reacción de glucación ocurre en tres etapas sucesivas que se representan en el Esquema 1. Inicialmente se produce una condensación, vía adición nucleofílica, entre el carbonilo de la forma abierta de la glucosa (0,002% de la glucosa total (Esquema 2)) o con otro azúcar reductor y el grupo amino libre de la proteína para formar una aldimina o un aducto, base de Schiff inestable (Actis *et al*, 2000; Brownlee *et al*, 1981; Frye *et al*, 1998; Furth *et al*, 1988; Sigurd *et al*, 2006; Taylor *et al*, 1988).



Esquema 1. Mecanismo general de glucación de las proteínas (Fisher *et al*, 1981).



Esquema 2. Forma abierta y cerrada de la glucosa (González *et al*, 2000).

Posteriormente se inicia un proceso lento de reordenamiento de los enlaces químicos, para dar lugar a un producto más estable denominado producto de Amadori, el cual es prácticamente irreversible para formar una cetoamina estable (producto de Amadori o fructosamina) la cual cicliza produciendo un hemiacetal (Gil *et al*, 1988, 1991; Gómez *et al*, 1996; González *et al*, 2000; Hayashi *et al*, 1986; Higgins *et al*, 1981).

Finalmente, el compuesto de Amadori sufre una serie de transformaciones complicadas que conducen a la formación de productos de glucación avanzada, que generalmente son coloreados y/o fluorescentes. El mecanismo de estas reacciones no se conoce con detalle, aunque se sabe que involucran reordenamientos intramoleculares complejos y que, en algunos casos, la asociación entre varios de estos compuestos da lugar al entrecruzamiento entre proteínas (González *et al*, 2000). El equilibrio para este reordenamiento se alcanza en aproximadamente 30 días.

II.3.1 Factores que determinan el grado de glucación

El grado de glucación no enzimática para una proteína, está afectada por varios factores (Monnier *et al*, 1983): el pH, la temperatura, la concentración de proteína y el tiempo de incubación. En la Tabla 2 se observan algunos de estos factores.

Tabla 2. Parámetros que determinan el grado de la glucación no enzimática, *in vivo* e *in vitro* (Monnier *et al*, 1983).

Parámetros que determinan el grado de la glucación
pH del medio
Temperatura
Concentración de la proteína.
Microambientes de los grupos amino
Concentración de la glucosa (grado de hiperglucemia)
Tiempo de incubación
Permeabilidad de los tejidos a la glucosa libre

El pH tiene un papel primordial, ya que la formación del producto de Amadori se observa por encima de pH 7,0. Al aumentar el pH desde 7,0 hasta 9,0 la concentración del producto de Amadori aumenta hasta alcanzar el equilibrio (Lowrey *et al*, 1985). El aumento de la temperatura es también otro factor importante que produce una aceleración proporcional de la velocidad de formación del producto de Amadori.

De la concentración de proteína depende el número de grupos amino disponibles para reaccionar con la glucosa, lo que podría explicar el patrón de glucación no enzimática de los grupos aminos que se detecta dentro de una proteína dada, así como también las diferencias en la susceptibilidad hacia la glucación de diferentes proteínas (Brownlee *et al*, 1981; Garlick *et al*, 1985; Monnier *et al*, 1983). El tiempo de incubación afecta la formación

de los productos de Amadori que continúan acumulándose en función del tiempo hasta alcanzar el equilibrio.

II.4 Glucación no enzimática de la hemoglobina

La hemoglobina (HbA₀) es el componente principal de los glóbulos rojos y le confiere su color, es una proteína que transporta el oxígeno de los pulmones a los tejidos y el dióxido de carbono (CO₂) desde los tejidos a los pulmones.

La hemoglobina pertenece al grupo de hemoproteínas, que son proteínas conjugadas en las cuales, el grupo prostético, llamado grupo hemo, está formado por una estructura macrocíclica que tiene por nombre "Protoporfirina IX" (Figura 5). La parte proteica de la hemoglobina no difiere de las otras proteínas ya que de los veinte aminoácidos presentes normalmente en todas las proteínas, la hemoglobina tiene 18 en la cadena α y 19 en la cadena β (Apéndices 1) (Saenz *et al*, 1987).

La hemoglobina más abundante en la sangre de los seres humanos adultos normales está formada por dos pares de cadenas idénticas entre sí; dos cadenas α y dos cadenas β . A esta hemoglobina se le llama hemoglobina A y se representa como (HbA: $\alpha_2\beta_2$) (Saenz *et al*, 1987) puede observarse en la Figura 5.

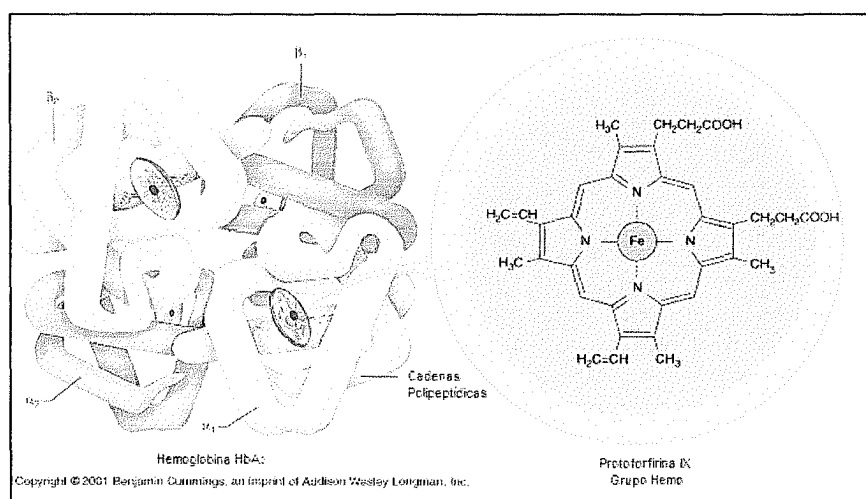


Figura 5. Estructura de la hemoglobina. Tomada y modificada de: legacy.owensboro.kctcs.edu

En 1962 Huisman y colaboradores, reportaron un incremento en una de las fracciones menores de la hemoglobina en cuatro pacientes con diabetes mellitus, que atribuyeron en forma inicial a la ingestión del hipoglucemiante oral (sulfonilurias), pero los intentos para reproducir *in vitro* este fenómeno no fueron exitosos.

Durante un estudio para detectar hemoglobinas anormales que incluía cerca de 1.200 pacientes de la Universidad de Cambridge, se observó que dos pacientes con antecedentes de diabetes mellitus mostraban un movimiento anormal en una de las fracciones de la hemoglobina. Esto los impulsó a estudiar, en el año 1968, a 47 personas con antecedentes de diabetes mellitus con mal control glicémico. Notandose una banda anormal que llamaron “componente diabético” de la hemoglobina (Rahbar, 1969).

Posteriormente se demostró que el “componente diabético” tenía características cromatográficas muy similares a la hemoglobina glucada (HbA_{1C}), el cual es un componente menor de la hemoglobina descrita en forma inicial por Schnek y Schroeder en 1961. Estudios posteriores establecieron que el incremento de hemoglobina en los pacientes diabéticos era idéntico a la HbA_{1C} (Rahbar *et al*, 1969).

La importancia fisiológica de la reacción de glucación se puso de manifiesto a partir del descubrimiento de que parte de la hemoglobina en la sangre de individuos sanos está glucada y que el nivel de la HbA_{1C} es mayor en pacientes diabéticos (González *et al*, 2000; Koenig *et al*, 1997).

La concentración de la HbA_{1C} (Davis *et al*, 1978) es un componente de gran importancia clínica y química en el control de la diabetes (Koenig *et al*, 1976; Javanovic *et al*, 1981), ya que resulta ser un parámetro útil para el control periódico de la cantidad de azúcar en la sangre en pacientes diabéticos, debido a que estos presentan niveles más elevados de HbA_{1C} que comprenden entre 10-15%, mientras que los niveles para individuos normales oscilan entre 6-8%.

La HbA_{1C} es el producto de una reacción lenta, no enzimática e irreversible y está directamente relacionada con las concentraciones de glucosa sanguínea (Tabla 3) y la vida media de los eritrocitos (120 días). La hemoglobina glucada tiene varias fracciones y la más importante es la HbA_{1C} por ser la más estable (Yue *et al*, 1982). Como las concentraciones

normales de HbA_{1c} excluyen marcadas fluctuaciones de la glucosa sanguínea durante las 3 o 4 semanas precedentes, la concentración de hemoglobina glucada representa el índice más confiable de la media de la glucosa sanguínea durante un largo período de tiempo.

Los detalles mecanísticos de la glucación no enzimática de proteínas son prácticamente desconocidos excepto para la hemoglobina, la cual es la proteína mecanísticamente más estudiada. La glucación no enzimática de la hemoglobina humana A₀, puede ocurrir en varios sitios (Shapiro *et al*, 1980) (Apéndices 2). Los grupos ε-amino de las lisinas están sujetos a glucación, la valina terminal de la cadena β es la glucación que altera la carga en la superficie y la convierte en una hemoglobina A_{1c} más rápida (Brownlee *et al*, 1984). La HbA_{1c} tiene una estructura idéntica a la hemoglobina HbA₀, excepto que la glucosa está unida covalentemente al NH₂ terminal de la cadena β por una unión cetoamina (Boochin *et al*, 1975; Bunn *et al*, 1975; Koenig *et al*, 1976).

Tabla 3. Correlación de los niveles de hemoglobina glucada (HbA_{1c}) con el promedio de los niveles de glucosa en plasma (Nathan *et al*, 2008).

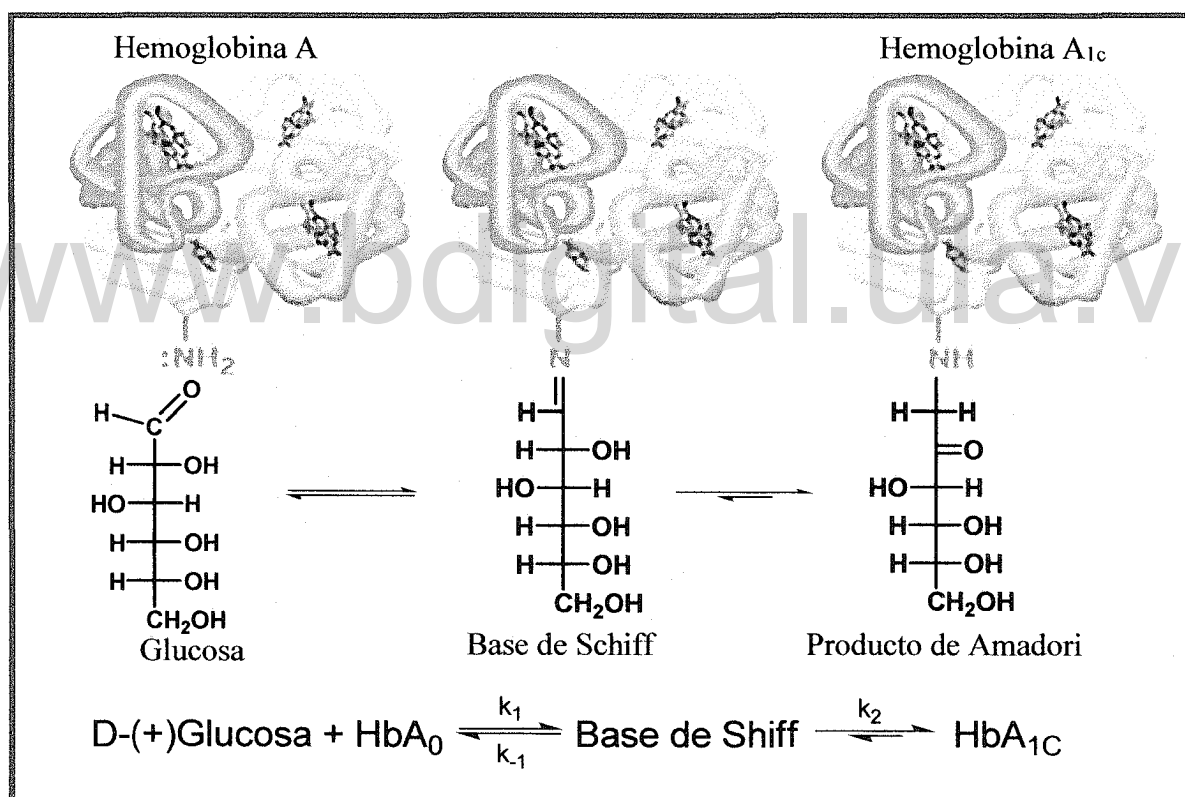
*Correlación de HbA _{1c} con niveles de glucosa	
% HbA _{1c}	Glucosa promedio (mg/dl)
6	126
7	154
8	183
9	212
10	240
11	269
12	298

*Las estimaciones están basadas por la international A_{1c}-Derived Average Glucose (ADAG), con datos de 2.700 mediciones de glucosa por valor de HbA_{1c} en 507 adultos con diabetes tipo 1, tipo 2 y no diabéticos. Correlación entre HbA_{1c} y el promedio glucosa tiene $r = 0,92$ (Nathan *et al*, 2008).

El paso inicial de la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina es la formación de la base Schiff, produciéndose un reordenamiento de Amadori, el cual es el paso lento, para dar finalmente una cetoamida denominado también hemoglobina glucada

(HbA_{1c}) (Higgins *et al*, 1981). En el Esquema 3 se representa la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina.

Además de la glucosa y de los azúcares fosfatos, otros compuestos que pueden acumularse a concentraciones superiores a lo normal durante algunas enfermedades, pueden también formar aductos con la hemoglobina. La galactosa por ejemplo se ha encontrado formando aductos con la albumina en pacientes con galactosemia (Urbanowski *et al*, 1987). El cianato derivado de la urea puede también reaccionar con los grupos aminos terminales de la hemoglobina para formar hemoglobina carbamilada en pacientes urémicos (Fluckiger *et al*, 1981).



Esquema 3. Reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina (Higgins *et al*, 1981).

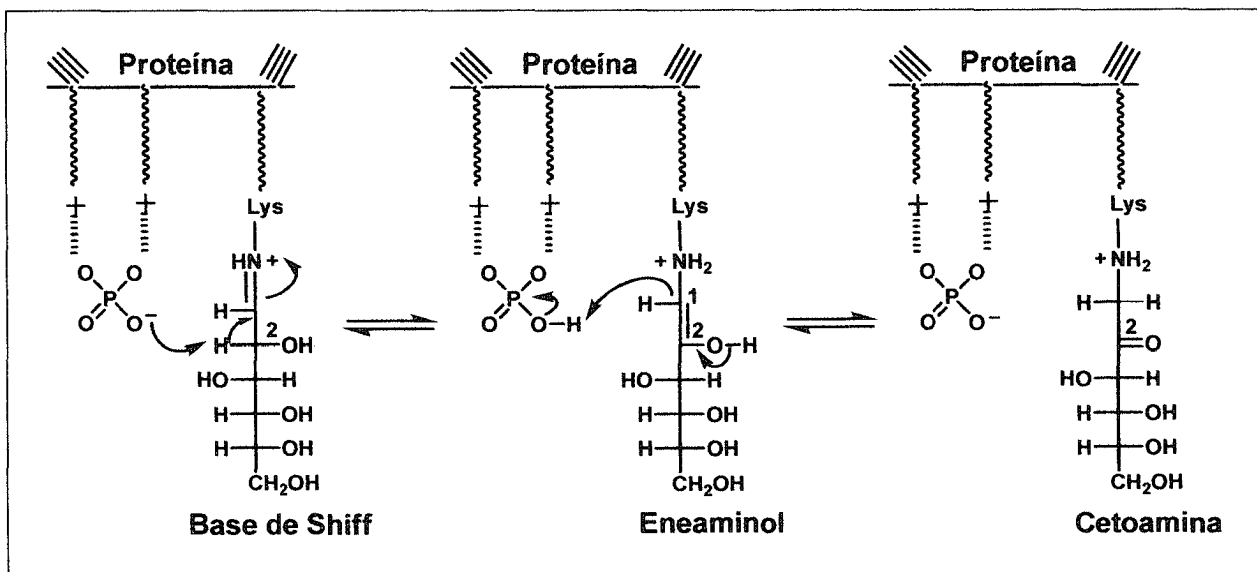
II.4.1 Cinética de la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina

En el Esquema 3, k_1 representa la constante para la formación de la base de Schiff y k_2 la constante de velocidad para el reordenamiento de Amadori. En 1981 Higgins y colaboradores demostraron que la HbA_{1c} se forma lentamente y es prácticamente irreversible. La constante de formación de la base de Schiff (k_1) es aproximadamente igual a la constante de disociación de la misma (k_{-1}). Esta se ve afectada principalmente por la accesibilidad de los grupos amino (Shapiro *et al*, 1980). Además determinaron el efecto del fosfato en la formación de la base de Schiff *in vitro*, encontrando que la constante de velocidad k_1 para la formación de la base de Schiff con hemoglobina es independiente de la concentración del fosfato (1-3 mM).

La hemoglobina reacciona 20 veces más rápido con la glucosa-6-fosfato que con la glucosa (Haney *et al*, 1976), la reactividad de este sustrato es máxima cuando la hemoglobina se encuentra en estado desoxigenado y libre de fosfato orgánico e inorgánico (Watkins *et al*, 1987).

Watkins y colaboradores en 1987, reportaron que el ion fosfato se une en algún sitio específico de la hemoglobina y puede actuar como un catalizador ácido-base de la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina, la Albumina Sérica Humana (HSA), la Ribonucleasa (ARNsa), la Lisozima y el Citocromo C actuando en las etapas de donación o abstracción del protón en el reordenamiento de Amadori. La efectividad de este ión para acelerar la reacción se debe a la capacidad del mismo de enlazarse a microambientes básicos en las proteínas, tales como la secuencia de lisinas (Lys-Lys) o, un centro más específico de la proteína, como lo es el sitio activo de la ARNsa. En el Esquema 4 se representa el reordenamiento de Amadori catalizado por fosfato.

En un primer paso, el fosfato abstrae al protón enlazado al carbono 2 de la aldimina formándose así un eneaminol, con el doble enlace entre el carbono C-1 y C-2, en la etapa siguiente el fosfato dona el protón al eneaminol, convirtiéndose este último en una cetoamina estable, con el grupo carbonilo ubicado en la posición 2 del residuo de la glucosa.

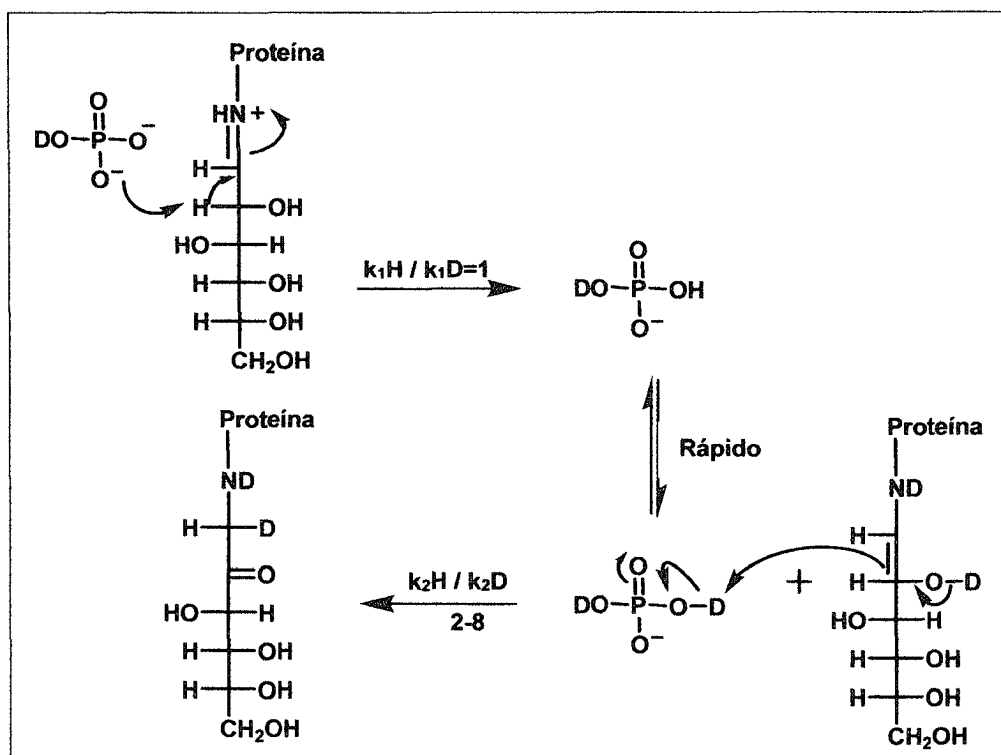


Esquema 4. Reordenamiento de Amadori catalizado por fosfato (Watkins *et al*, 1987).

La constante de equilibrio para la formación de la base de Schiff entre la glucosa y la RNAsa (Watkins *et al*, 1987), no varió en diferentes buffer (fosfato, TAPSO y MOPS), Lo cual sugiere que en esta reacción, el paso lento en la glucación es el reordenamiento de Amadori (Higgins *et al*, 1981), y el fosfato parece ejercer su efecto catalizando esta reacción. La glucación no enzimática de la hemoglobina es catalizada por buffer fosfato (Gil *et al*, 1988, 1991). El reordenamiento de Amadori es simplemente una interconversión de tautómeros. De hecho, una catálisis general ácido-base es esperada para la abstracción o donación del protón en el reordenamiento de Amadori. En el Esquema 4 se puede apreciar esta reacción.

En estudios posteriores realizados por Gil y colaboradores reportaron, (Gil *et al*, 1988, 1991, 1993; Peña, 1996; Vásquez, 2000) que si existe catálisis por el buffer fosfato, arseniato y carbonato (Esquema 5). La constante de velocidad de pseudo primer orden consta de dos términos, uno independiente del buffer, k_o y otro dependiente del buffer, k_B . Descrita por la Ecuación 1 (Ec. 1).

$$k_{obs} = k_o + k_B [X] \quad \text{Ec. 1}$$



Esquema 5. Reordenamiento de Amadori y efecto isotópico (Gil *et al*, 1993).

Estudios de los efectos isotópicos, mostraron evidencia de un posible cambio estructural de la hemoglobina antes o durante el reordenamiento de Amadori, ya que no que no ocurre ni la abstracción ni la donación del protón por el ión fosfato, puesto que no se presentaron efectos isotópicos de solvente ($k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1$) ni efectos isotópicos del sustrato ($k_{BH}/k_{BD} = 1$) en el término dependiente del buffer.

La ausencia de efecto isotópico del solvente y de sustrato excluye que en la etapa limitante de la reacción del reordenamiento de Amadori ocurran:

1. La abstracción del protón por el buffer fosfato, lo cual mostraría un efecto isotópico del sustrato.
2. La donación del protón por buffer fosfato, lo cual mostraría un efecto isotópico del solvente.

Para que la reacción de glucación pueda ocurrir a una velocidad significativa el residuo de carbohidrato enlazado en la base de Schiff debe encontrarse en la cercanía de una base catalizadora efectiva (Gil *et al*, 2005). En algunas ocasiones los grupos básicos cercanos

de la proteína representan este papel. Por otra parte, otros estudios (Vásquez, 2000; Gil *et al*, 2002), sugieren que el ión fosfato o bicarbonato, enlazado en un área específica de una proteína, acelera la reacción de glucación no enzimática de un grupo amino vecino.

La glucación no enzimática de la hemoglobina es catalizada por el 2,3-difosfoglicerato (DPG) (Gil *et al*, 1993, 2002), se reportaron valores de los efectos isotópicos de solvente ($k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1$) y de sustrato ($k_{BH}/k_{BD} = 2$) esto indica que la etapa de abstraer el protón en el reordenamiento de Amadori por el DPG y de fosfatos orgánicos es el paso parcial o total que determina la velocidad de la reacción. Es evidente que la función de los buffer fosfato (Gil *et al*, 1988, 1991), arseniato (Gil *et al*, 2004) y carbonato (Gil *et al*, 2004) sobre la glucación de la hemoglobina es diferente al de los fosfatos orgánicos (Gil *et al*, 1993).

La función del fosfato, arseniato y carbonato es la de inducir a un grupo funcional de la hemoglobina para que actúe como la base que abstrae al protón en el reordenamiento de Amadori (Esquema 5). Las constantes catalíticas para el fosfato (Gil *et al*, 1988, 1991) y carbonato (Gil *et al*, 2004) son iguales, mientras que la constante catalítica para el arseniato (Gil *et al*, 2004) es el doble que para el fosfato y carbonato. El anión arseniato el cual es similar en geometría y pKa al fosfato, es más efectivo que el fosfato como catalizador en la glucación de la hemoglobina.

Los resultados de la Tabla 4 muestran que el valor de la constante catalítica para el arseniato es el doble del valor de la constante del fosfato (Gil *et al*, 1988; Gómez *et al* 1996) y carbonato (Gil *et al*, 2004). Una diferencia de 3 unidades en pKa entre el fosfato y carbonato no hacen diferencia en reactividad. Por otra parte la pequeña diferencia de 0,4 unidades entre el fosfato y arseniato, claramente no es la respuesta al potencial catalítico del arseniato. Por lo tanto pueden existir otros factores que están contribuyendo para tal diferencia, uno puede ser la solvatación y el otro que grupos funcionales diferentes estén abstrayendo el protón en dicha reacción.

Para conocer el mecanismo y los factores que afectan la glucación no enzimática de la hemoglobina, catalizada por fosfato y arseniato, Gil y colaboradores en 2012 realizaron un estudio cinético variando la polaridad del solvente utilizando sorbitol, y observaron que las constantes catalíticas k_B encontradas en presencia de sorbitol para el buffer fosfato y buffer arseniato son aproximadamente iguales de $(5,78 \pm 0,39) \times 10^{-10} s^{-1} M^{-1}$ y $(6,62 \pm 0,53) \times 10^{-10} s^{-1}$

1M^{-10} respectivamente, lo que corrobora que hay un mayor costo energético para transferir al ion fosfato del medio acuoso al sitio de enlace con la hemoglobina que con el arseniato, ya que el buffer fosfato se encuentra más solvatado (Gil *et al*, 2012), lo cual excluye que grupos funcionales distintos actúen como la base que abstrae al protón en el reordenamiento de Amadori.

Tabla 4. Constantes de la reacción catalizada, geometría y pKa de los iones carbonato (Gil *et al*, 2005), fosfato (Gil *et al*, 1988, 1991) y arseniato (Gil *et al*, 2002).

Ion	pKa	$k_B (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \cdot 10^{-11}$	Geometría
CO_3^{-2}	10,25	$2,81 \pm 0,20$	Plana trigonal
HPO_4^{-2}	7,21	$2,38 \pm 0,08$	Tetraédrica
HAsO_4^{-2}	6,77	$5,99 \pm 0,33$	Tetraédrica

II.4.2 Reactividad de algunos azúcares con la hemoglobina

La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Esto implica que sea el azúcar reductor, considerado generalmente en las reacciones de glucación no enzimática de interés biológico. Sin embargo, cualquier azúcar que posea un grupo carbonilo libre puede reaccionar con los grupos aminos primarios de las proteínas para formar la base Schiff.

La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo. Las moléculas de azúcar consiguen estabilizarse a través de un equilibrio entre la forma abierta y por lo menos dos formas cerradas (anómeros cíclicos) en las que el grupo carbonilo ha desaparecido. Los del grupo de Katchalsky en 1953, fueron los primeros en demostrar que existe una correlación entre la velocidad de reacción de la glucación y proporción de la forma abierta del azúcar. En la Tabla 5, se muestra la reactividad relativa de la hemoglobina con algunos monosacáridos (Bunn *et al*, 1981), donde se observa la correlación entre la velocidad de interacción con la proteína y la forma abierta del azúcar.

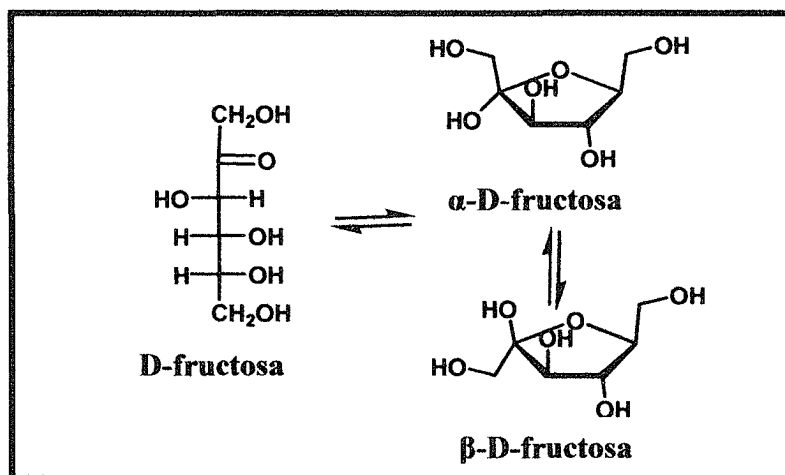
La reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con la ribosa es catalizada por los buffer fosfato y carbonato (Astorga, 2009). Para el buffer fosfato, la velocidad de la reacción espontánea es más rápida que con la glucosa, sin embargo, las constantes catalíticas k_B son iguales a la de la glucosa bajo las mismas condiciones experimentales (Astorga, 2009).

Tabla 5. Velocidad relativa de algunos monosacáridos con la hemoglobina (Bunn *et al*, 1981).

Monosacáridos	$k^1 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$	% Carbonilo
I. Aldosas		
6-Deoxi-D-Glucosa	0,3	0,002
D-Glucosa	0,60	0,002
D-Manosa	0,62	0,005
6-Deoxi-L-Manosa	0,7	0,007
D-Alosa	1,4	0,01
D-Galactosa	2,8	0,02
D-Xilosa	2,9	0,02
D-Talosa	5,2	0,03
D-Altrosa	5,2	0,03
D-Ribosa	10,0	0,05
D-Idosa	55	0,2
5,6-di-O-metil-D-Glucosa	104	1,0
II. Cetosas		
L-Sorbosa	1,0	0,2
D-Tagatosa	2,3	0,6
D-Fructosa	4,5	0,7
D-Treo-2-Pentulosa	15,8	8,0

Otros azúcares como fructosa, sacarosa y sucralosa también pudieran reaccionar con la hemoglobina, ya que en el equilibrio entre la forma abierta y cerrada de estos azúcares, observado en el Esquema 6 o una vez hidrolizado el azúcar (ver Esquema 8 y 9), tienen disponible su grupo carbonilo, siendo la presencia de este grupo una de las condiciones principales para que ocurra la reacción de glucación no enzimática con los grupos aminos terminales de la hemoglobina.

II.4.2.1 La fructosa (Fr) o levulosa ($C_6H_{12}O_6$), se encuentra en las frutas, es un hidrato de carbono simple, dentro de estos pertenece a la clase de monosacárido. Presenta la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura molecular, ya que este forma un anillo de cinco miembros (Esquema 6).



Esquema 6. Equilibrio entre la forma abierta y cerrada de la fructosa (Wade, 1993).

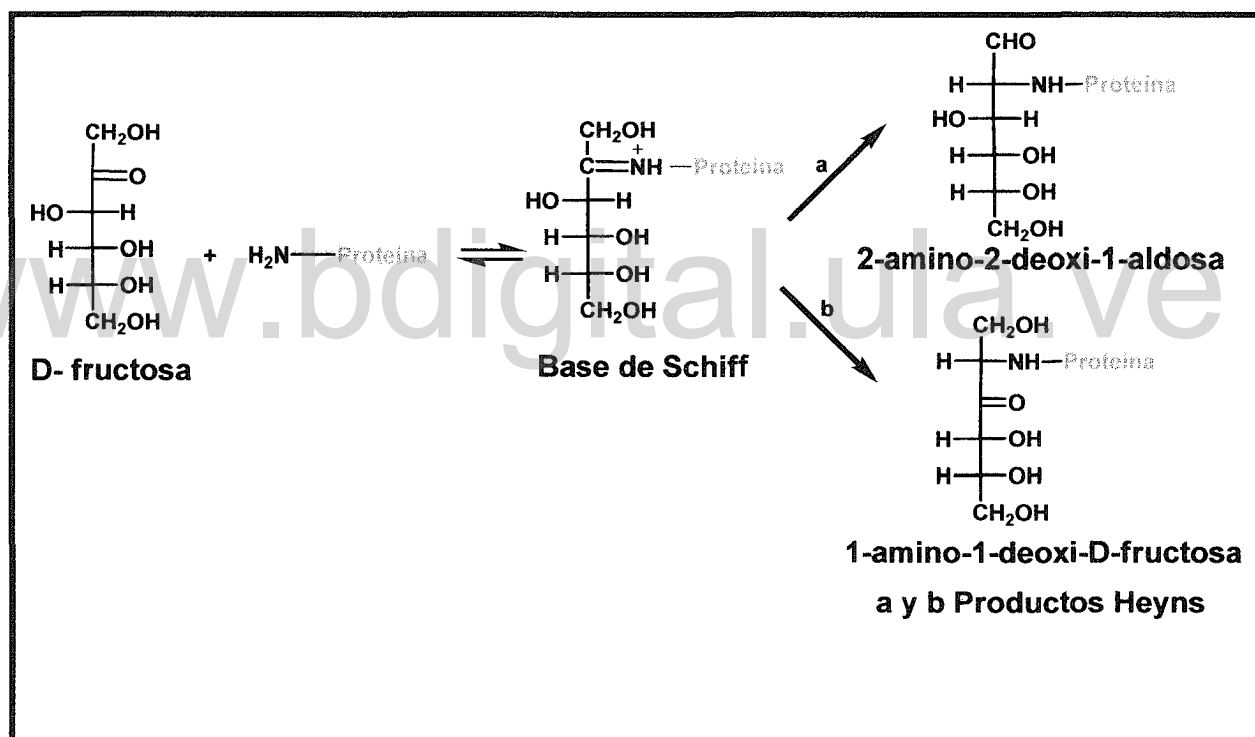
La fructosa ha sido utilizada tradicionalmente como edulcorante para los diabéticos. Sin embargo, en los últimos tiempos se ha convertido en objeto de ser asociada como causa primaria de la obesidad. A diferencia de la glucosa, que se absorbe instantáneamente produciendo una subida y una bajada rápida de energía, la fructosa, es metabolizada y guardada, en parte, por el hígado en forma de glucógeno como reserva para cuando se necesite hacer un esfuerzo. Sin embargo puesto que la fructosa acaba transformándose en glucosa produciendo un aumento de glicemia en sangre, ya no se considera un edulcorante recomendable para las personas con diabetes.

La fructosa, como es el caso de otros azúcares reductores, experimenta la reacción de Maillard con proteínas y aminoácidos. Las etapas iniciales de la reacción ocurren más rápidamente con fructosa que con glucosa (Dills, 1993). Esta opinión se ve reforzada por el descubrimiento de que la velocidad de formación de base de Schiff a partir de grupos amino de la hemoglobina con la fructosa es 7,5 veces más rápida que la formada con la glucosa (Bunn *et al*, 1981).

La reacción Maillard con la fructosa es muy similar a la de glucosa (Esquema 1), pero presenta otro reagrupamiento que se denomina "el reordenamiento de Heyns" y se muestra

generalmente como la sustitución de 2-amino-2-deoxialdosa (Heyns *et al*, 1957, 1959; Isbel *et al*, 1958; Lewis *et al*, 1950; Suarez *et al*, 1989) como se muestra en el Esquema 7. Además se han encontrado el derivado 1-amino-1-deoxi-D-fructosa que también se forma en la reacción de fructosa con aminoácidos (Heyns *et al*, 1961, 1962, 1964; Reynolds, 1965) y con proteínas (McPherson *et al*, 1988).

La evidencia también sugiere alguna formación del producto de Amadori como se muestra en el Esquema 1 ((Heyns *et al*, 1957, 1959; Isbel *et al*, 1958; Lewis *et al*, 1950). La reacción que tiene la fructosa y las proteínas puede formar múltiples productos como Heyns y Amadori, los factores que influyen en la formación de estos diferentes productos requieren mayor estudio (Dills, 1993).



Esquema 7. Reacción de Maillard con fructosa origina dos (a y b) productos Heyns (Suarez *et al*, 1989).

La reacción Maillard con cualquier azúcar, incluida la fructosa, produce una disminución de la calidad de la proteína debido a la pérdida de residuos de aminoácidos y disminución de digestibilidad de las proteínas (Dills, 1993). Los productos de Maillard

pueden inhibir la captación y el metabolismo de los aminoácidos libres, de nutrientes tales como cinc y otros productos avanzados de Maillard (Dills, 1993). *In vivo*, las reacciones de Maillard entre las proteínas y fructosa, glucosa, y otros azúcares reductores pueden desempeñar un papel en el envejecimiento y en algunas de las complicaciones clínicas (Dills, 1993)

El aumento de la concentración de fructosa en la sangre de pacientes con diabetes mellitus, presenta una mayor probabilidad de que se produzca la unión de fructosa con varias proteínas (fructosilación o fructación), demostrando que existen cambios estructurales en la unión fructosa-hemoglobina (Fr-Hb) y que además, la liberación de hierro de la hemoglobina tiene una relación directamente proporcional con el grado de fructación (Bose *et al*, 2008).

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) induce más rápido la liberación de hierro de la Fr-Hb que la liberación de hierro de la hemoglobina sola (HbA_0), este aumento en la liberación de hierro de la Fr-Hb A_0 puede causar una mayor formación de radicales libres y el estrés oxidativo en los diabéticos. (Bose *et al*, 2008). Estudios indican que altos niveles de fructosa plasmática postprandial están asociados con la retinopatía y posiblemente nefropatía, en pacientes con diabetes tipo 2 (Kawasaki *et al*, 2004).

Por otra parte, el consumo de fructosa a largo plazo puede favorecer la aparición de la diabetes, incluso aunque la fructosa no suele tener efectos adversos de tolerancia a la glucosa a corto y mediano plazo. En ratas, la alimentación a largo plazo de cantidades moderadas de fructosa (15% de la dieta en peso), mostró una alteración de tolerancia a la glucosa (Blakely *et al*, 1981) y una dieta rica en fructosa (72% en peso) provocó el desarrollo de la diabetes mellitus y glomeruloesclerosis (Cohen *et al*, 1977).

Para comprobar los efectos por el consumo a largo plazo de azúcares y su relación con el envejecimiento, fue probado en ratas alimentadas con fructosa, glucosa y sacarosa durante un año, observaron que la concentración de fructosa en sangre, el colesterol, la fructosamina, la hemoglobina glucada, fueron significativamente mayor en ratas alimentadas con fructosa en comparación con las alimentadas con los otros azúcares y las de grupo control, que además el consumo de fructosa induce la reticulación del colágeno en la piel, alteración de la solubilidad del colágeno y aumento de la fluorescencia del colágeno óseo (Levi *et al*, 1998).

La formación de cataratas en la diabetes puede ser a través de la glucación no enzimática de las proteínas del cristalino debido a mayores concentraciones de azúcares presentes en las lentes de los pacientes diabéticos. Una investigación realizada con [^{14}C] fructosa y γ -II-cristalino de bovino, marcado radiactivamente, indicó que la fructosa había reaccionado en un solo parte de la proteína. Al relacionar los resultados del análisis de aminoácidos, encontraron que el sitio de unión del γ -II-cristalino de bovino con la fructosa era en el grupo α -NH $_2$ de la glicina N-terminal (Pennington *et al*, 1994).

Después de la incubación de glucosa y fructosa con albúmina sérica de bovino, pudieron observar que el grado de unión a las proteínas plasmáticas y la generación de fluorescencia para la fructosa, fueron mayor que las reportadas para la glucosa (Suarez *et al*, 1989; Takagi *et al*, 1995).

Estudios de modelado molecular revelaron que los sitios más probables para la unión entre la fructosa y la hemoglobina, son las lisinas, Lys 7 (α), Lys 127 (α) y Lys 66 (β) observadas en la Figura 6 (Bose *et al*, 2008).

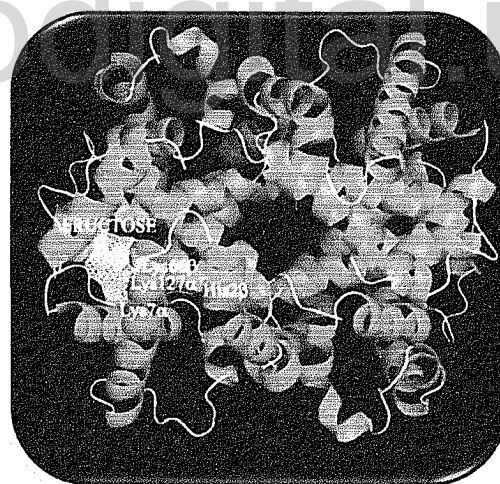
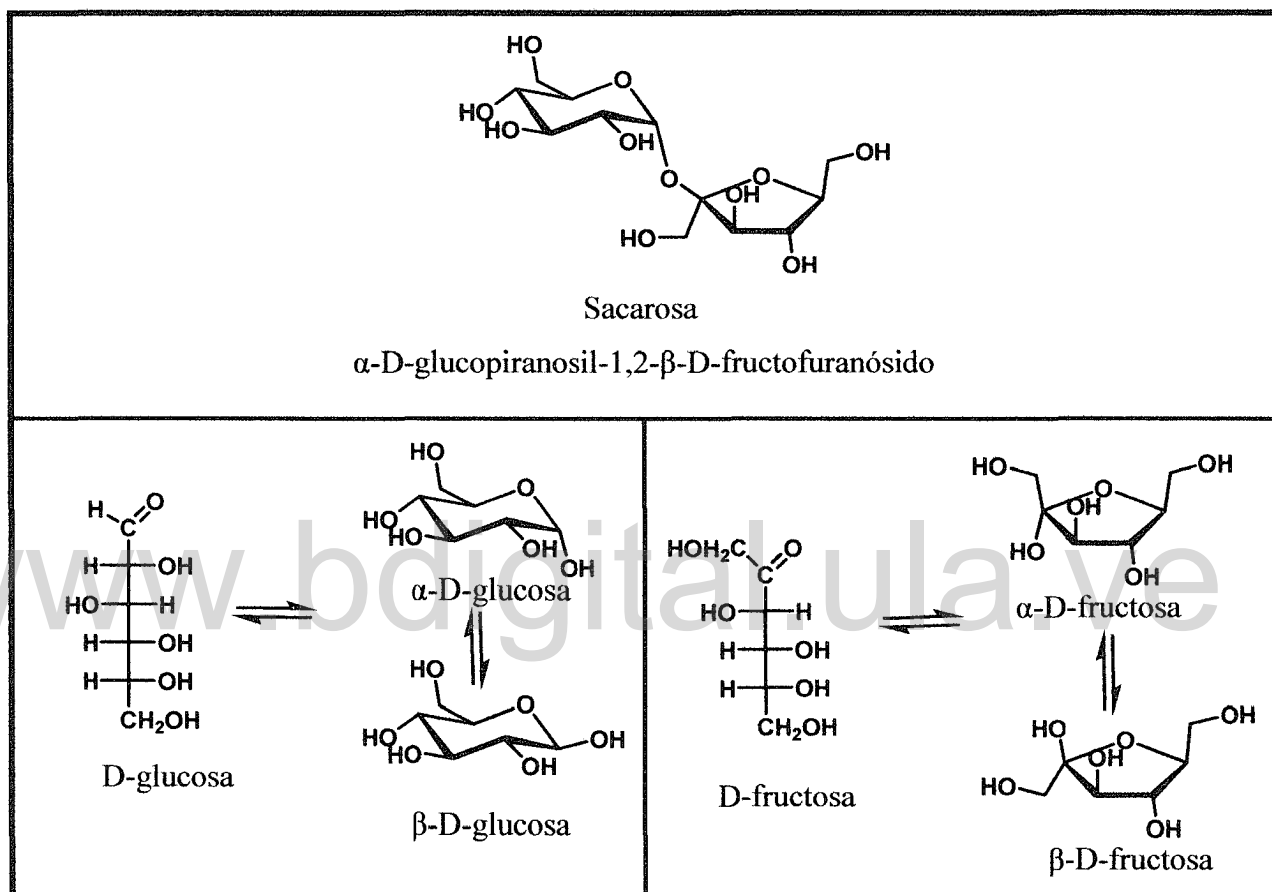


Figura 6. Los sitios más probables para la unión entre la fructosa y la hemoglobina (Bose *et al*, 2008).

II.4.2.2 La sacarosa (Sac) ($C_{12}H_{22}O_{11}$): azúcar común o azúcar de caña, es un disacárido no reductor, que consta de un residuo de α -D-glucopiranosil y un residuo de β -D-fructofuranosil unidos covalentemente por sus respectivos átomos de carbono anomérico (α -D-glucopiranosil-1,2- β -D fructofuranósido), puede observarse en el Esquema 8.



Esquema 8. Formas abiertas y cerradas de la sacarosa una vez separadas las unidades de glucosa y fructosa (González *et al*, 2000; Wade, 1993).

Se puede decir que la sacarosa es una forma protegida y activada de D-glucosa (así como de D-fructosa), que desempeña un papel clave en el metabolismo de las plantas, para una amplia variedad de reacciones de síntesis (Monsan *et al*, 2009). Sus productos de hidrólisis generan una mezcla equimolar de fructosa y glucosa llamada azúcar invertida, que tiene mayor poder edulcorante.

En un estudio realizado con otros azúcares reductores tales como la galactosa y no reductores como la sacarosa, donde realizaron una alimentación inducida en ratas con una dieta enriquecida con estos dos azúcares, encontraron un aumento HbA_{1C} y un engrosamiento de la membrana basal que ocurre en ciertos tejidos en la diabetes mellitus (Powell *et al*, 1982).

Los experimentos han demostrado que un elevado consumo de sacarosa producen no sólo la amplia gama de anomalías observadas en las enfermedades del corazón (arteriosclerosis), sino también un aumento de la concentración en sangre de insulina (Yudkin, 1978), resistencia a la insulina (Ribeiro *et al*, 2005), retinopatía (Papachristodoulou *et al*, 1976), alteraciones renales, aumento de la urea y disminución del nivel de óxido nítrico (NO) (Amin *et al*, 2011).

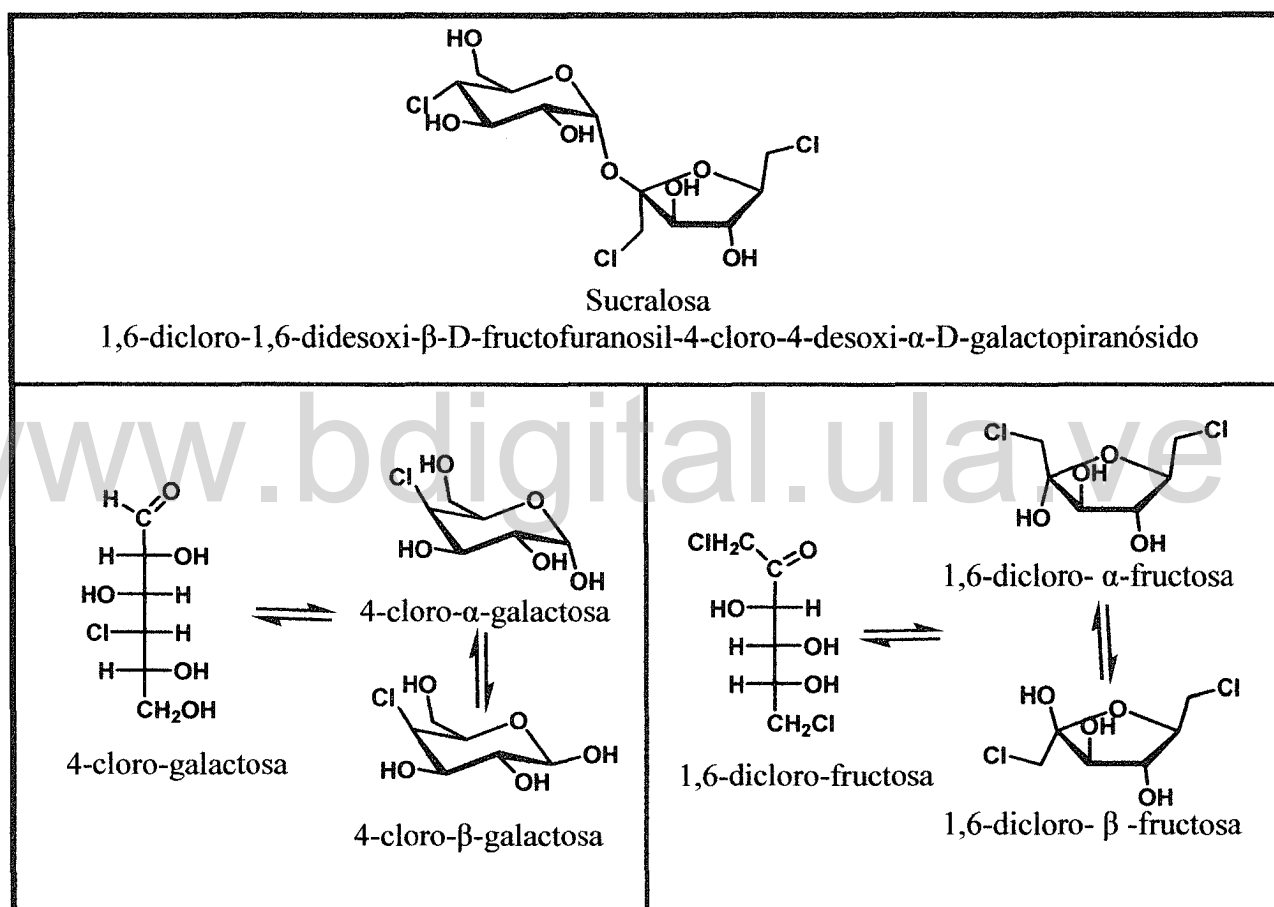
El alto consumo de sacarosa y de grasas induce a una rápida aparición de la obesidad relacionada con el síndrome metabólico debido posiblemente a la rápida respuesta de formación de ácidos grasos y la secreción de insulina (Yang *et al*, 2012), además el deterioro, la actividad vascular, el estrés oxidativo disminuyen la capacidad de respuesta vasodilatadora (Sweazea *et al*, 2010).

II.4.2.3 La sucralosa (Suc) ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$): es un edulcorante descubierto en 1976, por los investigadores del Queen Elizabeth College de la Universidad de Londres. En 1998, la Administración de Alimentos y Medicamentos aprobó la sucralosa para su uso en los Estados Unidos como un edulcorante artificial no calórico. A diferencia de otros edulcorantes artificiales, este compuesto se deriva y tiene un sabor similar a la sacarosa (Wiet *et al*, 1997).

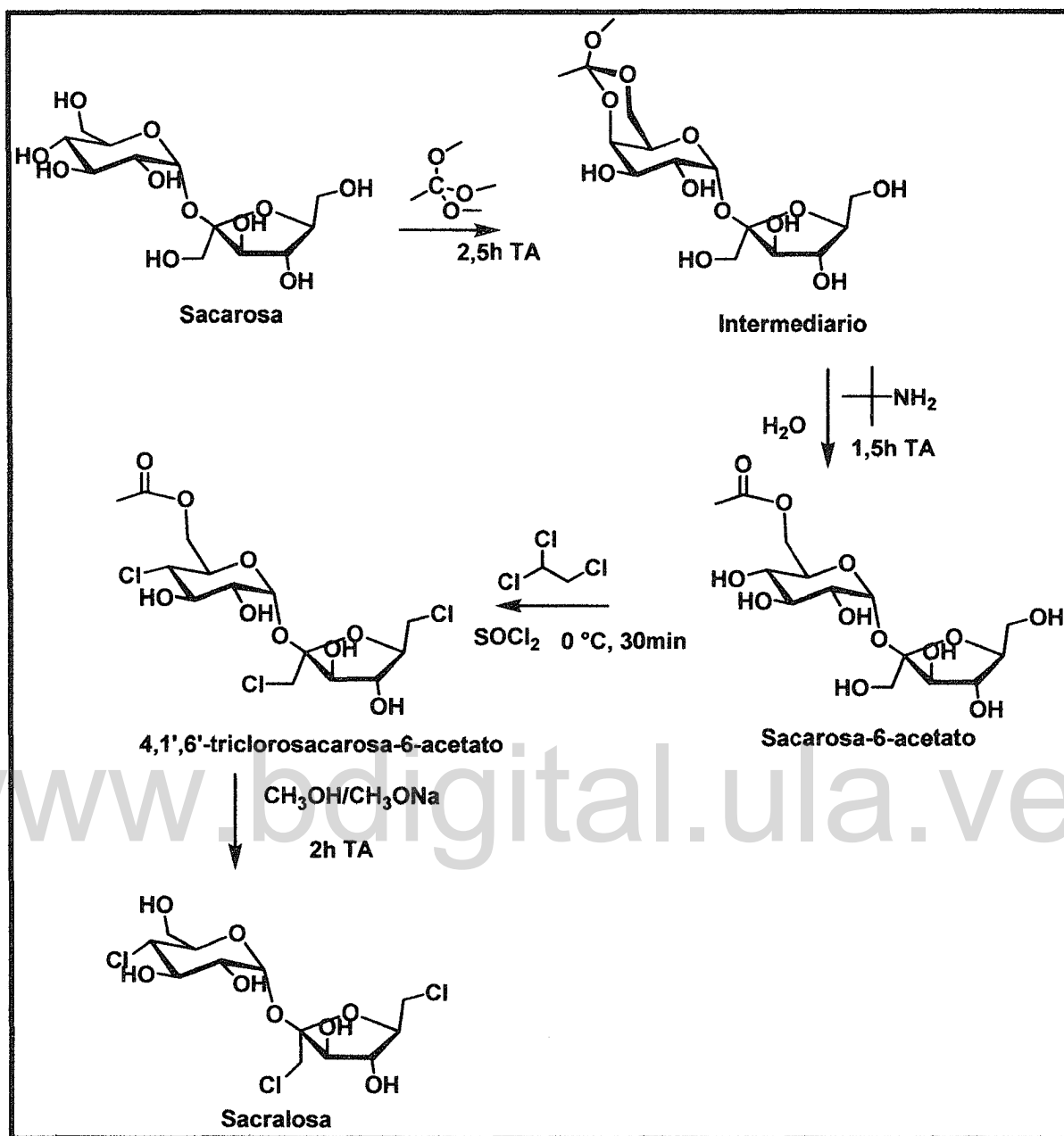
La sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi- β -D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi- α -D-galactopiranosido) observada en el Esquema 9, se forma reemplazando tres grupos hidroxilos de una molécula de sacarosa por tres átomos de cloro. La cloración estabiliza la molécula de sucralosa, que evita que se degrade o se metabolice (Roberts *et al*, 2000; Sims *et al*, 2000). Esto hace que sea aproximadamente 600 veces más dulce que la sacarosa (Wiet *et al*, 1997).

Siendo sin duda alguna, uno de los mejores edulcorantes artificiales desarrollado en los últimos tiempos, es el más competitivo y efectivo en la actualidad (Tian, 2006; Yan, 2004;

Luo *et al*, 2008). Se han explorado muchos métodos para el desarrollo de la sucralosa, tales como la monoesterificación, la biosíntesis, la cloración de derivados de la sacarosa entre otros (Chen, 2007; Kang, 2006). Así como también la síntesis de la sucralosa a partir de sacarosa como material de partida de acuerdo a los siguientes pasos: primero la síntesis de sacarosa-6-acetato de etilo, luego la cloración y finalmente desacetilación como se representa en el Esquema 10 (Luo *et al*, 2008).



Esquema 9. La sucralosa y sus productos de hidrólisis (Morlock *et al*, 2007).



Esquema 10. Síntesis de la sucralosa a partir de la sacarosa (Luo *et al*, 2008).

Sin embargo la sucralosa bajo determinadas condiciones de almacenamiento, extrema acidez y altas temperaturas, puede hidrolizarse parcialmente, generando los monosacáridos 4-cloro-galactosa y 1,6-dicloro-fructosa (Morlock *et al*, 2007), observados en el Esquema 9. Estos productos tienen disponible un grupo carbonilo y pudieran reaccionar con los grupos aminos terminales de la hemoglobina, generando productos de glucación avanzada.

Por otra parte, pruebas toxicológicas indica que la sucralosa no tiene efectos teratogénicos, toxicológicos, reproductivos, cancerígenos así como también no presenta alteraciones en el nivel de azúcar en la sangre de los animales y en la secreción de insulina (Gao, 2004)

Aunque los resultados apoyen que el consumo a corto y largo plazo de sucralosa no afecta la concentración de glucosa en sangre (Mezitis *et al*, 1996) y no presenta variación en la HbA_{1c} en pacientes con diabetes (Grotz *et al*, 2003), es factible realizar un estudio individual con la hemoglobina y este edulcorante durante un periodo de tiempo, para confirmar su posible interacción con dicha proteína.

II.5 Importancia de las plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes Mellitus

Las plantas medicinales se han utilizado, desde la antigüedad en casi todas las culturas para la prevención y tratamiento de las enfermedades. Se estima que aproximadamente entre 80-85% de la población tanto en los países desarrollados y en desarrollo dependen de la medicina tradicional y se supone que una parte importante de la terapia tradicional implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Ignacimuthu *et al*, 2006; Tomlinson *et al*, 1998).

Diferentes especies de plantas medicinales eran utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus, antes del descubrimiento de la insulina por Banting y Best en 1922, las únicas opciones eran basadas en las prácticas tradicionales. Los principios activos de muchas especies de plantas han sido aislados para uso directo como fármacos, tal es el caso de la metformina, que es un fármaco aprobado para el tratamiento de la diabetes mellitus obtenido de la planta *Galega officinalis* L. (Fabaceae) 1753, de la Figura 7. (Eshrat, 2002, Oubre *et al*, 1997).

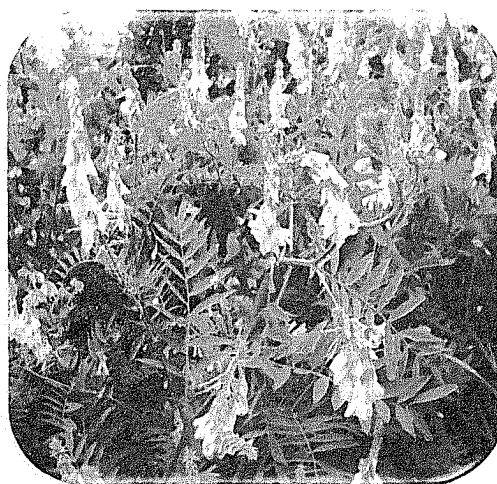


Figura 7. *Galega officinalis* L. (Fabaceae) 1753.

Tomada de Etnobotania.com.

Se han reportado estudios que la planta *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae) 1953. “Casco de vaca” (Figura 8) presenta inhibición de la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina (De los Ríos, 1998). En la actualidad la planta utilizada para el tratamiento de las complicaciones de la diabetes es la *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) (Gregersen *et al*, 2004; Li *et al*, 2004). Ya que presenta una alta efectividad en la reducción de los niveles de glucosa en sangre.



Figura 8. *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae) 1953. “Casco de vaca”

Tomada por: Johanna E Peña M

No se ha encontrado ningún reporte con la especie *Stevia rebaudiana* sobre la inhibición de glucación no enzimática de la hemoglobina, por tal motivo y debido a la importancia que tiene esta reacción en las personas con diabetes es factible realizar un estudio *in vitro* con el extracto de las hojas de *Stevia rebaudiana*, para lograr determinar la efectividad en el control y las complicaciones secundarias asociadas con la diabetes.

II.5.1 La *Stevia rebaudiana* Bertoni

La especie *Stevia rebaudiana* (Figura 9), pertenece a la familia Asteraceae, especialmente a la tribu Eupatorieae, es una de las familias más grandes que contienen aproximadamente una décima parte del número total de especies con flores, existen alrededor de 1700 géneros y unas 30.000 especies (Rendle, 1979), el género *Stevia* no solo comprenden hierbas, sino también arbustos y árboles. Su descripción taxonómica se puede observar en la Tabla 6.

La *Stevia rebaudiana* es originaria de zonas de selva tropical y subtropical de América del Sur (Brasil, Venezuela, Colombia y Paraguay). (Kinghorn *et al*, 1991) y América Central.



Figura 9. *Stevia rebaudiana* Bertoni
Tomada por: Johanna E Peña M.

Se encuentra en una amplia gama de áreas, se desarrolla entre los 500 a 3500 metros de altitud, por lo general crecen en zonas semiáridas, terrenos montañosos, con un pH entre 5 a 7, los pH alcalinos no son favorables y una temperatura entre -6 a +43 ° C (De Oliveira *et al*, 2004). Es una hierba pequeña de 40 a 80 cm de altura, generalmente 50 cm, con raíces

vivaces, tallo sub leñoso, débil y con pocas ramificaciones terminales coronadas por panículas, teniendo 2 a 6 flores pequeñas con corola de lóbulos blancos, alargados y abiertos.

Durante siglos, los indios guaraníes en Paraguay y Brasil utilizaban las especies de *Stevia*, principalmente *Stevia rebaudiana*, llamada por ellos Ka'a He'ê (hierba dulce), como edulcorante, del té verde medicinal para el tratamiento de afecciones estomacales y otras dolencias (Vanek *et al*, 2001). Aunque existen más de 200 especies del género *Stevia*, la *rebaudiana*, es la más dulce (Savita *et al*, 2004).

Fue estudiada en 1887 por el botánico Suizo Moisés Bertoni en colaboración con el Químico Paraguayo Ovidio Rebaudi, esta planta fue llamada originalmente *Eupatorium rebaudianum* y luego fue reasignada en el año 1905 al género *Stevia* desde entonces, el mundo entero ha empezado una serie de investigaciones referente a la *Stevia*, descubriendo innumerables beneficios para la salud.

Tabla 6. Descripción taxonómica de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (1905)

Taxonomía de la <i>Stevia rebaudiana</i>	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Superorden	Asteranae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Eupatorieae
Género	<i>Stevia</i> Cav.
Especie	<i>Stevia rebaudiana</i>
Tomado y modificado de trópicos.org., 2012	

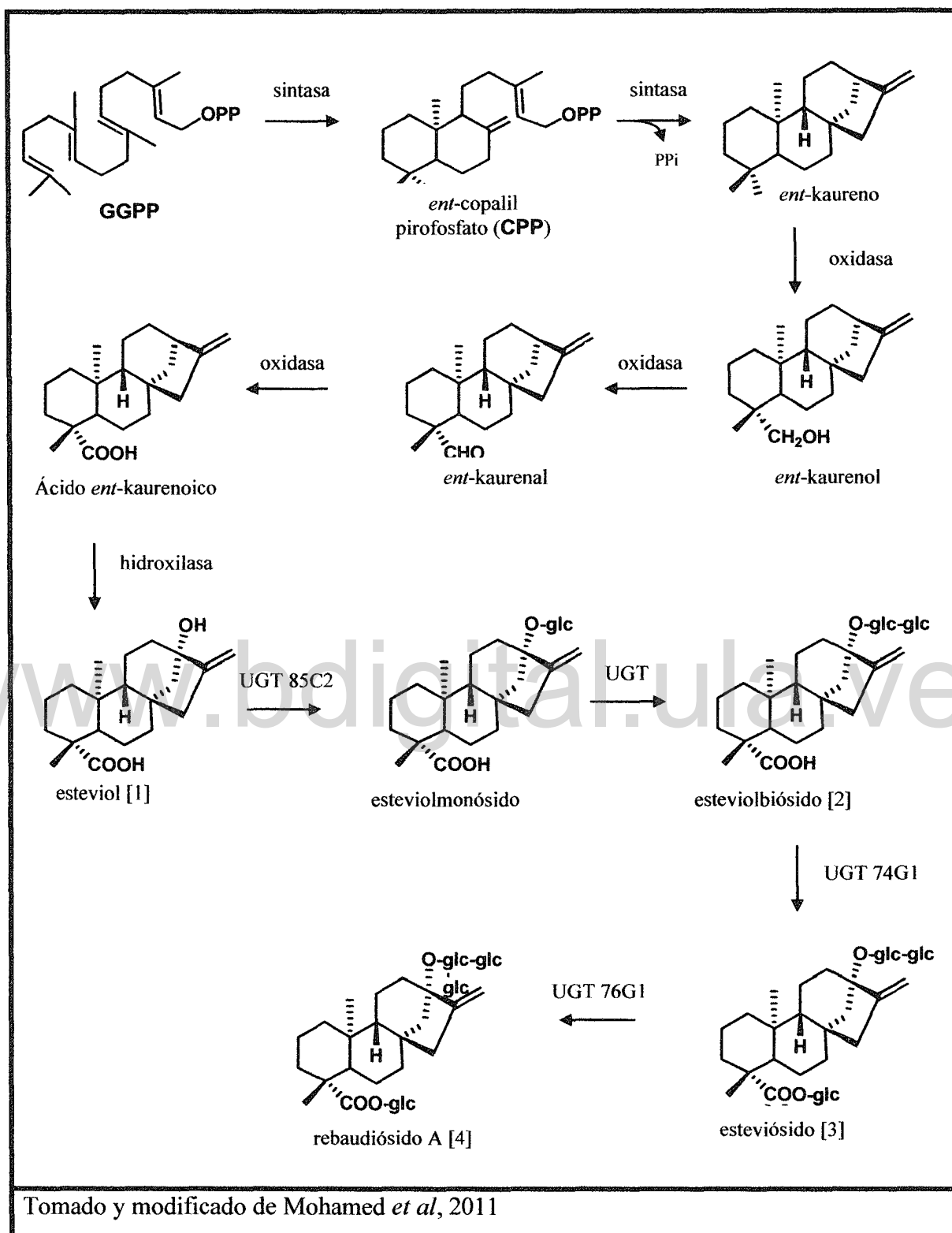
II.5.2 Ruta biosintética de los principales productos naturales

Las especies vegetales biosintetizan diversos productos naturales mediante reacciones orgánicas y son asistidas por catalizadores enzimáticos, éstas incluyen primordialmente: oxidaciones, eliminaciones, alquilaciones, reducciones y reordenamientos (Kumar *et al*, 2005). Estos productos naturales se dividen en metabolitos primarios y secundarios, los primarios son esenciales para la vida, entre ellos se encuentran los carbohidratos, las proteínas, las grasas y los ácidos nucleicos, mientras que los metabolitos secundarios se generan de forma más limitada, algunos son únicos y particulares de ciertas especies (Stanforth, 2006). Los metabolitos secundarios se clasifican según su estructura química en: alifáticos de cadena abierta como las grasas, cicloalifáticos como los terpenos, los flavonoides, entre otros.

Por lo general todos los diterpenos glicósidos de esteviol, se sintetizan a partir del geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (ver Esquema 11), con la enzima sintasa, primero por una protonación que inicia la ciclación del ent-copalil pirofosfato (ent-CPP). A continuación, el ent-kaureno se produce a partir del ent-CPP por ciclación catalizada por la sintasa.

El ent-kaureno posteriormente se oxida enzimáticamente en una reacción de tres pasos para generar ácido ent-kaurenoico. A partir de ácido ent-kaurenoico, por hidroxilación enzimática directa en el carbono 13 se forma el esteviol [1], este se convierte posteriormente en los diferentes glicósidos de uridina difosfato dependientes glicosiltransferasas (UGT) (Humphrey *et al*, 2006; Richman *et al*, 1999, 2005).

La UGT se encuentra en todos los organismos vivos, que catalizan la transferencia de glicósidos, activado un donante y un aceptor moléculas de glucosa, para formar un enlace glicosídico (Campbell *et al*, 1997). La adición de la glucosa en el carbono 13 del esteviol, es catalizada por UGT85C2 que genera estevilmonóxido, otra adición de glucosa por la UGT en el carbono 2' de la glucosa anterior, en el carbono 13 forma el esteviolbiosido [2], seguidamente la adición de glucosa en el carbono 19 por UGT74G1 genera el esteviósido [3] y finalmente para obtener el rebaudiósido A [4] hay una glucosilación el carbono 3' de la glucosa en la posición carbono 13 catalizada por UGT76G1 (Richman *et al*, 2005; Brändle *et al*, 2007).

Esquema 11. Ruta biosintética de los glicósidos de esteviol en la especie *Stevia rebaudiana*.

II.5.3 Algunos compuestos aislados de la *Stevia rebaudiana*

Los químicos franceses, Bridel y Lavieille en 1931, fueron los primeros en aislar de las hojas de *Stevia rebaudiana*, los glucósidos que le dan el sabor dulce. Estos glucósidos fueron nombrados como esteviósido [3] y rebaudiósido [4]. Los glicósidos son compuestos orgánicos, que contienen un componente de azúcar (glicona) y un componente no-azúcar (aglicona).

Las hojas de la *Stevia rebaudiana* contienen glucósidos diterpenoicos (Tabla 7), su contenido varía entre 4 y 20% del peso seco de las hojas y dependiendo de las condiciones del cultivo, el principal componente es el esteviósido [1], luego esteviolbiósido [2] (Kohda *et al*, 1976), y en menor proporción la rebaudiosida A-F [4-9] (Kohda *et al*, 1976; Sakamoto *et al*, 1977a, 1977b) y el dulcósido A [10] (Kobayashi *et al*, 1977), que son los responsables del típico sabor dulce (Kennelly, 2002).

Estos compuestos presentan una variedad en el sabor dulce, por degustación al compararlos con la sacarosa resultan ser: el esteviósido [3] es (300 veces más dulce), el rebaudiósido A [4] es (250 a 450 veces más dulce), el rebaudiósido B [5] (300 a 350 veces más dulce), el rebaudiósido C [6] (50 a 120 veces más dulce), el rebaudiósido D [7] (250 a 450 veces más dulce), el rebaudiósido E [8] (150 a 300 veces dulce), el esteviolbiósido [2] (100 a 125 veces más dulce) y el dulcósido A [10] (50 a 120 veces más dulce). (Thomas *et al*, 2010)

La dulzura relativa de estos diterpenos glucósidos parece estar reflejada en las diferencias de los residuos de carbohidratos en los carbonos 13 y 19 del esteviol (aglicona) que viene siendo la columna vertebral en la estructura de los esteviósidos (Chatsudthipong *et al*, 2009).

Tabla 7. Estructuras de esteviósidos y compuestos presentes en *Stevia rebaudiana*.

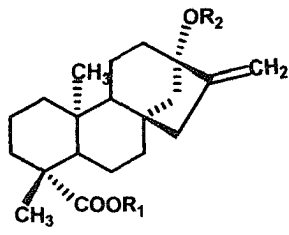
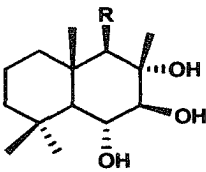
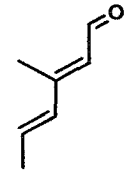
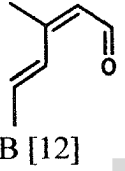
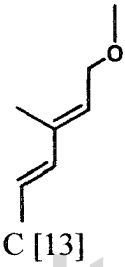
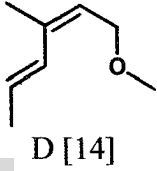
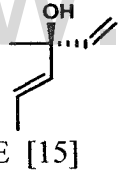
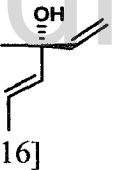
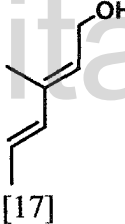
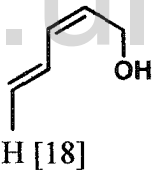
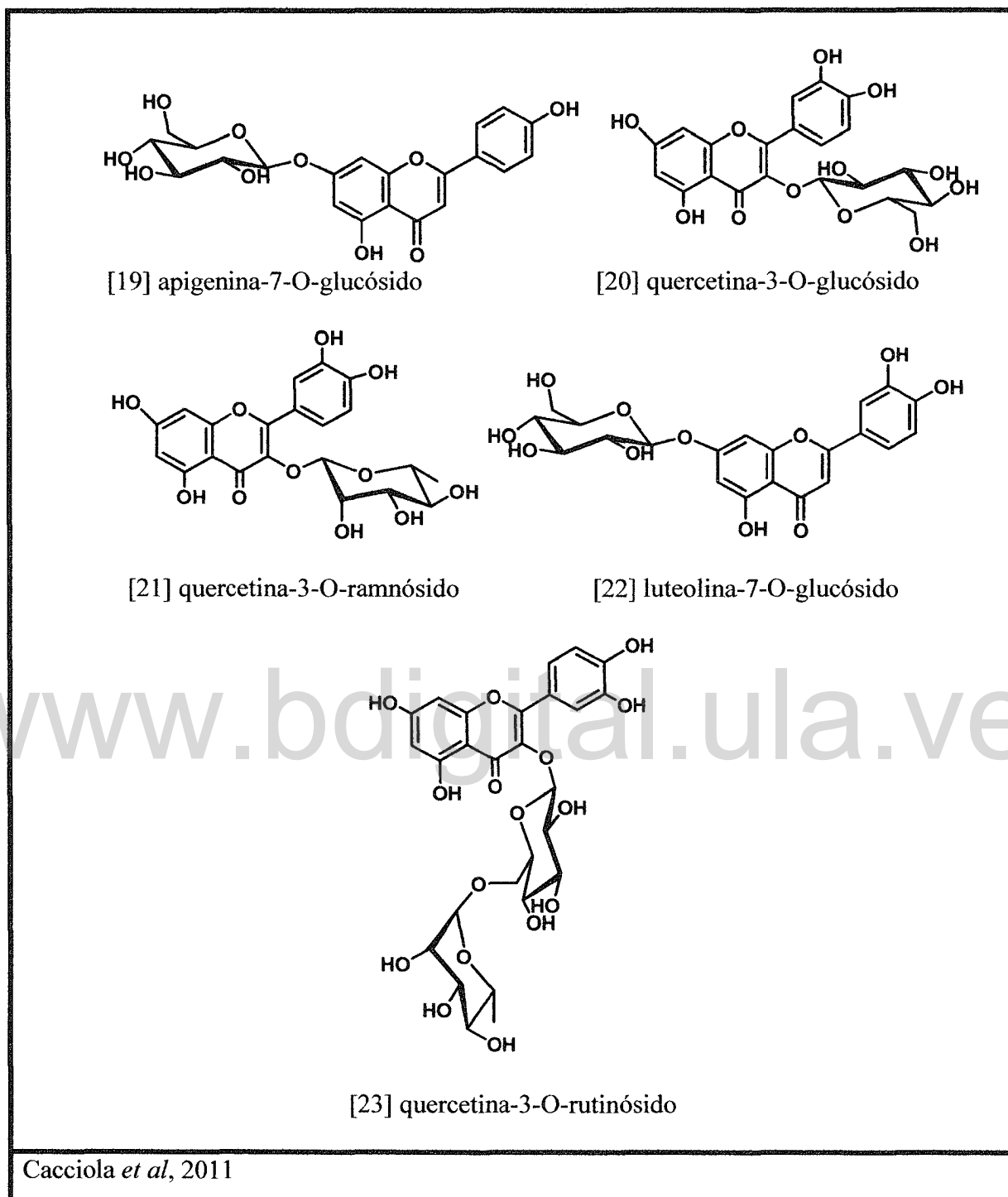
Glucósidos presentes en la <i>Stevia rebaudiana</i>		 Esteviósido	
Nombre del compuesto		R ₁	R ₂
[1]	Esteviol	H	H
[2]	Esteviolbíosido	H	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
[3]	Esteviósido	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
[4]	Rebaudiósido A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
[5]	Rebaudiósido B	H	β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
			β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
[6]	Rebaudiósido C (Dulcósido B)	β -Glc	β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
			β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
[7]	Rebaudiósido D	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
			β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
[8]	Rebaudiósido E	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
[9]	Rebaudiósido F	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
			β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
[10]	Dulcósido A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 $\rightarrow$ 1)
Geuns <i>et al</i> , 2003			

Tabla 8. Diterpenos no glucósidos del núcleo Labdano (esterbinos A-H) presentes en la *Stevia rebaudiana*.

Diterpenos no glucósidos del núcleo Labdano. Esterbinos A-H	 Esterbino
R=  A [11]  B [12]  C [13]  D [14]  E [15]  F [16]  G [17]  H [18]	
McGarvey <i>et al</i>, 2003	

Algunos de los metabolitos secundarios no dulces que han sido identificados a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana* son, diterpeno tipo Labdano (por ejemplo, los esterbinos A-H [11-18] (McGarvey *et al*, 2003) (Tabla 8), flavonoides apigenina-7-O-glucósido [19], quercetina-3-O-glucósido [20], quercetina-3-O-ramnósido [21], luteolina-7-O-glucósido [22] y quercetina-3-O-rutinósido [23] (Cacciola *et al*, 2011) (Figura10).

Figura 10. Flavonoides presentes en la *Stevia rebaudiana*

II.5.4 Actividad antihiperglicemiante de la *Stevia rebaudiana*

Diversas investigaciones se han realizado sobre la *Stevia rebaudiana*, para comprobar su alta efectividad en la regulación de azúcar en la sangre tanto en animales experimentales como en personas con diabetes mellitus y se han reportado estudios con las hojas pulverizadas, los extractos de *Stevia rebaudiana*, en diferentes solventes orgánicos y con algunos de sus principales compuestos químicos aislados:

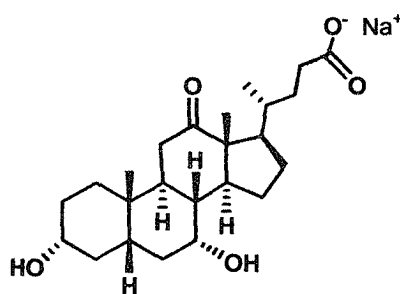
Estudios realizados en animales de experimentación:

- Las hojas pulverizadas mezcladas con agua destilada de *Stevia rebaudiana* fueron administradas en ratas diabéticas, encontrando una disminución del azúcar en sangre a medida que se aumentaba la cantidad del polvo de *Stevia rebaudiana* pero no superó su efecto al compararlo con Glimepirida (Amaryl®) (Figura 4) (Sumon *et al*, 2008). La utilización de diferentes fracciones (éter de petróleo, acetato de etilo y cloroformo) de extracto etanólico de hojas de *Stevia rebaudiana* aplicado en ratas diabéticas, presentan mejor actividad antihiperglicemiante que metformina (Figura 4), (Hossain *et al*, 2011).
- Para determinar si el esteviósido [3] *in vivo* ejerce un efecto antidiabético en un modelo animal no obeso de diabetes tipo 2, las ratas Wistar Goto-kakizaki (GK). Se realizó prueba de tolerancia de glucosa con y sin esteviósido en ratas GK con diabetes anestesiadas, así como en ratas normales, obteniendo como resultado que el esteviósido [3] ejerce una acción antidiabética, insulínica, y glucagonostática en este modelos de ratas y puede tener el potencial de convertirse en un nuevo fármaco contra la diabetes tipo 2 (Jeppesen *et al*, 2002). El tratamiento a largo plazo por vía oral con esteviósido mejora la primera fase de la respuesta insulínica, suprime los niveles de glucagón y mejora la presión arterial en la rata diabética (GK) (Jeppesen *et al*, 2003).

- Para conocer el impacto del esteviósido y su aglicón esteviol sobre la liberación de insulina se realizaron pruebas en los islotes pancreáticos incubados en presencia de glucosa en ratones normales y la línea de β -células INS-1.

Los efectos insulíntrópicos de esteviósido y el esteviol eran críticamente dependiente de la concentración de glucosa, observando que el esteviósido y el esteviol estimulan la secreción de insulina a través de una acción directa sobre las células beta (Jeppesen *et al*, 2000), así como también el rebaudiósido A [4] estimula la secreción de insulina de una manera dependiente de la glucosa y la secreción de insulina sólo se potenció en la glucosa mayor a 6,6 mM, encontrándose también un efectos insulíntrópico (Abudula *et al*, 2004).

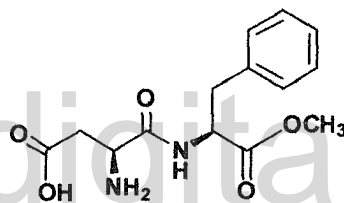
- Un estudio con un grupo de ratones sometidos a cuatro días de tratamiento con dos productos de *Stevia* comercial (*Stevia* en polvo blanco; Stevita Co., Inc., Arlington, Texas (*Stevia*) y esteviósidos líquido claro, Stevita Co., Inc., una base de suplemento de plantas, un producto de Brasil, (esteviósido) y sal sódica del ácido monocetocolico (MKC) [24], reportó una disminución de la concentración de glucosa en comparación con el grupo control y con el grupo tratado previamente solo con los productos de *Stevia* comercial (Raskovic *et al*, 2004).



Sal sódica del ácido monocetocolico (MKC) [24]
3 α , 7 α , dihidroxi-12-ceto-5 β colanato

Una mezcla del esteviósido y el MKC [24], administrado a través de la bomba osmótica en ratas, mostró una disminución de los niveles de glucosa en la sangre, tanto en ratas con niveles normales de glicemia y en diabéticas. MKC [24] exhibió un efecto significativo en la potenciación de la acción hipoglucémica con esteviósido y un aumento de las concentraciones séricas de péptido C como un indicador de la secreción de insulina (Raskovic *et al*, 2007).

- Comparando los efectos del consumo de esteviósido (como un edulcorante natural) y el aspartame [25] (edulcorante artificial), fue probado a diferentes dosis de los esteviósidos encontrando que en los parámetros bioquímicos de ratas normales fue siempre dentro de su rango normal, por el contrario, diferentes dosis de aspartame [25] tiene un notable efecto adverso sobre los niveles de la acetilcolinesterasa incluso en ratas normales (Agamy *et al*, 2009)



Aspartame [25]

Estudios realizados con personas.

- En un experimento, con 60 voluntarios que recibieron el esteviósido [3] puro a partir 27,7 a 110,8 mg al día, comprobó que la concentración de *Stevia rebaudiana* en dosis normales de edulcorante podría ser utilizada sin ninguna restricción por las personas normales e incluso por los diabéticos (Boeckh-Haebisch, 1992).
- Extracto de *Stevia rebaudiana* con un contenido de 91% de esteviósido [3] puro, 4% de rebaudiósido A [4], y 5% de esteviósido y otros derivados, fue suministrado en una comida de prueba estándar a doce pacientes con diabetes tipo 2 con enfermedad aguda, administrando 1 gramo de los esteviósidos (grupo experimental) y 1 gramo de almidón de maíz (grupo control), encontrando que reduce los niveles de glucosa en

sangre postprandial. (Gregersen *et al*, 2004) y no afecta a la insulinemia en ayunas (Chen *et al*, 2006; Xiao *et al*, 2005). La evidencia de los estudios preclínicos sugieren que el esteviósido [3] mejora tanto la secreción de insulina como la sensibilidad a la insulina, esto puede estar relacionado con la inhibición de la expresión hepática y gluconeogénesis (Chen *et al*, 2005; Yang *et al*, 2009).

Se ha establecido que tanto la administración intravenosa, así como por vía oral de esteviósido ejerce acciones antidiabética, insulínica y glucagonostática (Mogra *et al*, 2009). En conjunto, está demostrado que la administración oral de esteviósido mejora la sensibilidad a la insulina, y parece adecuado como un complemento en el tratamiento de los pacientes diabéticos y en aquellas personas que consumen grandes cantidades de fructosa (Chang *et al*, 2005).

- Un estudio evaluó los efectos del consumo crónico de rebaudiósido A [4] de 1000 mg durante 16 semanas, en un grupo hombres y mujeres entre 33 y 75 años con diabetes mellitus tipo 2. Los niveles de hemoglobina glucada, glucosa en ayunas, péptido C, la presión arterial, peso corporal, lípidos en ayunas y glicemia, no fueron significativamente diferentes entre el grupo tratado con rebaudiósido A [4] y el grupo tratado con placebo, sugiriendo que a concentraciones crónicas el rebaudiósido A [4] no altera la homeostasis de glucosa o de la presión sanguínea en los individuos con diabetes mellitus tipo 2 (Maki *et al*, 2008).

Además de tener la *Stevia rebaudiana* actividad antihiperlipémica (Gregersen *et al*, 2004), también presenta actividad antihipertensiva (Chan *et al*, 2000), actividad antioxidante (Xi *et al*, 1998), su extractos crean defensas impidiendo el crecimiento de organismos patógenos que afectan el sistema inmunológico (Tomita *et al*, 1997). Tiene efectos antiinflamatorios sobre células epiteliales del colon (Chatsudthipong *et al*, 2009). No se ha reportado ningún efecto sobre la fertilidad, el apareamiento, el embarazo, el número de fetos, ni sobre el crecimiento de la descendencia tanto en animales como en seres humanos, (Geuns *et al*, 2003a, 2003b; n Mori *et al*, 1981; Oliveira *et al*, 1989; Yodyingyud *et al*, 1991).

III. Hipótesis

Si la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con los edulcorantes ocurre y la velocidad de reacción para la formación de la hemoglobina con estos edulcorantes es mayor que la reacción de la hemoglobina con la glucosa, dichos edulcorantes estarían contraindicados para los diabéticos. Además la especie *Stevia rebaudiana* pudiera presentar una posible inhibición en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina *in vitro*, debido a que han demostrado una alta efectividad en la reducción de los niveles de glucosa en sangre.

www.bdigital.ula.ve

IV. Objetivos

IV.1 Objetivos generales

1. Determinar si los edulcorantes o azúcares como la fructosa, sacarosa y sucralosa reaccionan con la hemoglobina al observar sus constantes de velocidad.
2. Ensayar una metodología *in vitro* para ver la efectividad de la *Stevia rebaudiana* en la disminución de la glucosa y posible inhibición en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina.

IV.2 Objetivos específicos

1. Estudiar el mecanismo de la hidrólisis ácida de la sacarosa y la sucralosa a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico y a concentraciones constantes del azúcar, midiendo la desaparición del azúcar por rotación óptica en función del tiempo de reacción a 37 °C.
2. Determinar las constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación de la hemoglobina a diferentes concentraciones del buffer fosfato y manteniendo constantes las concentraciones de fructosa, sacarosa y sucralosa, a 37 °C y pH 7,3.
3. Determinar las constantes catalíticas para la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina a distintas concentraciones de buffer fosfato manteniendo constantes las concentraciones de fructosa, sacarosa y sucralosa, a 37 °C y pH 7,3.
4. Determinar el efecto isotópico de solvente (k_{H_2O}/k_{D_2O}) en la reacción de hemoglobina con fructosa, sacarosa y sucralosa, a 37 °C y pH 7,3.
5. Determinar la efectividad del extracto acuoso de la especie *Stevia rebaudiana*, en la disminución de la glucosa.

6. Determinar la potencialidad del extracto acuoso de la planta *Stevia rebaudiana*, en la posible inhibición en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina.

www.bdigital.ula.ve

V. Metodología

V.1 Reactivos

- Cloruro de Sodio NaCl. *Fisher Chemical Co*; PM (g/mol) = 58,44; Pureza = 100 %
- D-Glucosa 2-h. $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$. *Merck*; PM (g/mol) = 198,17; Pureza = 100 %
- D-fructosa $C_6H_{12}O_6$. *Merck*; PM (g/mol) = 180,16; Pureza = 100 %
- Sacarosa $C_{12}H_{22}O_{11}$. *HIMEDIA*, PM (g/mol) = 342,30; Pureza = 99,5 %
- Sucralosa $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$. PM (g/mol) = 397,64; Pureza = 100 %
- Edulcorante con sucralosa contenido: Maltodextrina 98,8% (Excipiente), Sucralosa 1,2 % (Edulcorante).
- *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. Proveniente de cultivo *in vitro*.
- Hemoglobina Humana cristalizada *Sigma Chemical Co*. PM (g/mol) = 64000.
- Fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 . *Riedel-de haën*; PM (g/mol) = 141,96; Pureza = 99,0 %
- Fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 . *Riedel-de haën*; PM (g/mol) = 119,98; Pureza = 99,0 %
- Kit para la determinación de hemoglobina glucada *Teco diagnostics*
 - Reactivo resina: 8 mg/ml de resina de intercambio catiónica y buffer pH 6,9.
 - Tubos separadores.
 - Reactivo lisante: 10 mM de cianuro de potasio KCN.
 - Patrón de hemoglobina glucada 10 %
- Kit para la determinación enzimática cuantitativa de glucosa. Método Gol-PAP 900. *BIOSCIENCE*
 - Enzima Glucosa oxidasa GOD
 - Solución de Fenol
 - Patrón de glucosa 100 mg/100 mL
- Agua 18 Ω
- Agua deuterada D_2O . *Sigma*, Pureza = 100 %

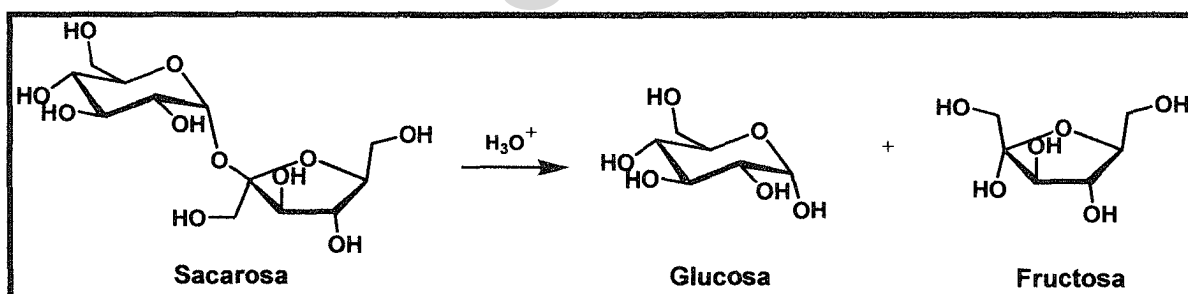
V.2. Equipos

- Baño termostático *Blue M*
- pH-metro *Orion 420 A Plus*
- Esterilizador por filtración Acrodiscos *Sartorius* 0,2 μm .
- Pipetas Automáticas *Wilson*
- Espectrómetro de Ultravioleta-Visible (UV-V): *Lamda 2. Perkin Elmer*
- Polarímetro automático digital, *Rudolf Research*, modelo Autopol III, equipado con celdas termostatzadas de 100 mm y de 6,0 mL
- Sistema de liofilizado *LABCONCO*

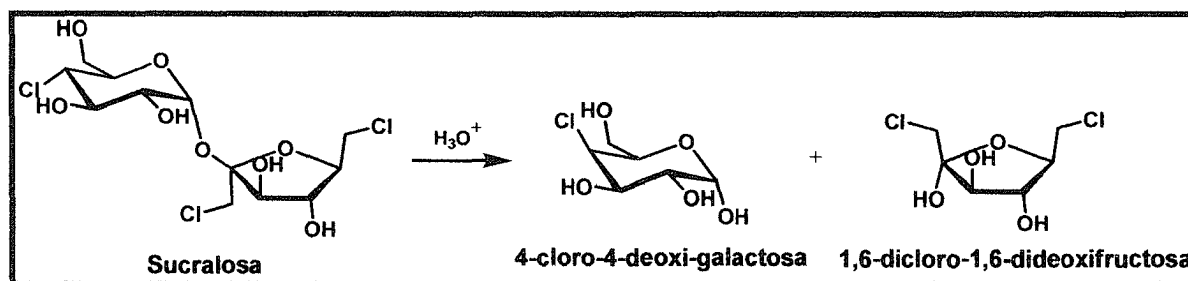
V.3 Desarrollo experimental

V.3.1 Hidrólisis de la sacarosa y la sucralosa.

La hidrólisis de la sacarosa ocurre por dos vías, una enzimática y la otra catalizada por ácidos. Se realizó un estudio cinético de la hidrólisis de la sacarosa y sucralosa a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl).



Esquema 12. Hidrólisis de la sacarosa (Moore *et al*, 1976),



Esquema 13. Hidrólisis de la sucralosa (Morlock *et al*, 2007).

Se utilizó la técnica de polarimetría para observar el mecanismo de hidrólisis de los azúcares que son compuestos ópticamente activos, el polarímetro es un instrumento que mide la rotación del plano de la luz polarizada, tiene una celda donde se agrega la solución del material ópticamente activo y un sistema para pasar la luz polarizada a través de la solución, y para medir la rotación de la luz que emerge (Figura 11). En el polarímetro, primero se filtra la luz de una lámpara de sodio, de tal modo que consiste solo de una longitud de onda (de un solo color) (Wade, 1993).

Esto es necesario porque la mayor parte de los compuestos hacen girar cantidades distintas a diferentes longitudes de onda, la que se usa con mayor frecuencia en polarimetría es una de las líneas amarillas de emisión en el espectro de sodio, llamada línea D de sodio. Una lámpara de sodio con un filtro amarillo da luz monocromática (de un solo color) para polarimetría (Wade, 1993).

La luz monocromática de la fuente pasa a través de un filtro que polariza la luz en el plano conocido. La luz polarizada pasa entonces a través de la celda de la muestra, que contiene una solución del compuesto ópticamente activo. Al dejar la celda de la muestra, la luz polarizada encuentra otro filtro polarizante. Este filtro es giratorio, y tiene una escala que permite al operador leer el ángulo entre su eje de polarización y el eje respectivo del primer filtro. El primer filtro se conoce como polarizador y el segundo como analizador. Se hace girar el filtro analizador hasta que se transmite la máxima cantidad de luz y a continuación se lee la rotación observada en la escala (Wade, 1993).

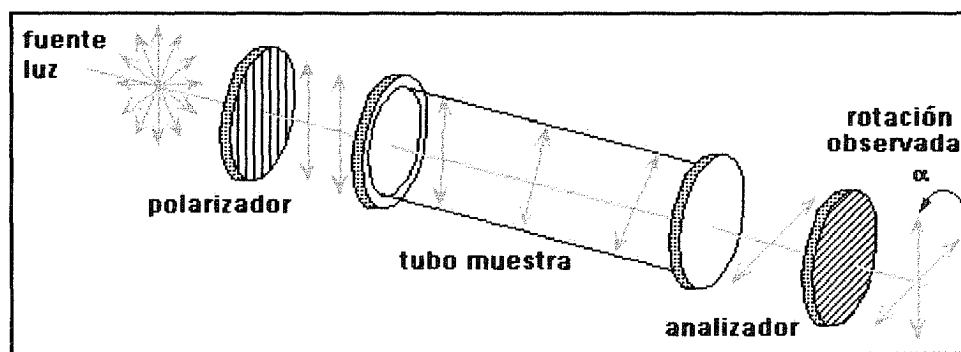


Figura 11. Diagrama esquemático de un polarímetro. Tomado de: quimica2bac.wordpress.com

Se estudió el mecanismo de la hidrólisis ácida catalizada de la sacarosa y la sucralosa, donde se varió la concentración ácido clorhídrico (HCl), se mantuvo constante la temperatura a 37°C y las concentraciones de los azúcares. Las medidas cinéticas se realizaron midiendo la desaparición concentración del azúcar a intervalos de tiempo donde fue medida la rotación óptica observada, esta depende de la concentración de la muestra en la solución, de la longitud de la trayectoria en la celda, y la fuerza de la actividad óptica del compuesto en este caso del azúcar (Wade, 1993)

La mezcla de reacción se preparó disolviendo 4 g del azúcar en 5 mL de agua 18 Ω en un balón de 10 mL luego, se le agregó 2 mL de HCl variando la concentración entre (2-8) N (Moore *et al*, 1976), esta reacción se transfirió rápidamente a la celda del polarímetro automático digital, *Rudolf Research*, modelo Autopol III donde fue medida su rotación óptica observada cada 5 minutos (min) durante 30 a 40 min.

Se determinaron las constantes k_1 y k_2 mediante las ecuaciones 3 y 2 respectivamente (Moore *et al*, 1976), utilizando el promedio de tres determinaciones cinéticas. Las constantes de velocidad se determinaron usando un procedimiento no lineal de mínimos cuadrados para la ecuación de primer orden.

$$\frac{d[Azúcar]}{dt} = -k_2[Azúcar][H_3O^+]$$

$$\frac{d[Azúcar]}{dt} = -k_1[Azúcar]$$

$$k_1 = -k_2[H_3O^+] \quad \text{Ec. 2}$$

$$\ln \frac{[Azúcar]}{[Azúcar]_0} = -k_1 t$$

$$\ln \frac{\alpha + 0,31\alpha_0}{1,31\alpha_0} = -k_1 t \quad \text{Ec. 3}$$

Para obtener la constante de hidrólisis k_1 se graficó el logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada en función del tiempo de acuerdo a La Ecuación 3.

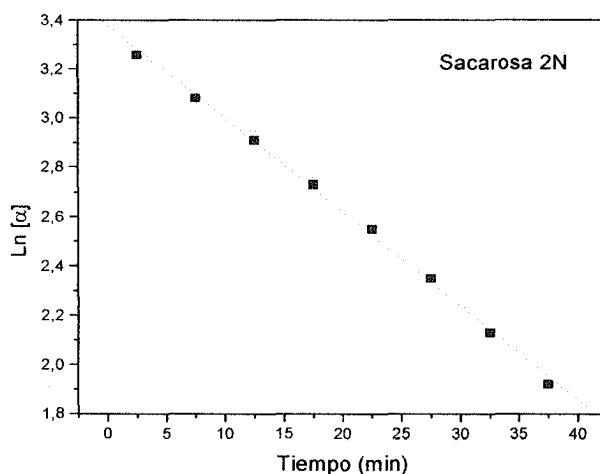


Gráfico 1. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada en función del tiempo en minutos (min).

La constante catalítica k_2 se obtuvo graficando la constante de hidrólisis k_1 en función de las concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) utilizando la ecuación 2. Observar Gráfico 2.

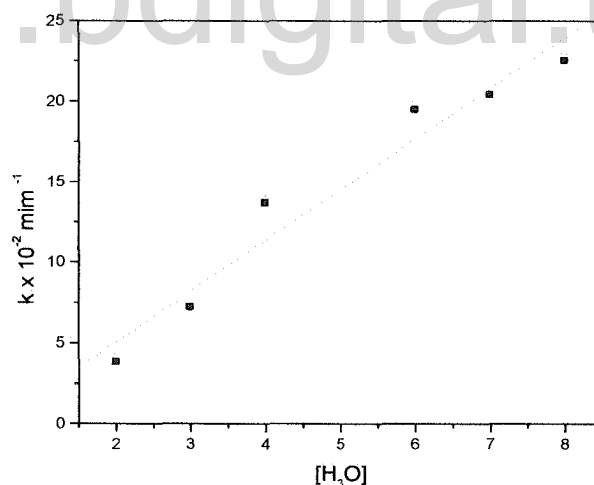


Gráfico 2. Constante de hidrólisis k_1 en función de las concentraciones de ácido clorhídrico (HCl).

V.4 Determinación de la reactividad de los edulcorantes fructosa, sacarosa y sucralosa con la hemoglobina.

Todas las soluciones fueron preparadas por separado a concentraciones fijas para cada azúcar y hemoglobina en 40 y $9,3 \times 10^{-2}$ mM respectivamente, 150 mM en cloruro de sodio

como estabilizador de la fuerza iónica. Las concentraciones que se utilizaron para el buffer fosfato fueron de 1,6; 3,2; 4,8; 6,4; 8,0 mM. Además se prepararon soluciones blancos o controles.

Las soluciones fueron preparadas en tubos de ensayo estériles *Vacutainer* con tapa hermética de goma, para la incubación de las soluciones se utilizó un baño termostatzado *Blue M* a 37 °C durante 3 días para la fructosa y para la sacarosa y sucralosa por 28 días. El pH de las soluciones fue regulado a 7,3 con un pHmetro marca *Orion 420 A Plus*. Todas las soluciones fueron esterilizadas por ultra filtración *Acrodiscos Sartorius* 0,20 µm, y todos los volúmenes de las mismas fueron medidos con pipetas automáticas *Willson*.

V.5 Determinación de la concentración de hemoglobina glucada

Las velocidades de glucación de la hemoglobina bajo atmósfera de aire fueron medidas monitorizando la aparición del producto glucado (HbA_{1C}). Las concentraciones de hemoglobina glucada (HbA_{1C}) se determinaron a diferentes tiempos de reacción; se tomaron en cada caso una alícuota de 100 µL de cada solución mediante una jeringa previamente esterilizada y haciéndola reaccionar con 500 µL del reactivo lisante (hemolizante) para detener la reacción.

La HbA_{1C} fue separada por cromatografía de intercambio iónico mediante el kit *Teco diagnostics* (Apéndice 3) y fue cuantificada por espectroscopia ultravioleta – visible, donde se utilizó el espectrofotómetro de UV-Visible *Perkin Elmer*, modelo Lambda 2, software PECSS a una longitud de onda de 415 nm y se midió la absorbancia para la HbA_{1C} y HbA total tanto para cada muestra en el intervalo de tiempo de reacción como para el patrón de HbA_{1C} al 10% (Ecuación 4 y 5).

Se cuantificó la formación de HbA_{1C} una vez obtenida la absorbancia de la HbA_{1C} y HbA total a diferentes intervalos de tiempo de reacción y las del patrón de HbA_{1C} mediante la siguiente relación:

$$R = \frac{\text{AbsHbA}_{1C}}{\text{AbsHbA}_{\text{total}}} \quad \text{Ec. 5}$$

Los valores de HbA_{1C} se expresaron en porcentaje % usando la siguiente ecuación:

$$\%HbA_{1C} = \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{Patrón}}} * [\text{Patrón}] \quad \text{Ec. 4}$$

Otra forma de calcular el porcentaje de HbA_{1C} formado durante la reacción sin la utilización del patrón de HbA_{1C} se realizó por la siguiente ecuación:

$$\%HbA_{1C} = \frac{AbsHbA_{1C}}{AbsHbA_{\text{total}} * F} * 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde: F es el factor de corrección del método empleado que equivale a 8,10, (Apéndices 1)

V.6 Determinación de las constantes cinéticas

➤ Las constantes de velocidad de pseudo primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina a diferentes concentraciones de buffer fosfato, fueron determinadas por un procedimiento no lineal de mínimos cuadrados utilizando la Ecuación 7 (ver Gráfico 3).

$$[HbA_{1C}]_t = [HbA_{1C}]_{\infty} + ([HbA_{1C}]_0 - [HbA_{1C}]_{\infty}) e^{-kt} \quad \text{Ec. 7}$$

En donde:

$[HbA_{1C}]_t$ = Hemoglobina glucada a tiempo t.

$[HbA_{1C}]_{\infty}$ = Hemoglobina glucada a tiempo infinito

$[HbA_{1C}]_0$ = Concentración inicial de la hemoglobina glucada.

k = constante velocidad.

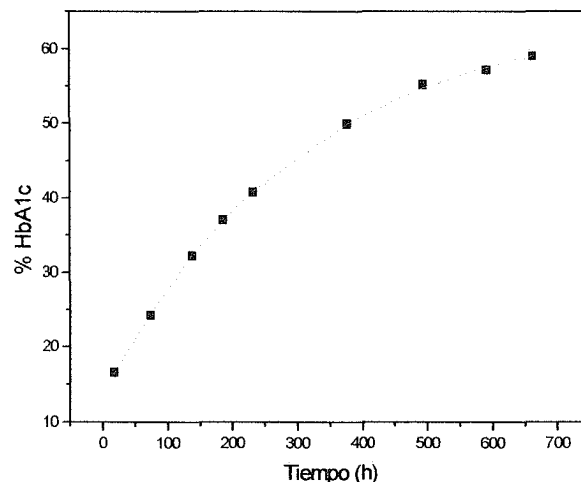


Gráfico 3. Concentración de HbA_{1c} en función del tiempo.

➤ Las constantes catalíticas, k_B se determinaron ajustando las constantes de pseudo primer orden (k_{obs}) que se tendrán a diferentes concentraciones del buffer mediante la Ecuación 1. Se utilizará el programa Origin, versión 5.0.

$$k_{obs} = k_o + k_B [X] \quad \text{Ec. 1}$$

En donde:

X = Concentración de buffer fosfato.

k_o = Constante de velocidad de la reacción no catalizada.

k_B = Constante de velocidad de la reacción catalizada.

Los valores obtenidos para la constante de velocidad k_{obs} se graficaron en función de la concentración del buffer obteniendo una línea recta, que refleja el mejor ajuste de los puntos al utilizar un procedimiento de regresión lineal (Gráfico 4). Donde el corte es la constante de velocidad de la reacción no catalizada, k_o y la pendiente es la constante de velocidad de la reacción catalizada, k_B . Usando el programa Origin, versión 5.0.

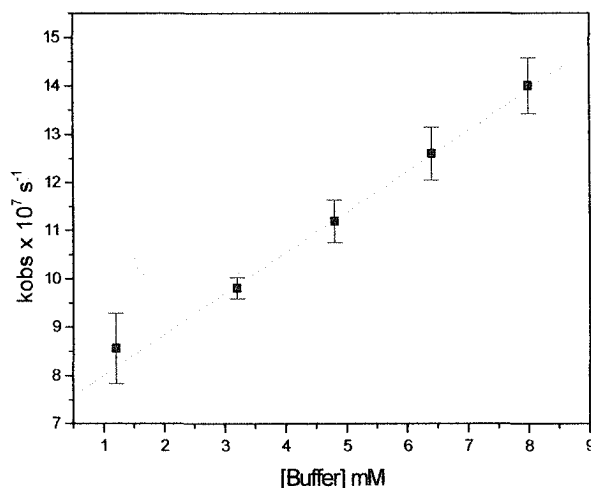


Gráfico 4. Constantes de velocidad en función de la concentración del buffer.

V.7 Metodología para observar la efectividad de la especie *S. rebaudiana* en la disminución de la glucosa y posible inhibición en la reacción

V.7.1 Recolección de la planta

Las hojas de la planta fueron recolectadas en el Laboratorio de Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, en los meses de Marzo y Abril de 2012. Del material vegetal se escogió una muestra testigo (*Voucher Specimen*), la cual se depositó en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. La especie fue identificada por el Profesor Pablo Meléndez como *Stevia rebaudiana* Bertoni, y la misma fue rotulada con el código 01 J. Peña (Figura 12).

V.7.2 Obtención del extracto acuoso

Las hojas secas y molidas de la especie *S. rebaudiana* se le realizó su extracción de la siguiente forma, por cada 20 g de hojas se agregó 100 mL de agua 18 Ω (Tedesse, 2008), se utilizó un total de 132,47 g de hojas secas y molidas en 662,35 mL de agua 18 Ω , se colocaron en una plancha de calentamiento a 60 °C durante 30 minutos para obtener una máxima extracción (Tedesse, 2008). Transcurrido este tiempo se separó el extracto acuoso

del material vegetal insoluble mediante filtración por gravedad, obteniéndose 450 mL del extracto acuoso. Parte del solvente se eliminó aplicando la técnica de destilación a presión reducida bajo temperatura que osciló entre 40 y 50 °C.



Figura 12. Partes aéreas y *Voucher Specimen* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Foto tomada por: Johanna E Peña M

V.7.3 Liofilización del extracto acuoso

Una vez concentrado el extracto se procedió a liofilizar, en el equipo marca *LABCONCO*, donde se congeló la muestra y posteriormente se metió en una cámara de vacío para que el agua se separara por sublimación. De esta manera se eliminó el agua desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido (Briceño *et al*, 1997). Se obtuvieron 40,78 g del liofilizado lo que corresponde a un rendimiento de extracción de 31%

V.7.4 Reactividad de la especie *S. rebaudiana* con la hemoglobina

Se procedió de la misma forma, como para la determinación de la reactividad de los edulcorantes con la hemoglobina en el aparatado V.4, pero en este caso se varió las concentraciones del liofilizado de la *S. rebaudiana* entre (5, 10, 20) mg/mL, la glucosa a 40

mM, el buffer fosfato 4,8 mM y la hemoglobina $9,3 \times 10^{-2}$ mM. Se tomaron dos porciones de la mezcla de reacción en intervalos de tiempo, una en donde se evaluó la disminución de la glucosa y la otra la inhibición de la glucación no enzimática de la hemoglobina durante los 28 días de reacción.

V.7.5 Evaluación de la inhibición de la glucación no enzimática de la hemoglobina

Se determinó el porcentaje de hemoglobina glucada siguiendo el punto V.5 y se utilizó también el método para la determinación cuantitativa de hemoglobina glucada (HbA_{1C}) en sangre humana *Teco diagnostics* (Apéndice 3), además se obtuvieron las constantes de velocidad observada y catalíticas siguiendo el método del apartado V.6, como se realizó para los azúcares.

V.7.6 Evaluación de la disminución de la glucosa

Se tomó una porción de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo, y fue tratada mediante el kit para la determinación enzimática cuantitativa de glucosa. Método Gol-PAP 900. *BIOSCIENCE*, que se detalla en el Apéndice 4.

VI. Resultados y discusión

VI.1 Pruebas de la hidrólisis ácida para la sacarosa, edulcorante con sucralosa comercial y sucralosa pura.

En las Tablas 10 se muestran los valores obtenidos del promedio de tres medidas realizadas de la rotación observada α para la sacarosa y el edulcorante con sucralosa a una concentración de 0,4 g/mL y para la sucralosa de 0,2 g/mL, la longitud de la celda es de 1 dm y se calculó la rotación específica $[\alpha]_D^{37}$ utilizando la ecuación 10.

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \times c} \quad \text{Ec. 10}$$

Dónde:

T = Temperatura

λ = Longitud de onda (línea D de sodio, 589 nm)

α = rotación observada

l = longitud de la celda de la muestra (dm)

c = concentración

Tablas 10. Rotación observada (α) y rotación específica $[\alpha]_D^{37}$ para la sacarosa, el edulcorante con sucralosa comercial y la sucralosa a 37 °C.

Edulcorante	Rotación Observada α	Rotación Específica $[\alpha]_D^{37}$	* Rotación Específica $[\alpha]_D^t$
Sacarosa	+ 25, 81	+ 64,52	+ 65,90
Edulcorante con sucralosa comercial	+ 66,63	+ 156,57	-
Sucralosa pura	+ 17,44	+ 87,20	+ 85,80

*Rotación específica reportada para la sacarosa a 25 °C (Budavri *et al*, 1989) y para sucralosa 20 °C (Mitchell *et al*, 2006).

Al comparar los resultados obtenidos de las rotaciones específicas de los edulcorantes con las rotaciones específicas reportadas se observa que son muy parecidos y se puede decir que se trabajó con compuestos puros sin embargo para el edulcorante con sucralosa comercial no se tiene un valor teórico para comparar dicho resultado.

VI.1.1 Hidrólisis ácida para la sacarosa

Desde la Tabla 11 a la 16 se muestran la rotación observada (α) de la hidrólisis de 0,4 g/mL de sacarosa, variando la concentración del ácido clorhídrico (HCl) entre (2-8) N a 37 °C, se realizaron las lecturas de rotación óptica cada 5 minutos (min) durante 30 a 40 min aproximadamente.

Tabla 11. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL con HCl 2 N a 37 °C

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
2:53	+ 26,05	3,26
7:53	+ 21,69	3,08
12:53	+ 18,39	2,91
17:53	+ 15,42	2,73
22:53	+ 12,80	2,55
27:53	+ 10,47	2,35
32:53	+ 8,46	2,13
37:53	+ 6,73	1,92

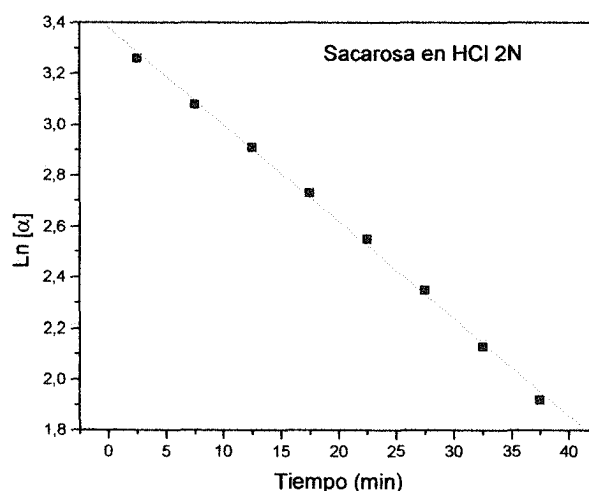


Gráfico 5. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa a 0,4 g/mL con HCl 2 N en función del tiempo a 37 °C.

Tabla 12. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL en HCl 3 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
2,24	+ 25,02	3,22
8,00	+ 18,98	2,94
12,24	+ 14,84	2,70
17,24	+ 10,87	2,39
22,24	+ 7,60	2,03
27,24	+ 4,91	1,59
32,24	+ 2,66	0,98

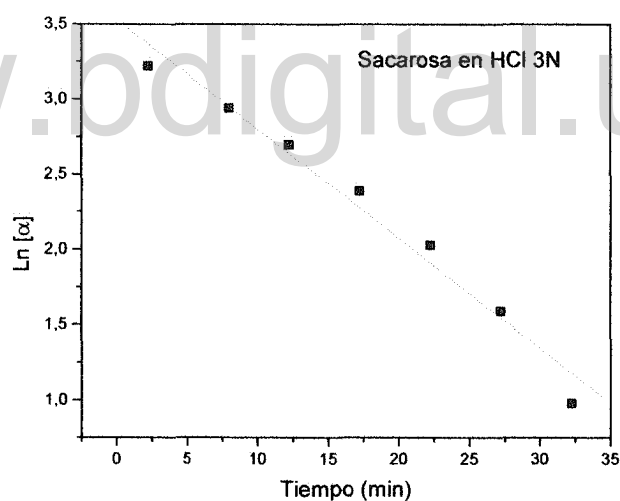


Gráfico 6. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de 0,4 g/mL de sacarosa con HCl 3 N en función del tiempo a 37 °C.

Tabla 13. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL con HCl 4 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
3,36	+ 22,01	3,13
7,36	+ 16,70	2,81
11,36	+ 11,46	2,44
15,36	+ 7,34	1,99
19,36	+ 4,32	1,46
23,05	+ 1,85	0,61
24,50	+ 1,17	0,16

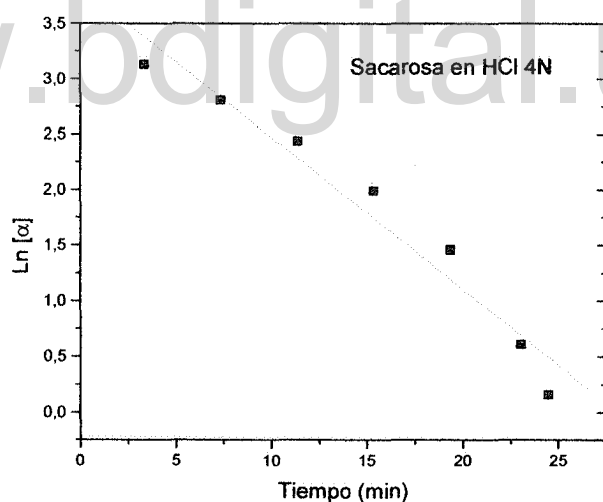


Gráfico 7. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa a 0,4 g/mL con HCl 4 N en función del tiempo a 37 °C

Tabla 14. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL en HCl 6 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
2,03	+ 22,57	3,15
6,03	+ 17,28	2,75
8,03	+ 12,62	2,49
11,03	+ 8,81	2,03
14,03	+ 3,12	1,42
16,03	+ 1,07	0,85

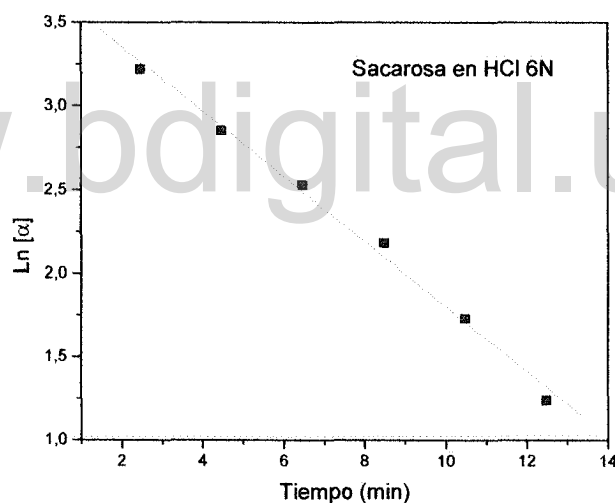


Gráfico 8. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 6 N en función del tiempo a 37 °C.

Tabla 15. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 7 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
2,12	+ 23,55	3,16
3,12	+ 19,64	2,98
4,12	+ 16,83	2,82
5,12	+ 14,17	2,65
6,12	+ 11,78	2,47
7,12	+ 9,60	2,26
8,12	+ 7,69	2,04
9,12	+ 5,95	1,78
10,12	+ 4,42	1,49

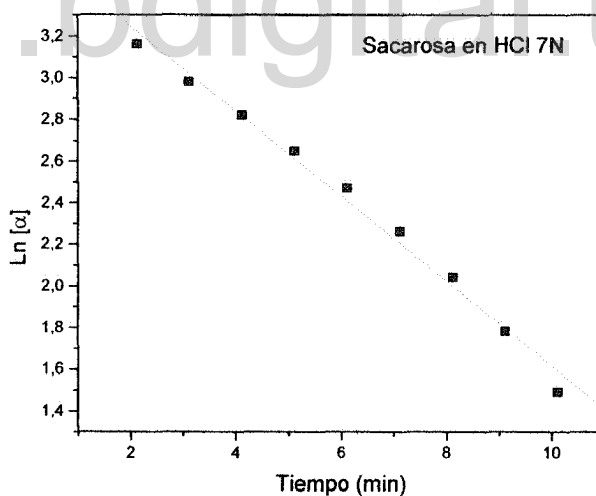


Grafico 9. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa a 0,4 g/mL con HCl 7 N en función del tiempo a 37 °C.

Tabla 16. Rotación observada (α) en función del tiempo de sacarosa 0,4 g/mL con HCl 8 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
2,02	+ 23,66	3,16
3,02	+ 20,98	3,04
4,02	+ 18,29	2,91
5,02	+ 15,65	2,75
6,02	+ 13,28	2,59
7,02	+ 11,17	2,41
8,02	+ 9,25	2,22
9,02	+ 7,50	2,01
10,02	+ 5,95	1,78
12,02	+ 3,39	1,22
14,02	+ 1,29	0,25

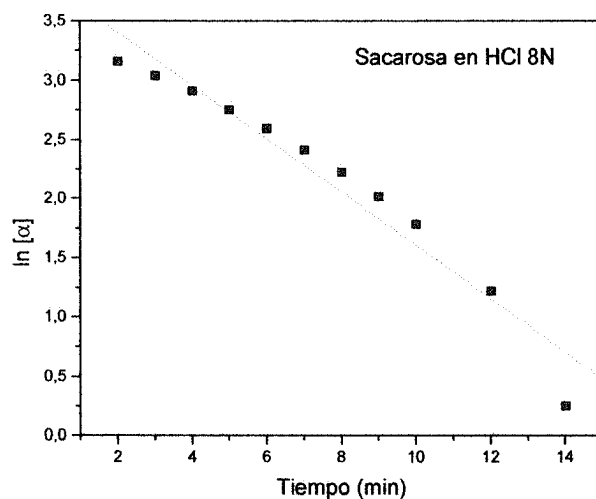


Gráfico 10. Logaritmo neperiano (Ln) de la rotación observada (α) en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL con HCl 8 N en función del tiempo a 37 °C.

En la Tabla 17 se muestran los valores obtenidos de las constantes de velocidad encontradas en la hidrólisis de la sacarosa para las diferentes concentraciones de ácido clorhídrico utilizadas. Observando que estas constantes aumentan con la concentración del ácido como era de esperar para la sacarosa.

Tabla 17. Constantes de velocidad en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL y las diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) a 37 °C.

$k_1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$[\text{H}_3\text{O}^+]$
3,81	2
7,20	3
13,67	4
19,44	6
20,38	7
22,50	8

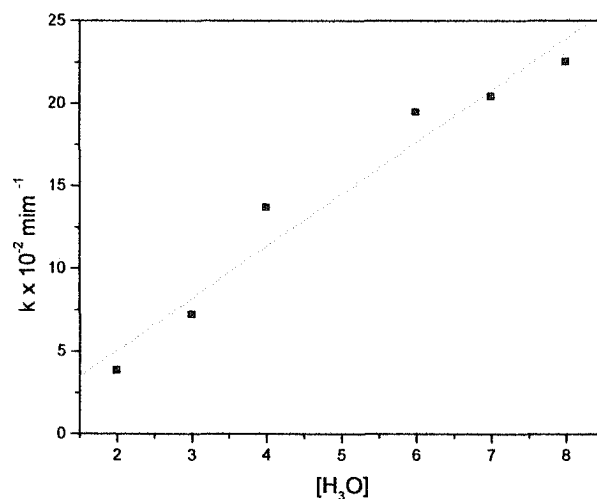


Gráfico 11. Constantes de velocidad en la hidrólisis de la sacarosa 0,4 g/mL en función de la concentración de ácido clorhídrico (HCl) a 37 °C.

Tabla 18. Constantes catalítica de la sacarosa 0,4 g/mL a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) a 37 ° C.

$\text{H}_3\text{O}^+ [\text{N}]$	$k_2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
	$3,15 \pm 0,34$

Estos resultados reportados para la hidrólisis ácida con sacarosa permiten confirmar que la sacarosa es un disacárido fácilmente hidrolizable que puede servir como referencia para comparar las posibles hidrólisis que pudieran presentar los otros edulcorantes en estudio.

VI.1.2 Hidrólisis ácida del edulcorante con sucralosa comercial

De la Tabla 19 a la 24 se muestran la rotación observada α de la hidrólisis de 0,4 g/mL del edulcorante con sucralosa comercial, variando la concentración del ácido clorhídrico (HCl) entre 2 y 8 N a 37 °C, se realizaron las lecturas de rotación óptica cada 5 minutos (min) de 30 a 40 minutos aproximadamente.

Tabla 19. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 2 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	$\text{Ln} [\alpha]$
4,50	+ 61,55	4,11
9,50	+ 61,65	4,12
14,50	+ 61,62	4,12
20,30	+ 61,62	4,12
24,50	+ 61,62	4,12

Tabla 20. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 3 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
4,39	+ 64,84	4,17
9,39	+ 64,77	4,17
14,39	+ 64,79	4,17
19,39	+ 64,79	4,17
24,39	+ 64,79	4,17

Tabla 21. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 5 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
5,02	+ 64,24	4,16
10,02	+ 64,25	4,16
15,02	+ 64,26	4,16
20,02	+ 64,33	4,16
25,02	+ 64,33	4,16

Tabla 22. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 6 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
3,29	+ 63,48	4,15
8,29	+ 63,44	4,15
13,29	+ 63,43	4,15
18,29	+ 63,47	4,15
23,29	+ 63,50	4,15

Tabla 23. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 7 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
3,00	+ 64,26	4,16
8,00	+ 64,33	4,16
13,00	+ 64,25	4,16
18,00	+ 64,24	4,16
23,00	+ 64,26	4,16

Tabla 24. Rotación observada (α) en función del tiempo del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL en HCl 8 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
3,23	+ 64,30	4,16
8,23	+ 64,36	4,16
13,23	+ 64,26	4,16
18,23	+ 64,41	4,16
23,23	+ 64,42	4,16

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede notar que la rotación observada (α) para el edulcorante con sucralosa comercial permanece constante con el tiempo a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico, lo cual sugiere que el edulcorante no presenta hidrólisis ácida, cabe destacar que la concentración de la sucralosa en el edulcorante es muy baja, siendo de un 1,2 %, pudiendo ser la causa para que no se encuentre tal efecto, por este motivo se probó la hidrólisis con la sucralosa pura.

El promedio de las rotaciones observadas (α) para el edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g /mL sin el ácido es de + 66,63 (ver Tabla 10) y en logaritmo neperiano Ln [α] es 4,20; al compararlo Ln [α] del edulcorante con sucralosa comercial a 0,4 g/mL a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) reportados desde la Tabla 19 a la 24,

no presenta variación siempre estando el valor del $\text{Ln } [\alpha]$ en el orden de 4, lo cual confirma que el edulcorante no se hidroliza.

VI.1.3 Hidrólisis ácida con sucralosa pura

De la Tabla 25 a la 30 se muestran la rotación observada (α) de la hidrólisis de 2 g/mL de sucralosa pura, variando la concentración del ácido clorhídrico (HCl) entre 2 y 8 N a 37 °C, se realizaron las lecturas de rotación óptica cada 5 minutos (min) durante 30 a 40 minutos aproximadamente.

Tabla 25. Rotación observada (α) en función del tiempo para sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 2 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	$\text{Ln } [\alpha]$
2,08	+ 17,46	2,86
7,08	+ 17,48	2,86
12,08	+ 17,46	2,86
17,08	+ 17,49	2,86
22,08	+ 17,46	2,86

Tabla 26. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 3 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	$\text{Ln } [\alpha]$
3,04	+ 17,39	2,85
8,04	+ 17,31	2,85
13,04	+ 17,23	2,85
18,04	+ 17,42	2,86
23,04	+ 17,41	2,86

Tabla 27. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 5 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
3,36	+ 17,27	2,85
8,36	+ 17,32	2,85
13,36	+ 17,46	2,86
18,36	+ 17,35	2,85
23,45	+ 17,38	2,85

Tabla 28. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 6 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
5,45	+ 17,39	2,85
10,45	+ 17,26	2,85
15,45	+ 17,36	2,85
20,45	+ 17,42	2,86
25,45	+ 17,40	2,86

Tabla 29. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 7 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
3,10	+ 17,22	2,85
8,10	+ 17,25	2,85
13,10	+ 17,36	2,85
18,10	+ 17,42	2,86
23,10	+ 17,39	2,85

Tabla 30. Rotación observada (α) en función del tiempo de la sucralosa pura a 0,2 g/mL en HCl 8 N a 37 °C.

Tiempo (min)	α (observada)	Ln [α]
2,23	+ 17,42	2,86
7,23	+ 17,38	2,85
14,23	+ 17,34	2,85
21,23	+ 17,31	2,85
28,23	+ 17,28	2,85

Para la sucralosa pura la rotación observada a 0,2 g/mL sin el ácido es de +17,44 (ver Tabla 10) y el Ln [α] es 2,86. Al igual que en el caso anterior (con el edulcorante con sucralosa comercial), para la sucralosa pura no tiene ninguna variación la rotación observada (α) a las diferentes concentraciones de ácido utilizadas, siempre estando el Ln [α] en un rango de 2,85 lo cual nos evidencia que la sucralosa pura no presentó hidrólisis.

VI.2 Constantes cinéticas obtenidas para los edulcorantes a diferentes concentraciones de buffer fosfato.

En las Tablas 31, 37 y 43 para la fructosa, sacarosa y sucralosa respectivamente, se muestran los promedios de las tres medidas obtenidas de los porcentajes de formación de hemoglobina glucada (HbA_{1C}) en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato entre 1,6 y 8,0 mM, manteniendo fijas las concentraciones de hemoglobina en $9,3 \times 10^{-2}$ mM y del edulcorante a 40 mM a pH 7,3 y 37 °C. Las constantes de velocidad se determinaron usando un procedimiento no lineal empleando la Ecuación 7. Observando que el porcentaje de hemoglobina glucada HbA_{1C} aumenta con el tiempo de reacción y con la concentración de buffer fosfato. En los Gráficos 12, 15 y 18 se muestran los porcentajes de formación de hemoglobina glucada HbA_{1C} en función del tiempo para los diferentes azúcares.

En las Tablas 32, 38 y 44 se muestran los valores obtenidos de las constantes de velocidad de primer orden (k_{obs}) para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con los diferentes edulcorantes en función de la concentración del buffer fosfato.

VI.2.1 Constantes cinéticas con fructosa

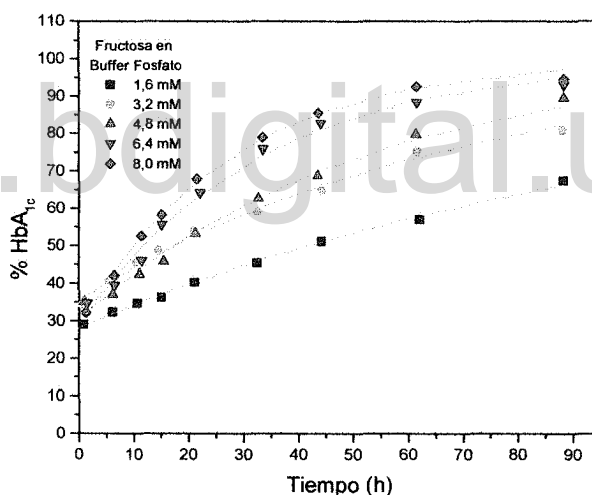
La reacción de glucación no enzimática de los grupos aminos de la hemoglobina vía adición nucleofílica involucra un paso inicial rápido reversible entre el grupo carbonilo del azúcar y un grupo amino libre de la hemoglobina (valina terminal de la cadena β) para formar una base de Schiff (aldimina), la cual sufre un reordenamiento interno, prácticamente irreversible, formando así una cetoamina estable también llamada hemoglobina glucada (HbA_{1c}) (Gil *et al*, 1991; Higinns *et al*, 1981).

El reordenamiento interno es simple interconversión de tautómeros y es el paso determinante de la velocidad de la reacción, bajo condiciones fisiológicas (Gil *et al*, 1991; Higinns *et al*, 1981). Es de esperar que el reordenamiento de Amadori esté sujeto a catálisis ácido-base.

Se observó el crecimiento de la HbA_{1c} en función del tiempo, utilizando la técnica de separación con resina de intercambio del ensayo “*Teco diagnostics*”. En la Tabla 31 y el Grafico 12 se puede apreciar el aumento de la hemoglobina glucada (HbA_{1c}) con el tiempo para la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con la fructosa en presencia de buffer fosfato, este comportamiento es similar al reportado por la hemoglobina con glucosa (Gil *et al*, 1991) y para otras proteínas con glucosa (Gil *et al*, 2005). El porcentaje de HbA_{1c} formado en función del tiempo es mayor con fructosa cuando se compara con la glucosa bajo las mismas condiciones de reacción esto es debido al cambio de glucosa por la fructosa un azúcar más reactivo.

Tabla 31. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Fructosa en Buffer fosfato									
1,6 mM		3,2 mM		4,8 mM		6,4 mM		8,0 mM	
Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}
0,85	29,05 ± 0,08	0,65	34,29 ± 0,21	0,87	35,09 ± 0,12	1,41	34,79 ± 0,16	1,17	32,23 ± 0,14
6,11	32,41 ± 0,12	5,59	40,67 ± 0,06	6,13	37,04 ± 0,18	6,47	39,51 ± 0,20	6,41	42,12 ± 0,13
10,59	34,72 ± 0,19	10,46	45,52 ± 0,09	11,01	42,52 ± 0,18	11,37	46,13 ± 0,09	11,31	52,67 ± 0,17
15,00	36,26 ± 0,06	14,48	48,56 ± 0,17	15,48	45,75 ± 0,07	15,10	55,55 ± 0,16	15,03	58,25 ± 0,09
21,20	40,33 ± 0,14	21,08	53,79 ± 0,15	21,21	53,24 ± 0,10	22,03	64,20 ± 0,15	21,56	67,90 ± 0,12
32,55	45,27 ± 0,11	32,43	58,88 ± 0,14	32,59	62,61 ± 0,16	33,49	75,84 ± 0,15	33,43	78,87 ± 0,18
44,23	51,15 ± 0,17	44,11	64,81 ± 0,12	43,49	68,78 ± 0,09	44,01	82,62 ± 0,08	43,54	85,47 ± 0,07
62,08	56,98 ± 0,14	61,55	75,20 ± 0,06	61,32	79,77 ± 0,11	61,44	88,32 ± 0,06	61,38	92,59 ± 0,09
88,23	67,43 ± 0,13	88,02	80,81 ± 0,09	88,25	89,51 ± 0,14	88,27	93,06 ± 0,14	88,28	94,65 ± 0,13



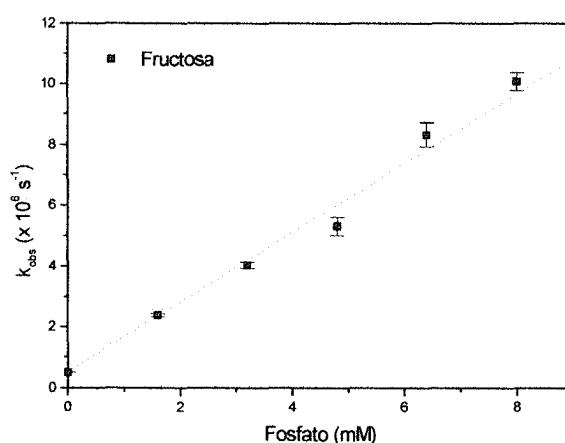
Gráfica 12. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

VI.2.1.1 Constante catalítica con fructosa a distintas concentraciones de buffer fosfato.

En la Tabla 32 y el Gráfico 13 se muestran las constantes de velocidad de primer orden (k_{obs}) para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con fructosa diferentes concentraciones de buffer fosfato. Las constantes catalíticas con fructosa en función de la concentración del buffer fosfato se muestran en la Tabla 33. La línea fue generada por el mejor ajuste de los datos usando regresión lineal y utilizando la ecuación 1.

Tabla 32. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con fructosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Fructosa	
[Fosfato] mM	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
1,6	$2,38 \pm 0,05$
3,2	$4,04 \pm 0,10$
4,8	$5,31 \pm 0,30$
6,4	$8,33 \pm 0,40$
8,0	$10,07 \pm 0,30$



Gráfica 13. Constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación no enzimática de la hemoglobina con fructosa en función de la concentración de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Tabla 33. Constantes catalíticas con fructosa en función de la concentración de buffer fosfato.

Fructosa		
Fosfato [mM]	$k_0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	$k_B \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
	$0,53 \pm 0,16$	$1,14 \pm 0,06$

Estudios realizados revelan que la reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo (Kastchalsky *et al*, 1953). Las moléculas de azúcar consiguen estabilizarse a través de un equilibrio entre la forma abierta y las formas cerradas en las que el grupo carbonilo han desaparecido. El grupo de Kastchalsky, demostró que existe una correlación entre la velocidad de reacción de la glucación y proporción de la forma abierta del azúcar. Además se ha reportado la reactividad relativa de la hemoglobina con algunos monosacáridos (Bunn *et al*, 1981), donde se observa la correlación entre la velocidad de interacción con la proteína y la forma abierta del azúcar.

La estructura abierta o extendida del azúcar, en donde queda expuesto su grupo carbonilo, para la fructosa es de 0,7 %, mientras que para la glucosa es de 0,002 %, lo que nos indica que la fructosa mantiene 350 veces más su forma abierta que la glucosa teniendo así mayor posibilidad para reaccionar con la hemoglobina; y la constante de velocidad para la formación de la base de Schiff (k_1) con para la fructosa es aproximadamente 7,5 veces más rápida que la glucosa usando hemoglobina como proteína (Bunn *et al*, 1981). Las etapas iniciales de la reacción ocurren más rápidamente con fructosa que con glucosa (Dills, 1993).

En la Tabla 31 y el Grafico 13 se puede observar el aumento de la k_{obs} al aumentar la concentración de buffer fosfato, lo que nos sugiere que hay catálisis mediada por el buffer. La constante de velocidad de pseudo primer orden consta de dos términos, uno de primer orden, independiente de la concentración del buffer (k_0) y otro que representa la reacción espontánea o no catalizada, reflejando la asistencia en la reacción por el agua, lyons (iones hidroxilo o hidronio) o grupos funcionales en la proteína y otro de segundo orden, dependiente del buffer (k_B), que representa la reacción catalizada.

$$k_{obs} = k_0 + k_B [\text{Buffer fosfato}] \quad \text{Ec. 1}$$

Los valores encontrados de la constante de velocidad de primer orden k_o y la constante de velocidad de segundo orden k_B , se determinaron de la ordenada al origen o punto de corte y la pendiente respectivamente del Grafico 13, obteniendo los siguientes valores para $k_o = (5,30 \pm 1,60) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ y $k_B = (11,40 \pm 0,60) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Los valores reportados por Gil y colaboradores en el 2012, para la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con glucosa, bajo las mismas condiciones de reacción fueron para $k_o = (0,57 \pm 0,19) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ y $k_B = (1,67 \pm 0,11) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Comparando estos valores de las constantes de velocidad, observamos que la constante de velocidad espontánea o no catalizada (k_o) con la fructosa es 9 veces mayor que con la glucosa y para la constante catalítica (k_B) con la fructosa es 7 veces más rápida que con la glucosa, confirmando que la fructosa reacciona más rápido que la glucosa bajo las mismas condiciones de reacción (Bunn *et al*, 1981).

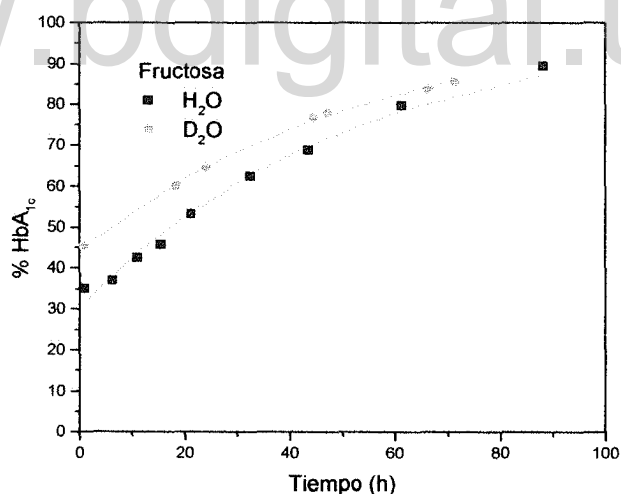
Por otro lado se han encontrado reportes para la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con la ribosa que es catalizada por los buffer fosfato y carbonato (Astorga, 2009). Para el buffer fosfato, la velocidad de la reacción espontánea es más rápida que con la glucosa, sin embargo, las constantes catalíticas k_b son iguales a la de la glucosa bajo las mismas condiciones experimentales (Astorga, 2009), nos permite confirmar estos resultados donde efectivamente existe una correlación entre la velocidad de interacción con la proteína y la forma abierta del azúcar.

VI.2.1.2 Efecto isotópico de solvente

En la Tabla 34 y Gráfico 14 se muestra el porcentaje de formación de la HbA_{1c} en función de tiempo para una concentración fija de buffer fosfato 4,8 mM. Se mantuvieron fijas las concentraciones de hemoglobina en $9,3 \times 10^{-2} \text{ mM}$ y fructosa a 40 mM a pH 7,3 en 37 °C, tanto en H₂O como D₂O.

Tabla 34. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa en los solvente H₂O y D₂O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84.

Fructosa en buffer fosfato 4,8 mM			
H ₂ O		D ₂ O	
Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}
0,87	35,09 ± 0,15	0,75	45,27 ± 0,13
6,13	37,04 ± 0,09	18,31	60,08 ± 0,12
11,01	42,52 ± 0,14	24,04	64,58 ± 0,16
15,48	45,75 ± 0,20	44,29	76,72 ± 0,09
21,21	53,24 ± 0,09	47,00	77,87 ± 0,11
32,59	62,61 ± 0,13	66,31	83,77 ± 0,16
43,49	68,78 ± 0,13	71,31	85,54 ± 0,12
61,32	79,77 ± 0,11		
88,25	89,51 ± 0,10		



Gráfica 14. Porcentaje de hemoglobina glucada con fructosa en los solventes H₂O y D₂O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84.

En la Tabla 34 muestra las constantes de velocidad k_{obs} a una concentración de buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C en H₂O y D₂O bajo las mismas condiciones de reacción. En la reacción de glucación no enzimática para la hemoglobina con la fructosa en buffer fosfato, se encontró que las constantes de velocidad son idénticas tanto en agua H₂O como en agua

deuterada D₂O, por lo tanto no hay efecto isotópico de solvente, lo que significa que el solvente no participa ni tiene ninguna influencia en la velocidad de la reacción, indicando que ningún hidrógeno intercambiable está involucrado en el paso determinante de la velocidad de la reacción.

Tabla 35. Constantes de velocidad de primer orden en H₂O y D₂O para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con fructosa en buffer fosfato 4,8 mM pH 7,3 y pD 7,84 a 37 °C

Fructosa en buffer fosfato 4,8 mM	
Solvente	$k_{obs} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
H₂O	5,31 ± 0,30
D₂O	5,30 ± 0,09

Cálculo para determinar el efecto isotópico de solvente para la fructosa

La Tabla 34 se observa el valor obtenido para determinar el efecto isotópico para el buffer fosfato, encontrando que no hay efecto isotópico de solvente.

Tabla 36. Efecto isotópico con fructosa para buffer fosfato 4,8 mM

Fructosa en buffer fosfato 4,8 mM
$k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1,00$

La constante de velocidad de la reacción espontánea k_0 , muestra la asistencia en la reacción por el agua iones hidroxilo, hidronios o grupos funcionales de la hemoglobina. La abstracción del protón por la base podría ser en principio, por el agua actuando como la base y se esperaría un efecto isotópico de 2, para el grupo ⁻OH se esperaría un efecto isotópico de 1, ya que el uso de pD correspondiente causa la misma ionización fraccionada ambos solventes (H₂O y D₂O) (Álvarez *et al*, 1987; Schowen, 1972).

La ausencia de un efecto isotópico de solvente $k_{H_2O}/k_{H_2O} = 1$, es indicativo que el protón unido al carbono 3 de la posición de la fructosa en la base de Schiff no es abstraído por el agua o ^-OH de acuerdo a lo que describe el efecto isotópico de solvente (Álvarez *et al*, 1987; Schowen, 1972) en el reordenamiento de Amadori. Confirmando lo reportado que los iones fosfatos inducen a un grupo funcional de la hemoglobina para que actuara como la base que abstrae al protón en el reordenamiento de Amadori (Gil *et al*, 2012).

La reacción Maillard con la fructosa es muy similar que con glucosa, pero presenta otro reagrupamiento que se denomina " el reordenamiento de Heyns " y se muestra generalmente como la sustitución de 2-amino-2-deoxialdosa (Heyns *et al*, 1957, 1959; Isbel *et al*, 1958; Lewis *et al*, 1950; Suarez *et al*, 1989) como se muestra en el Esquema 7. Además se han encontrado el derivado 1-amino-1-desoxi-D-fructosa que también se forma en la reacción de fructosa con aminoácidos (Heyns *et al*, 1961, 1962, 1964; Reynolds, 1965) y con proteínas (McPherson *et al*, 1988).

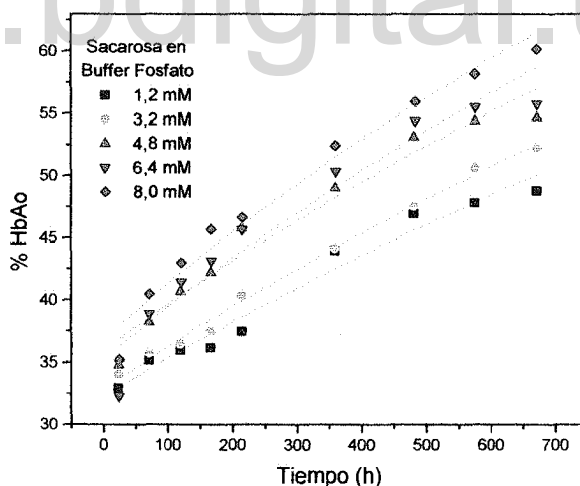
La evidencia también sugiere alguna formación del producto de Amadori como se muestra en el Esquema 1 (Heyns *et al*, 1957, 1959; Isbel *et al*, 1958; Lewis *et al*, 1950). La reacción que tiene la fructosa y las proteínas puede formar múltiples productos como Heyns y Amadori, los factores que influyen en la formación de estos diferentes productos requieren mayor estudio (Dills, 1993), pero pueden estar relacionados con los resultados obtenidos ya que al formarse múltiples producto, existe más hemoglobina glucada HbA_{1c} en la reacción con la fructosa y posiblemente por esta razón las velocidades de reacción sean mayores con la fructosa que para la glucosa.

VI.2.2 Constantes cinéticas con sacarosa

En la Tabla 37 y el Gráfico 15 se observa un pequeño aumento del porcentaje de HbA_{1c} con el tiempo de reacción lo que confirma que parte de la sacarosa se hidrolizó en fructosa y glucosa, también se evidencia que el buffer fosfato cataliza la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con sacarosa. Las constantes catalíticas con sacarosa en función de la concentración del buffer fosfato se muestran en la Tabla 37. Los datos fueron generados por el mejor ajuste de los datos usando regresión lineal y utilizando la ecuación 1.

Tabla 37. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Sacarosa en Buffer fosfato									
1,6 mM		3,2 mM		4,8 mM		6,4 mM		8,0 mM	
Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}
22,58	32,92 ± 0,14	22,58	34,04 ± 0,09	22,58	34,79 ± 0,11	23,32	32,24 ± 0,12	23,32	35,20 ± 0,19
69,93	35,17 ± 0,15	69,93	35,66 ± 0,13	69,93	38,20 ± 0,09	70,52	38,87 ± 0,09	70,52	40,44 ± 0,12
119,50	35,95 ± 0,12	119,50	36,40 ± 0,12	119,50	40,64 ± 0,18	120,28	41,41 ± 0,14	120,28	42,98 ± 0,10
165,90	36,14 ± 0,10	165,90	37,45 ± 0,11	165,90	42,18 ± 0,13	166,60	43,13 ± 0,19	166,60	45,67 ± 0,17
214,15	37,45 ± 0,16	214,15	40,33 ± 0,09	214,15	45,74 ± 0,14	214,80	45,63 ± 0,10	214,80	46,62 ± 0,10
358,67	43,94 ± 0,12	358,67	44,09 ± 0,10	358,67	48,98 ± 0,15	359,42	50,32 ± 0,14	359,42	52,42 ± 0,16
480,90	46,91 ± 0,14	480,90	47,48 ± 0,11	480,90	53,09 ± 0,05	482,42	54,41 ± 0,19	482,42	55,95 ± 0,12
574,87	47,79 ± 0,12	574,87	50,62 ± 0,19	574,87	54,38 ± 0,13	575,30	55,51 ± 0,17	575,30	58,18 ± 0,15
671,43	48,79 ± 0,07	671,43	52,26 ± 0,19	671,43	54,67 ± 0,18	671,43	55,78 ± 0,11	671,43	60,18 ± 0,09



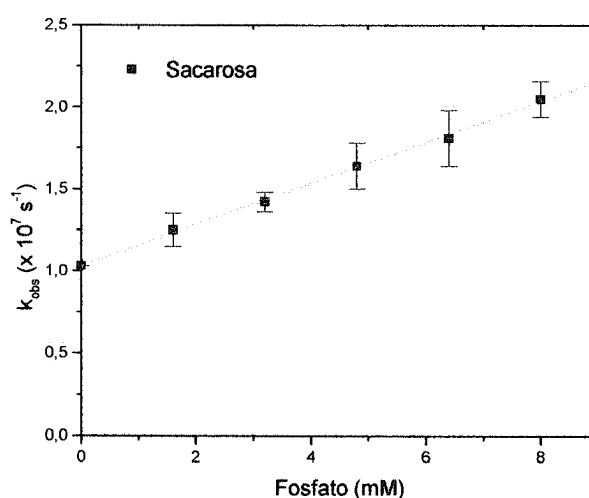
Gráfica 15. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

VI.2.2.1 Constante catalítica con sacarosa a distintas concentraciones de buffer fosfato.

En la Tabla 38 y el Gráfico 16 se muestran las constantes de velocidad de primer orden (k_{obs}) para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sacarosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato. Las constantes catalíticas con sacarosa en función de la concentración del buffer fosfato se muestran en la Tabla 39. La línea fue generada por el mejor ajuste de los datos usando regresión lineal y utilizando la ecuación 7.

Tabla 38. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sacarosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Sacarosa	
[Fosfato] mM	$k_{\text{obs}} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
1,6	$1,25 \pm 0,10$
3,2	$1,42 \pm 0,06$
4,8	$1,64 \pm 0,14$
6,4	$1,81 \pm 0,17$
8,0	$2,05 \pm 0,11$



Gráfica 16. Constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación no enzimática de la hemoglobina con sacarosa en función de la concentración de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Tabla 39. Constantes catalíticas con sacarosa en función buffer fosfato.

Sacarosa		
Fosfato [mM]	$k_0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_B \times 10^{10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
	$1,02 \pm 0,16$	$0,13 \pm 0,06$

Comparando los resultados obtenidos de las constantes catalíticas con sacarosa mostrados en la Tabla 39 y los valores reportados por Gil y colaboradores en el 2012, para la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con glucosa, donde el valor para $k_0 = (0,57 \pm 0,19) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ y $k_B = (1,67 \pm 0,11) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, encontramos que la constante de velocidad espontánea o no catalizada (k_0) con la sacarosa es 2 veces mayor que con la glucosa sin embargo la constante catalítica (k_B) con la glucosa es 13 veces más rápida que con la sacarosa, esto pudiera ser debido a que en este proceso de hidrólisis de la sacarosa ocurre muy lentamente durante la reacción.

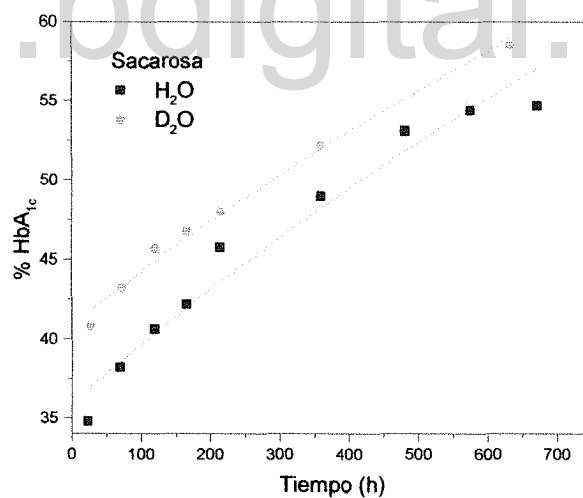
La constante de velocidad de primer orden k_0 y la constante de velocidad de segundo orden k_B para la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con fructosa reportadas anteriormente fueron para $k_0 = (5,30 \pm 1,60) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ y $k_B = (11,40 \pm 0,60) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, al compararla con las constantes catalíticas encontradas para la sacarosa bajo las mismas condiciones, encontramos que la constante de velocidad espontánea o no catalizada (k_0) con la fructosa es 5 veces mayor que con la sacarosa y la constante catalítica (k_B) con la fructosa es 88 veces más rápida que con la sacarosa, pudiendo sugerir que el proceso de hidrólisis de la sacarosa ocurre muy lentamente durante la reacción.

VI.2.2.2 Efecto isotópico de solvente para la sacarosa

En la Tabla 40 y Gráfico 17 se muestra el porcentaje de formación de la HbA_{1c} en función de tiempo a una concentración fija de buffer fosfato 4,8 mM. Se mantuvieron fijas las concentraciones de hemoglobina en $9,3 \times 10^{-2} \text{ mM}$ y sacarosa a 40 mM a pH 7,3 en 37 °C, tanto en H₂O como D₂O.

Tabla 40. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa en los solvente H₂O y D₂O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84.

Sacarosa en buffer fosfato 4,8 mM			
H ₂ O		D ₂ O	
Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}
22,58	34,79 ± 0,11	26,58	40,79 ± 0,12
69,93	38,20 ± 0,14	70,93	43,20 ± 0,13
119,5	40,64 ± 0,12	121,50	45,64 ± 0,14
165,9	42,18 ± 0,16	166,10	46,74 ± 0,17
214,15	45,74 ± 0,12	214,10	47,98 ± 0,15
358,67	48,98 ± 0,17	360,23	52,19 ± 0,19
480,90	53,09 ± 0,19	631,43	58,47 ± 0,07
574,87	54,38 ± 0,09		
671,43	54,67 ± 0,10		



Gráfica 17. Porcentaje de hemoglobina glucada con sacarosa en los solventes H₂O y D₂O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84.

Tabla 41. Constantes de velocidad de primer orden en H₂O y D₂O para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sacarosa en buffer fosfato 4,8 mM pH 7,3 y pD 7,84 a 37 °C.

Sacarosa en buffer fosfato 4,8 mM	
Solvente	$k_{obs} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
H ₂ O	$1,64 \pm 0,14$
D ₂ O	$1,61 \pm 0,14$

En la Tabla 41 muestra las constantes de velocidad k_{obs} a una concentración de buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C en H₂O y D₂O bajo las mismas condiciones de reacción. En la reacción de glucación no enzimática para la hemoglobina con la sacarosa en buffer fosfato, se encontró al igual que en el caso anterior que las constantes de velocidad son idénticas tanto en agua H₂O como en agua deuterada D₂O, por lo tanto se evidencia que no hay efecto isotópico de solvente, lo que sugiere que el solvente no participa ni tiene ninguna influencia en la velocidad de la reacción, indicando que ningún hidrógeno intercambiable está involucrado en el paso determinante de la velocidad de la reacción.

Calculo para el efecto isotópico de solvente para la sacarosa

La Tabla 42 se observa el valor obtenido del efecto isotópico para el buffer fosfato, encontrando que no hay efecto isotópico de solvente.

Tabla 42. Efecto isotópico con sacarosa para buffer fosfato 4,8 mM.

Sacarosa en Buffer fosfato 4,8 mM
$k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1,02$

VI.2.3 Constantes cinéticas con sucralosa

En la Tabla 43 y el Gráfico 18 se observa un pequeño aumento del porcentaje de HbA_{1c} con el tiempo de reacción, lo evidencia que parte de la sucralosa se hidrolizo en 4-cloro-galactosa y 1,6-dicloro-fructosa, además la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina con sucralosa es catalizada también por el buffer fosfato.

Tabla 43. Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa en función del tiempo a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Sucralosa en Buffer fosfato									
1,6 mM		3,2 mM		4,8 mM		6,4 mM		8,0 mM	
Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}
22,70	33,67 ± 0,09	23,77	33,61 ± 0,06	23,72	33,26 ± 0,18	24,44	33,15 ± 0,06	24,36	33,23 ± 0,08
71,17	34,04 ± 0,19	71,17	34,98 ± 0,19	71,17	35,39 ± 0,10	71,80	36,58 ± 0,17	71,80	37,17 ± 0,12
120,88	35,99 ± 0,16	120,88	36,63 ± 0,14	120,88	37,26 ± 0,17	122,00	38,16 ± 0,12	122,00	38,96 ± 0,13
167,30	36,62 ± 0,18	167,10	37,52 ± 0,17	167,30	37,84 ± 0,14	167,95	39,32 ± 0,16	167,95	40,59 ± 0,17
215,60	37,04 ± 0,11	215,60	38,12 ± 0,11	215,60	38,92 ± 0,19	216,30	40,31 ± 0,09	216,3	41,88 ± 0,18
360,06	38,15 ± 0,11	360,06	38,41 ± 0,07	360,06	39,55 ± 0,06	361,58	41,39 ± 0,13	361,58	42,29 ± 0,13
481,90	38,41 ± 0,09	481,90	39,00 ± 0,08	481,90	39,90 ± 0,11	482,35	41,77 ± 0,19	482,35	41,73 ± 0,18
575,80	38,87 ± 0,19	575,80	39,33 ± 0,13	575,80	40,41 ± 0,09	576,22	41,84 ± 0,07	576,22	42,33 ± 0,15
671,82	38,87 ± 0,14	671,82	39,98 ± 0,13	671,82	40,69 ± 0,17	671,82	41,97 ± 0,12	671,82	43,21 ± 0,09

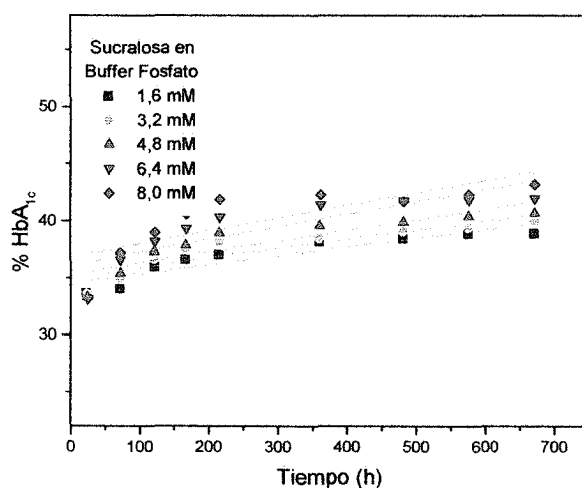


Gráfico 18. Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

VI.2.3.1 Constante catalítica con sucralosa a distintas concentraciones de buffer fosfato.

En la Tabla 44 y el Gráfico 19 se muestran las constantes de velocidad de primer orden (k_{obs}) para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sucralosa diferentes concentraciones de buffer fosfato. Las constantes catalíticas con sucralosa en función de la concentración del buffer fosfato se muestran en la Tabla 45. La línea fue generada por el mejor ajuste de los datos usando regresión lineal y utilizando la ecuación 1.

Tabla 44. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sucralosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Sucralosa	
[Fosfato] mM	$k_{\text{obs}} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
1,6	$0,33 \pm 0,05$
3,2	$0,36 \pm 0,05$
4,8	$0,42 \pm 0,08$
6,4	$0,50 \pm 0,11$
8,0	$0,53 \pm 0,14$

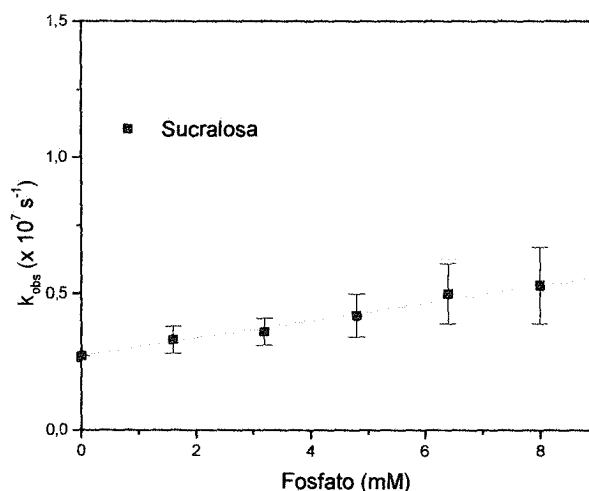


Gráfico 19. Constantes de velocidad (k_{obs}) para la glucación no enzimática de la hemoglobina con sucralosa en función de la concentración de buffer fosfato a 37 °C y pH 7,3.

Tabla 45. Constantes catalíticas con sucralosa en función de buffer fosfato.

Sucralosa		
Fosfato [mM]	$k_0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_B \times 10^{10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
	$0,269 \pm 0,014$	$0,032 \pm 0,004$

Comparando los resultados obtenidos de las constantes catalíticas con sacarosa en la Tabla 39 y las constantes catalíticas con sucralosa reportadas en la Tabla 45 bajo las mismas condiciones de reacción, tenemos que tanto la constante de velocidad espontanea o no catalizada (k_0) como la constante catalitica (k_B) para la sacarosa son 4 veces más rápidas que para la sucralosa, esto pudiera ser debido a que proceso de hidrólisis para la sucralosa durante la reacción es mucho más lentamento que para la sacarosa.

VI.2.3.2 Efecto isotópico de solvente para la sucralosa

En la Tabla 46 y Gráfico 20 se muestra el porcentaje de formación de la HbA_{1c} en función de tiempo para a concentración fija de buffer fosfato 4,8 mM. Se mantuvieron fijas las concentraciones de hemoglobina en $9,3 \times 10^{-2} \text{ mM}$ y sucralosa a 40 mM a pH 7,3 en 37 °C, tanto en H₂O como D₂O.

Tabla 46. Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa en los solvente H₂O y D₂O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84.

Sucralosa en buffer fosfato 4,8 mM			
H ₂ O		D ₂ O	
Tiempo Hora	%HbA _{1c}	Tiempo Hora	%HbA _{1c}
23,72	$33,26 \pm 0,11$	28,72	$35,26 \pm 0,12$
71,17	$35,39 \pm 0,18$	81,07	$36,79 \pm 0,16$
120,88	$37,26 \pm 0,14$	129,88	$37,26 \pm 0,16$
167,30	$37,84 \pm 0,12$	171,30	$38,84 \pm 0,17$
215,60	$38,92 \pm 0,11$	225,12	$39,72 \pm 0,15$
360,06	$39,55 \pm 0,14$	370,16	$40,55 \pm 0,17$
481,90	$39,90 \pm 0,19$	663,82	$40,82 \pm 0,09$
575,80	$40,41 \pm 0,07$		
671,82	$40,69 \pm 0,13$		

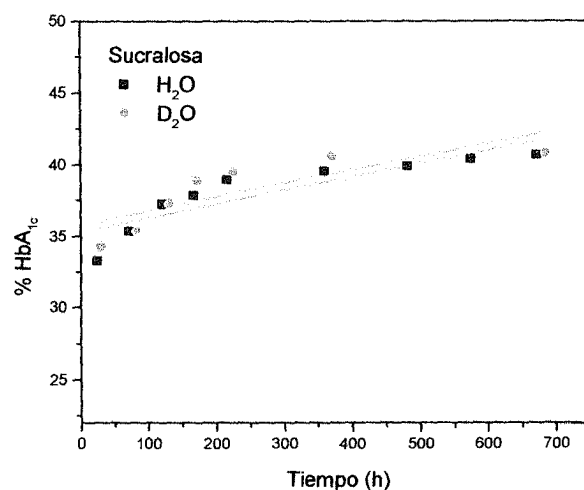


Gráfico 20. Porcentaje de hemoglobina glucada con sucralosa en los solventes H₂O y D₂O para buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C, pH 7,3 y pD 7,84.

Tabla 47. Constantes de velocidad de primer orden en H₂O y D₂O para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina con sucralosa en buffer fosfato 4,8 mM pH 7,3 y pD 7,84 a 37 °C.

Sucralosa en buffer fosfato 4,8 mM	
Solvente	$k_{obs} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
H ₂ O	$0,42 \pm 0,08$
D ₂ O	$0,39 \pm 0,11$

En la Tabla 47 se muestra las constantes de velocidad k_{obs} a una concentración de buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C en H₂O y D₂O bajo las mismas condiciones de reacción, con la sacarosa en buffer fosfato, se encontró al igual que como en los dos casos anteriores (para fructosa y sacarosa), que las constantes de velocidad son idénticas tanto en agua H₂O como en agua deuterada D₂O, por lo tanto no existe efecto isotópico de solvente, lo que significa que el solvente no participa ni tiene ninguna influencia en la velocidad de la reacción, indicando que ningún hidrógeno intercambiable está involucrado en el paso determinante de la velocidad de la reacción.

Calculo para el efecto isotópico de solvente para la sucralosa

La Tabla 48 se observa el valor obtenido del efecto isotópico para el buffer fosfato, encontrando que no hay efecto isotópico de solvente.

Tabla 48. Efecto isotópico con sucralosa para buffer fosfato 4,8 mM.

Sucralosa en Buffer fosfato 4,8 mM
$k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1,08$

A continuación en la Tabla 49 se muestra un resumen de las constantes catalíticas encontradas para los diferentes azúcares estudiados, al comparar estos azúcares con el reportado para la glucosa observamos, que la fructosa presenta una mayor constante de velocidad en la reacción catalizada (k_B), siendo entonces un azúcar que no pudiera ser sustituido por la glucosa ya que aceleraría las complicaciones secundarias asociadas a la diabetes y otras enfermedades.

Tabla 49. Resumen de las constantes catalíticas encontradas para los diferentes azúcares.

Azúcares	Constantes catalizadas con buffer fosfato	
	$k_0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_B \times 10^{10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
Glucosa*	$0,570 \pm 0,190$	$1,670 \pm 0,110$
Fructosa	$5,300 \pm 1,700$	$11,900 \pm 0,600$
Sacarosa	$1,020 \pm 0,160$	$0,130 \pm 0,060$
Sucralosa	$0,269 \pm 0,014$	$0,032 \pm 0,004$

*Valores reportados por Gil y colaboradores en el 2012.

VI.2.4 Evaluación de la inhibición de la glucación no enzimática de la hemoglobina con la *Stevia rebaudiana*

VI.2.4.1 Constantes cinéticas con la *Stevia rebaudiana*

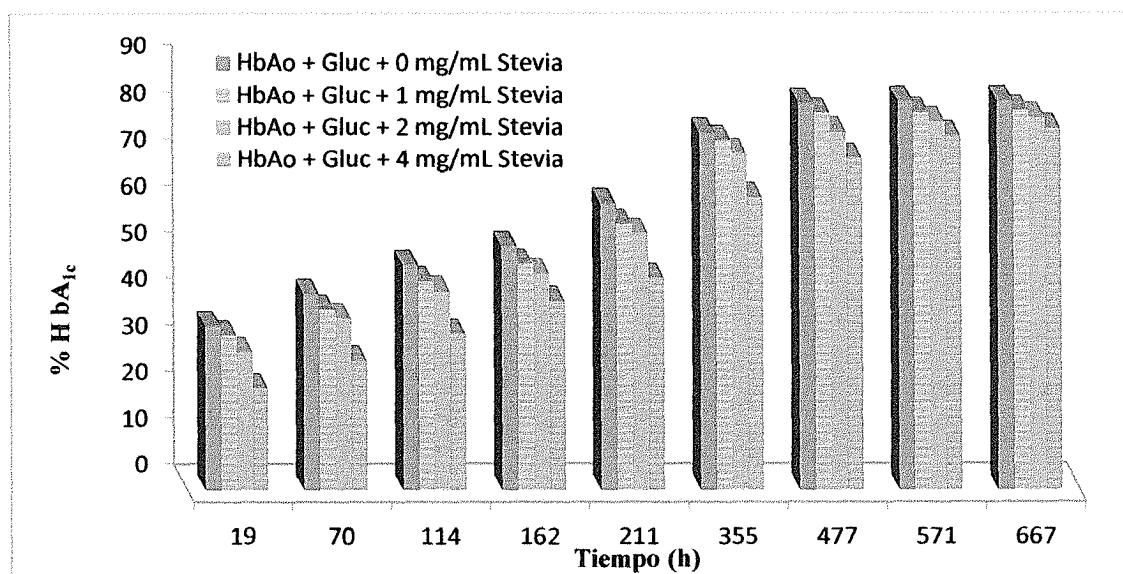
De la Tabla 50 se muestran los promedios de las tres medidas obtenidas de los porcentajes de formación de hemoglobina glucada (HbA_{1C}) en función del tiempo variando las concentraciones de *Stevia rebaudiana* entre 1 y 4 mg/mL. Se mantuvieron fijas las concentraciones de hemoglobina, glucosa y buffer fosfato en $9,3 \times 10^{-2}$, 40 y 4,8 mM respectivamente a pH 7,3 y 37 °C. Las constantes de velocidad se determinaron usando un procedimiento no lineal empleando la Ecuación 7.

Tabla 50. Porcentaje de hemoglobina glucada a diferentes concentraciones *S. rebaudiana* en función del tiempo a 37 °C y pH 7,3.

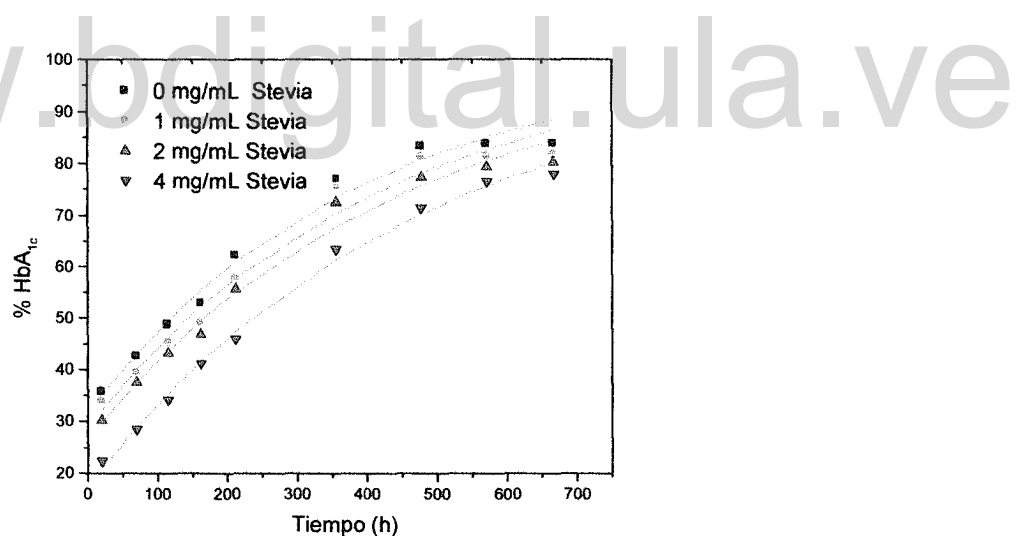
Tiempo Hora	%HbA _{1C} [<i>Stevia rebaudiana</i>]			
	0 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
19,38	35,77 ± 0,12	33,84 ± 0,01	30,18 ± 0,13	22,40 ± 0,12
69,60	42,59 ± 0,11	39,32 ± 0,09	37,49 ± 0,07	28,34 ± 0,15
114,27	48,79 ± 0,16	45,27 ± 0,12	43,21 ± 0,18	34,16 ± 0,22
162,01	52,84 ± 0,17	48,97 ± 0,06	46,91 ± 0,13	41,15 ± 0,12
211,32	62,12 ± 0,23	57,61 ± 0,14	55,55 ± 0,17	45,95 ± 0,16
354,63	77,01 ± 0,11	75,44 ± 0,19	72,49 ± 0,19	63,31 ± 0,17
477,01	83,33 ± 0,12	81,27 ± 0,07	77,23 ± 0,12	71,43 ± 0,13
570,63	83,73 ± 0,02	81,35 ± 0,10	79,36 ± 0,24	76,43 ± 0,13
666,72	83,85 ± 0,12	81,67 ± 0,13	80,24 ± 0,16	77,91 ± 0,08

En los Gráfico 21 y 22 se muestran los porcentajes de formación de hemoglobina glucada HbA_{1C} en función del tiempo en ausencia y en presencia de *S. rebaudiana*.

Se puede notar que el porcentaje de hemoglobina glucada HbA_{1C} aumenta con el tiempo de reacción, pero la glucación es menor en presencia de *S. rebaudiana*, indicando un efecto inhibitor por parte de esta especie vegetal en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina.



Gráfica 21. Efecto de la concentración de *S. rebaudiana* sobre la glucación no enzimática de hemoglobina con glucosa en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.



Gráfica 22. Porcentaje de hemoglobina glucada en buffer fosfato 4,8 mM a diferentes concentraciones de *S. rebaudiana* a 37 °C y pH 7,3.

En las Tablas 51 se muestran los valores obtenidos de las constantes de velocidad de primer orden (k_{obs}) para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina en función de las concentraciones de *S. rebaudiana*. La disminución de las constantes de velocidad con el aumento de la concentración del extracto vegetal es indicativa de la inhibición de la planta para la glucación no enzimática de la hemoglobina. Este mismo efecto inhibitorio fue reportado con la planta *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae) 1953. "Casco de vaca" (De los Ríos, 1998) bajo las mismas condiciones de reacción.

Tabla 51. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de glucación no enzimática de hemoglobina a diferentes concentraciones de *S. rebaudiana* a 37 °C y pH 7,3.

[<i>S. rebaudiana</i>] mg/mL	$k_{\text{obs}} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
0	$7,39 \pm 0,50$
1	$6,86 \pm 0,53$
2	$6,44 \pm 0,39$
4	$5,92 \pm 0,19$

VI.2.5 Evaluación de la disminución de la glucosa

En la Tabla 52 se muestra los valores de concentración de la glucosa consumida y final variando la concentración *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM, observando que el consumo de glucosa aumenta con el tiempo y con el aumento de la concentración de la especie vegetal, lo que ocasiona una disminución en la concentración final de glucosa. En los Gráficos 23 y 24 se representa el efecto ejercido por la planta sobre los niveles de glucosa.

Tabla 52. Concentración de glucosa consumida y final variando la concentración de *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

Tiempo Hora	[Glucosa] mM Consumida			[Glucosa] mM Final		
	[<i>S. rebaudiana</i>]			[<i>S. rebaudiana</i>]		
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	39,82 ± 0,09	39,61 ± 0,08	39,55 ± 0,10
22,23	0,19 ± 0,09	0,75 ± 0,12	0,96 ± 0,06	39,63 ± 0,09	38,86 ± 0,19	38,60 ± 0,06
71,58	1,40 ± 0,12	3,21 ± 0,19	4,25 ± 0,12	38,42 ± 0,14	36,40 ± 0,12	35,32 ± 0,14
115,93	2,53 ± 0,22	5,97 ± 0,14	6,16 ± 0,14	37,29 ± 0,18	33,64 ± 0,07	33,40 ± 0,17
163,00	3,88 ± 0,15	6,35 ± 0,21	8,11 ± 0,16	35,95 ± 0,08	33,26 ± 0,06	31,46 ± 0,18
212,72	4,54 ± 0,19	9,48 ± 0,17	11,67 ± 0,09	35,28 ± 0,10	30,13 ± 0,07	27,90 ± 0,09
356,00	6,52 ± 0,10	10,45 ± 0,08	13,39 ± 0,06	33,30 ± 0,11	29,16 ± 0,16	26,18 ± 0,13
478,73	9,10 ± 0,18	12,72 ± 0,10	15,34 ± 0,14	30,72 ± 0,17	26,89 ± 0,16	24,22 ± 0,09
571,68	12,20 ± 0,16	13,18 ± 0,12	16,22 ± 0,11	27,62 ± 0,13	26,43 ± 0,08	23,35 ± 0,05
668,30	14,13 ± 0,08	15,83 ± 0,07	20,06 ± 0,08	25,69 ± 0,15	23,78 ± 0,06	19,50 ± 0,08

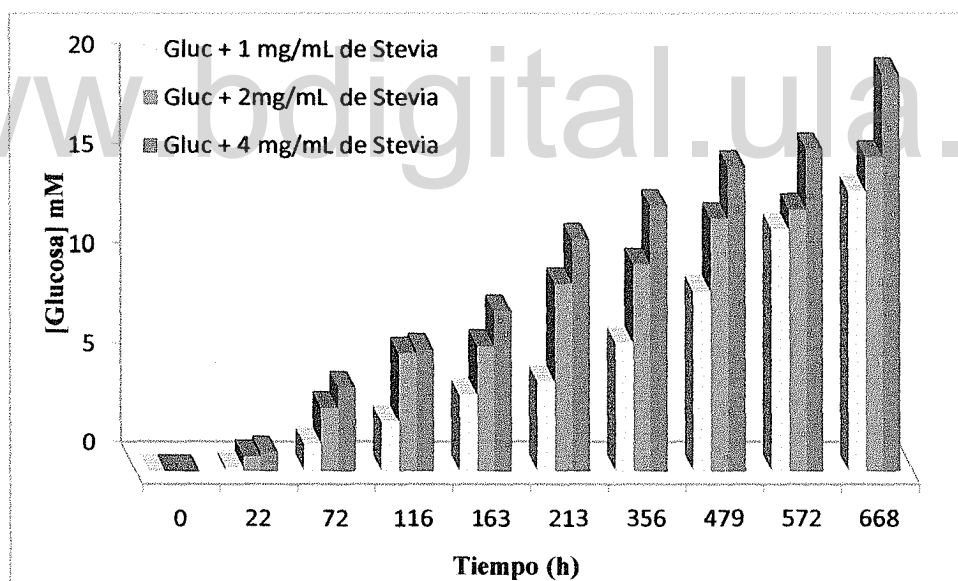


Gráfico 23. Concentración consumida de glucosa al variar la concentración de *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

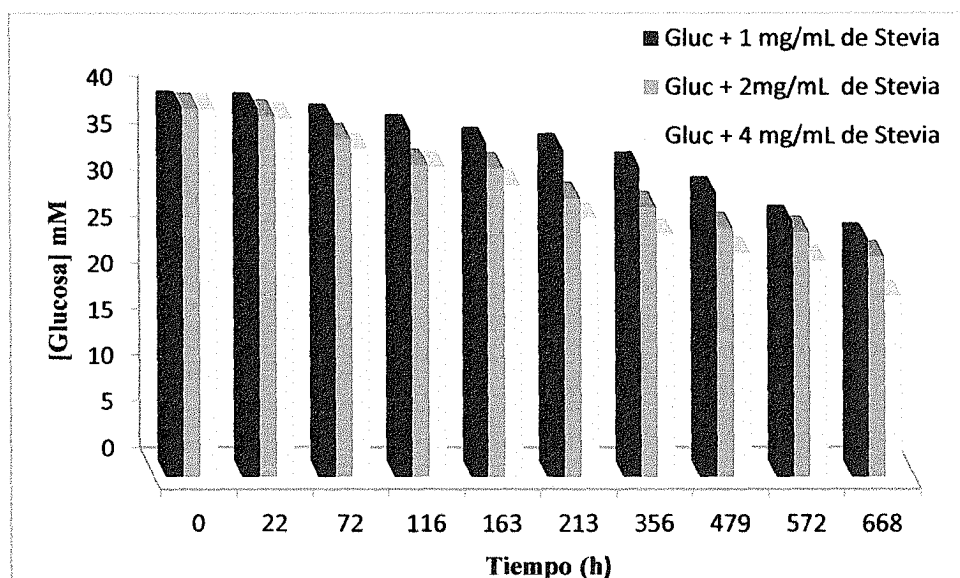


Gráfico 24. Concentración final de glucosa al variar la concentración de *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

En la Tabla 53 se muestran los valores obtenidos para la concentración de glucosa consumida y final, en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina a varias concentraciones de *S. rebaudiana* en buffer fosfato. Observando que el consumo de glucosa aumenta con el tiempo y al aumentar la concentración de la especie vegetal, provocando una disminución de la concentración final de glucosa. En los Gráficos 25 y 26 se representa el efecto ejercido por la concentración de la planta sobre los niveles de glucosa.

Tabla 53. Concentración de glucosa consumida y final durante la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina, variando la concentración de *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

Tiempo Hora	[Glucosa] mM Consumida			[Glucosa] mM Final		
	[<i>S. rebaudiana</i>]			[<i>S. rebaudiana</i>]		
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	39,82 ± 0,07	39,91 ± 0,09	39,82 ± 0,07
21,83	4,53 ± 0,09	5,41 ± 0,07	8,02 ± 0,06	35,29 ± 0,16	34,50 ± 0,05	31,80 ± 0,06
70,80	5,15 ± 0,13	6,18 ± 0,13	11,28 ± 0,10	34,68 ± 0,11	33,73 ± 0,12	28,55 ± 0,11
115,17	13,06 ± 0,16	14,43 ± 0,13	15,65 ± 0,17	26,76 ± 0,13	25,48 ± 0,09	24,18 ± 0,17
162,83	13,45 ± 0,18	15,29 ± 0,18	16,57 ± 0,12	26,37 ± 0,06	24,62 ± 0,11	23,25 ± 0,13
212,28	14,11 ± 0,17	16,37 ± 0,12	17,03 ± 0,10	25,71 ± 0,11	23,54 ± 0,14	22,79 ± 0,16
355,48	16,11 ± 0,07	19,00 ± 0,07	20,33 ± 0,12	23,71 ± 0,13	20,91 ± 0,11	19,49 ± 0,19
478,22	18,99 ± 0,13	20,33 ± 0,08	21,81 ± 0,11	20,83 ± 0,19	19,58 ± 0,06	18,01 ± 0,16
571,53	21,16 ± 0,18	21,43 ± 0,12	23,79 ± 0,19	18,66 ± 0,07	18,48 ± 0,09	16,03 ± 0,15
667,67	23,52 ± 0,05	24,06 ± 0,14	25,10 ± 0,08	16,31 ± 0,04	17,42 ± 0,09	14,73 ± 0,10

Los resultados de la Tabla 53 permiten establecer una correlación entre la concentración de la planta y la concentración de la glucosa, indicando un efecto de la especie *S. rebaudiana* sobre la disminución de la glucosa, pudiéndose sugerir dicha efectividad de esta planta como un agente hipoglicemiante. Este mismo efecto fue encontrado con la planta *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae) 1953. “Casco de vaca” bajo las mismas concentraciones de la especie vegetal (De los Ríos, 1998).

También cabe destacar que los estudios *in vivo*, utilizando ratas diabéticas donde le administraron las hojas pulverizadas de *Stevia rebaudiana*, mezcladas con agua destilada se encontró una disminución del azúcar en sangre a medida que se aumentaba la cantidad del polvo de *Stevia rebaudiana* pero no superó su efecto al compararlo con Glimpirida (Amaryl®) (Sumon *et al*, 2008), Por otro lado la utilización de diferentes fracciones (éter de petróleo, acetato de etilo y cloroformo) de extracto etanólico de hojas de *Stevia rebaudiana* aplicado también en ratas diabéticas, presentaron mejor actividad antihiperlipémica que metformina (Hossain *et al*, 2011). El análisis fitoquímico preliminar indicó que los flavonoides y alcaloides han informado a ejercer efectos hipoglicemiantes y hipolipemiantes potentes (Gregersen *et al*, 2004; Hossain *et al*, 2011).

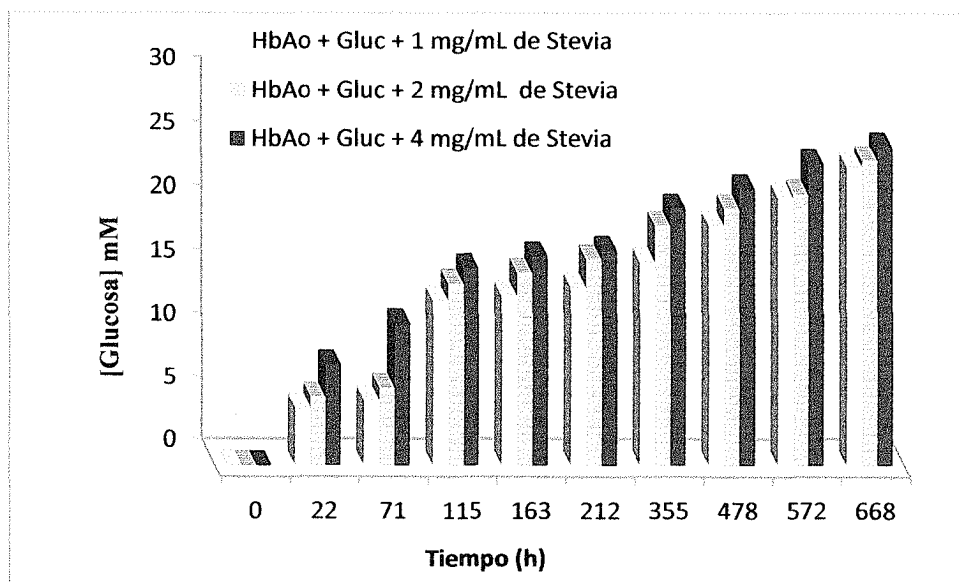


Gráfico 25. Glucosa consumida en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina al variar la concentración de *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

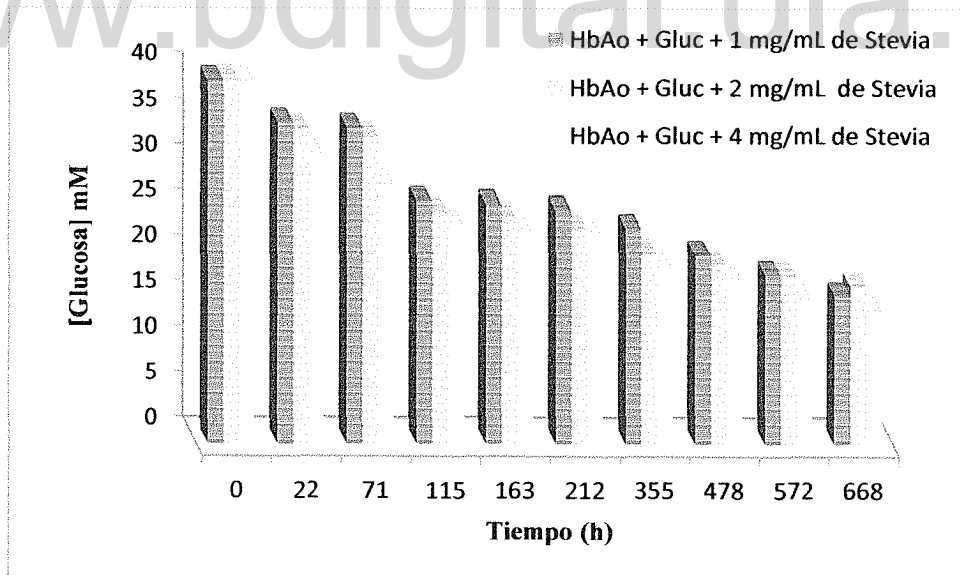


Gráfico 26. Glucosa final en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina al variar la concentración de *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

De acuerdo a esto se puede afirmar que tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* (Sumon *al et*, 2008; Hossain *et al*, 2011) realizados con las hojas de la especie *Stevia rebaudiana* presentan actividad hipoglicemiente.

En la Tabla 54 se reportan los valores de la concentración de glucosa consumida y final, en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina en buffer fosfato sin *S. rebaudiana*, el consumo de glucosa aumenta con el tiempo disminuyendo la concentración final de glucosa, se puede evidenciar que sin presencia de la especie *S. rebaudiana* se obtiene mayor cantidad de glucosa final de 21,10 mM a una concentración 4 mg/mL de *S. rebaudiana* que es justamente lo que no se requiere, porque gracias a la presencia de la especie *S. rebaudiana* la glucosa final se logra disminuir a 14,53 mM cuando se trabaja con una concentración de 4 mg/mL de *S. rebaudiana*. En el Gráfico 27 se representa el consumo de glucosa en esta reacción.

Tabla 54. Concentración de glucosa consumida y final, durante la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina, sin *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

Tiempo Hora	Sin <i>S. rebaudiana</i>	
	[Glucosa] mM Consumida	[Glucosa] mM Final
0	0,37 ± 0,07	39,63 ± 0,05
21,83	4,22 ± 0,05	35,78 ± 0,09
70,80	5,19 ± 0,09	34,81 ± 0,13
115,17	9,28 ± 0,13	30,72 ± 0,17
162,83	10,13 ± 0,16	29,87 ± 0,14
212,28	13,02 ± 0,19	26,98 ± 0,12
355,48	14,02 ± 0,10	25,98 ± 0,14
478,22	14,79 ± 0,17	25,21 ± 0,09
571,53	16,82 ± 0,05	23,18 ± 0,08
667,67	18,90 ± 0,09	21,10 ± 0,09

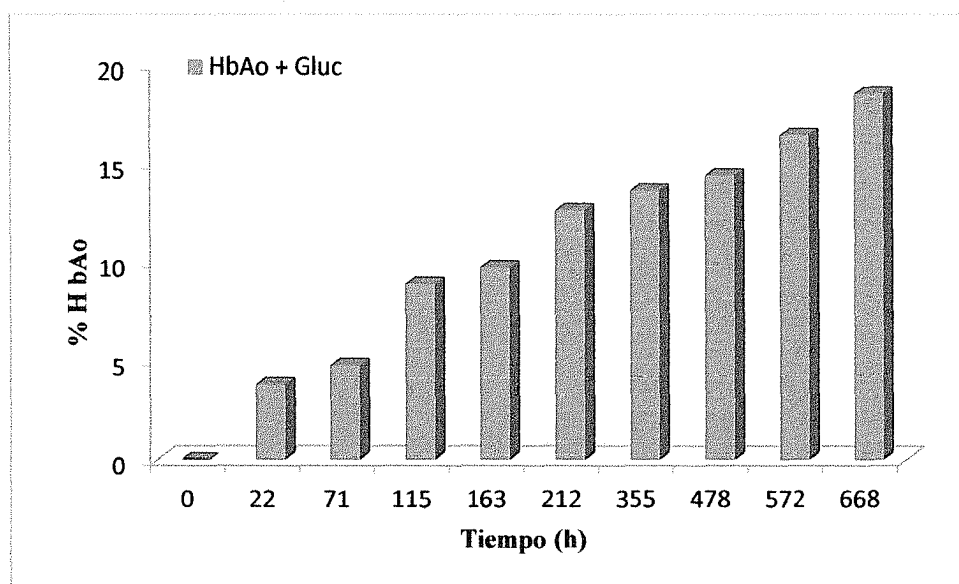


Gráfico 27. Glucosa consumida en la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina sin la *S. rebaudiana* en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,

www.bdigital.ula.ve

VII. Conclusiones

1. En el estudio de la hidrólisis ácida para el edulcorante con sucralosa comercial y sucralosa pura no se encontró ninguna variación en las rotaciones observadas, lo cual evidencia que dichos edulcorantes no presenta hidrólisis ácida.
2. La reacción de glucación no enzimática para la hemoglobina con fructosa es catalizada por buffer de fosfato, la constante catalítica (k_B) para la fructosa es siete veces más rápida que la glucosa y la reacción espontánea (k_0) para la fructosa es nueve veces más grande que la glucosa bajo las mismas condiciones de reacción.
3. La reacción de glucación no enzimática para la hemoglobina con sacarosa se encontro que la constante de velocidad espontanea (k_0) es dos veces mayor que con la glucosa sin embargo la constante catalitica (k_B) con la glucosa es 13 veces más rapida que con la sacarosa, esto pudiera ser debido a que el proceso de hidrólisis de la sacarosa ocurre muy lentamente durante la reacción.
4. En la reacción de glucación no enzimática para la hemoglobina con la sucralosa tenemos que tanto la constante de velocidad no catalizada (k_0) como la constante catalitica (k_B) con la sacarosa es cuatro veces más rápida que con la sucralosa, esto pudiera atribuirse a que en este caso el proceso de hidrólisis de la sucralosa durante la reacción es más lento que para la sacarosa.
5. Los valores de las constantes de los azúcares estudiados al compararlos con el valor reportado para la glucosa nos dice, que la fructosa es la que presenta una mayor constante de velocidad en la reacción catalizada (k_B), siendo entonces un azúcar que no puede ser sustituido por la glucosa ya que aceleraría las complicaciones secundarias asociadas a la diabetes y otras enfermedades.
6. No se encontró efecto isotópico de solvente para ninguno de los azúcares en estudio durante la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina, ya que las

constantes de velocidad obtenidas son idénticas tanto en agua H_2O como en agua deuterada D_2O , lo que confirma que el solvente no participa en la velocidad de la reacción, sugiriendo además que ningún hidrogeno intercambiable está involucrado en el paso determinante de la velocidad de la reacción y que la función del buffer fosfato es la de inducir a un grupo funcional de la hemoglobina para que actúe como la base que abstrae al protón en el reordenamiento de Amadori.

7. Los valores obtenidos para la concentración de la glucosa total disminuyen al aumentar la concentración de la *Stevia rebaudiana*, lo que es indicativo de la actividad hipoglicemiante que presenta la planta.
8. Los datos sugieren que *Stevia rebaudiana* puede tener un efecto inhibitorio sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina *in vitro* y, además, podría ser de valor terapéutico en el tratamiento de la diabetes, ya que las constantes de velocidad para la reacción disminuyen en presencia de la especie vegetal, y con el aumento de la concentración de la misma.
9. La metodología ensayada con la planta *Stevia rebaudiana* no requiere de sistemas biológicos *in vivo*, proporciona útil información como es, la cuantificación precisa y confiable de la concentración de glucosa y de la cantidad de hemoglobina glucada, pudiendo ser utilizada como un ensayo preliminar para evaluar el efecto de las plantas medicinales sobre la disminución de la glucosa y la inhibición en la glucación no enzimática de la hemoglobina ya que tiene la ventaja de ser un análisis rápido y una técnicamente sencilla.

VIII. Referencias Bibliohemerográficas

1. Abudula, R., Jeppesen, P., Rolfsen, S., Xiao, J., Hermansen, K. (2004). Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose, glucose, and calcium dependency. *Metabolism*, 53, 1378-81.
2. Actis, S., Rebolledo, O. (2000). La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas su importancia en la Diabetes mellitus. *Medicina*, 60, 645-656.
3. Agamy, N. (2009). Effects of the natural sweetener (*Stevia*) and the artificial sweetener (aspartame) on some biochemical parameters in normal and alloxan-induced diabetic rats. *New Biotechnology*, 25, S12.
4. American Diabetes Association. (2012). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 35, S1, 11-63.
5. Amin, K., Kamel, H., Eltawab M. (2011). Protective effect of Garcinia against renal oxidative stress and biomarkers induced by high fat and sucrose diet. *Lipids Health Disease*, 10, 6.
6. Astorga, O. (2009). Efecto de buffer fosfato y carbonato en la reacción de la ribosa con la hemoglobina *in vitro*. Tesis de grado, Universidad de los Andes, Venezuela.
7. Basta, G., Schmidt, A., De Caterina. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research*. 63, 582– 592.
8. Bernstein, R. (1987). Noenzymatically glycosylated proteins. *Advances in Clinical Chemistry*, 26, 1-9
9. Blakely, S., Hallfrisch, J., Reiser, S., Prather, E. (1981). Long term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *Journal of Nutrition*, 111, 307-314.
10. Boeckh, E. (1992). Pharmacological Trial of a concentrated crude extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni in healthy volunteers. *Archivos de Biología e Tecnología*, 35(2), 299-314.
11. Boller, F., Duyckaerts, Ch. (1997). *Alzheimer disease: clinical and anatomical aspects*. En: *Feinberg TE, Farah MJ. Behavioral neurology and neuropsychology*. (eds). USA, New York: McGraw-Hill.

12. Bose, T., Chakraborti, A. (2008). Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: Implication for oxidative stress in diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 800-808.
13. Boochin, R and Gallop, P. (1975). Structure of the hemoglobin A_{1C}. Nature of the N-terminal chain blocking group. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67, 103-109.
14. Brandle, J., Telmer, P. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68, 1855–63.
15. Briceño, C., Caceres, L. (1997). *Química*. (2^{da} ed). Bogotá-Colombia: Panamericana.
16. Brownlee, M. (1994). Glycation and diabetes complications. *Diabetes*, 43, 836-841.
17. Brownlee M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annals Review Medicine*, 46, 223-234.
18. Brownlee, M and Cerami, A. (1981). The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 385-432.
19. Brownlee, M., Vlassara, H and Cerami, A. (1984). Inhibition of heparin catalyzed human antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation: Possible role in fibrin deposition in diabetes. *Annals of Internal Medicine*, 10, 527-537.
20. Budavri, S. O'Neil, M. smith, A Heckelman, P. (1989). *The merck indexn* (11th ed). Rahway, U.S.A: Merck & co., Inc.
21. Bunn, H., Haney, D., Gabbay, H and Cerami, A. (1975). Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin Ale. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67, 103-109.
22. Bunn, H., Higgins, P. (1981). Reaction of monosaccharide with proteins: Posible Evolutionary Significance. *Science*, 213, 222-224.
23. Campbell, J., Davies, G., Bulone, V., Henrissat, B. (1997). Classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 326, 929–42.
24. Cassiola, F., Delmonte, P., Jaworska, K., Dugo, P., Mondello, L., Rader, J., (2011). Employing ultra-high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2012–2018.

25. Cerami, A., Vlassara, H., Brownlee, M. (1987). Glucose and aging. *Scientific American*, 82-88.
26. Cervantes, D., Jacobson E., Jacobson. M. (1996). Glycation and glycoxidation of histones by ADP-ribose. *Journal Biological Chemistry*, 271, 10461-10469.
27. Chan, P., Tomlinson, B., Chen, Y., Liu, J., Hsieh, M., Cheng, J. (2000). A doubleblind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50, 215-20.
28. Chang, J., Wu, M., Liu, I., Cheng, J. (2005). Increase of Insulin Sensitivity by Stevioside in Fructose-rich Chow-fed Rats, *Hormone and Metabolic Research*, 37, 610-616.
29. Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121, 41-54.
30. Chen, J. (2007). Development of super edulcorant - trichlorosaccharose. *Liquor-Making Science & Technology*, 2, 90.
31. Chen, T., Chen, S., Chan, P., Chu, Y., Yang, H., Cheng, J. (2005). Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Pharmacology Planta Medicinal*, 71, 108-13.
32. Chen, J., Jeppesen, P., Nordentoft, I., Hermansen, K. (2006). Stevioidose counteracts the glyburide-induced desensitization of the pancreatic beta-cell function in mice: Studies *in vitro*. *Metabolism*, 55, 1674-80.
33. Cohen, A., Teitelbaum, A., Rosenman, E. (1977). Diabetes induced by a high fructose diet. *Metabolism*, 26, 17-24.
34. Davis, R., Nicol, D., Mccann, V., and Calder, J. (1978). Glycosylated hemoglobin levels in patients with diabetes Mellitus. *American Journal of the Medical*, 1, 530-535.
35. De Los Ríos, C., Gil, H., Hidalgo, D. (2000). Efecto de la *Bauhinia variegata* sobre los niveles de glucosa. *Ciencia*, 8, 100-106.
36. De Oliveira, V., Forni-Martins, E., Magalhães, P and Alves, M. (2004). Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 27, 215-222.

37. Dewick, P. (2002). Medicinal Natural Products. John Wiley & Sons, Nottingham, UK. 507p.
38. Dills, W. (1993). "Protein fructosylation: Fructose and the Maillard reaction". *Journal of Clinical Nutrition*, 58, 779-787.
39. Donoso, A. (2001) *La enfermedad de Alzheimer y otras demencias*, (3ª ed). Chile, Santiago: Ed. Universitaria.
40. Donoso, A. (2003). La enfermedad de alzheimer. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*. 41, 13-22.
41. Eshrat, H. (2002). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of *curcumin* from *curcuma longa*, linn, and partially purified product from *Abroma augusta*, Linn. In streptozotocin induced diabetes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 17, 33-43.
42. Fisher, R and Winternaiter, K. (1981). The carbohydrate moiety in hemoglobin A_{1c} is present in the ring form. *FEBS letters*, 135, 145-147.
43. Flórez, J., Armijo, J., Mediavilla A. (1997). *Farmacología Humana*. (3ª Ed). Barcelona, España; Mossan S.A.
44. Fluckiger, R., Hermon, W. Meier, W., Loo, S., Gubbay, K., (1981). Haemoglobin Carbamylation in Uraemia. *New England Journal of Medicine*, 304, 823-7.
45. Frye, E., Dehenhart, T., Thorpe, S., Baynes, J. (1998). Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *Journal Biological Chemistry*, 273, 18714-18919.
46. Furth, A. (1988). Methods for Assying Nonenzymatic Glycosylation. *Analitycal. Biochemistry*, 175, 347-360.
47. Gao, J., Chen, H. (2004). Application of sucralose in sugar free chocolate and chewing gums. *The food industry*, 6, 5.
48. Garlick, R., Mazer, J., Bunn, H. (1983). Characterization of glycosylated hemoglobins: relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other protein. *Journal of Clinical Investigation*, 71, 1062-1072.
49. Geuns, J. (2003). Molecules of interest: Stevioside. *Phytochemistry*, 64, 913-921.
50. Geuns, J., Augustijns, P., Mols, R., Buyse, J., Driessen, B. (2003a). Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of Stevioside, Rebaudioside A and Steviol. *Food Chemical Toxicology*, 41, 1599-1607.

51. Geuns, J., Malheiros, R., Moraes, V., Decuyper, E., Compernelle, F., Buyse, J. (2003b). Metabolism of stevioside by chickens. *Journal Agricultural Food Chemical*, 51, 1095–1101.
52. Gil, H., Mata, J and Schowen, R. (1988). Proton transfer is not rate limiting in buffer-induced nonenzymic glycation of hemoglobin. *Journal American of Chemical Society* 110, 1865-1866.
53. Gil, H., Mata, J and Schowen, R. (1991). Isotope effects in the nonenzymic glycation on hemoglobin catalyzed by phosphate. *Actualidades de Fisicoquímica Orgánica*, 286-306.
54. Gil, H., Peña, J and Salcedo, D. (2012). Kinetics of Desolvation of the Glycation of hemoglobin catalyzed by buffer phosphate and arsenate. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 6, 410-416.
55. Gil, H., Peña, M., Vásquez, B., Uzcategui, J. (2002). Catalysis by organic phosphates of the glycation of human hemoglobin. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 15, 820-825.
56. Gil, H., Peña, M., Vásquez, B., Uzcategui, J. (2004). Effect of buffer carbonate and arsenate on the kinetics of glycation of human hemoglobin. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 17, 537-540.
57. Gil, H., Salcedo, D., Romero, R. (2005). Effect of phosphate buffer on the kinetics of glycation of proteins. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 18, 183-186.
58. Gil H, Uzcategui, J., (1993). Isotope effects in the non-enzymic glycation on hemoglobin catalyzed by DPG. *Actualidades de Fisicoquímica Orgánica*, 15, 109-121.
59. Gomez, D., Gil, H., Helliwell, M and Mata, J. (1996). N-(p-tolyl)-amine-1-D-fructose from a small crystal. *Acta Crystallography*, 52, 252-254.
60. González, L., Castello, P., Gagliardino, J y Rossi, J. (2000). La glucosilación no enzimática de la hemoglobina. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencias Al Día Internacional*, 3, 1-17.
61. Goodman y Gilman. (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (12^a ed). México, D.F, México: McGraw-Hill.

62. Gregersen, S., Jeppesen, P., Holst, J. and Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of Stevioside in Type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, 53, 73-76.
63. Grotz, V., Henry, R., McGill, J., Prince, M., Shamoony, H., Trout, J. (2003). Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, 1607- 12.
64. Haney, D., Bunn, H. (1976). Glycosylation of hemoglobin by glucose-6-phosphate. *National Academy of Sciences*, 73, 3534-3539.
65. Hayashi, T., Namiki, M. (1986). Role of sugar fragmentation in the Maillard reaction. *Amsterdam Elsevier*. 29-38.
66. Heyns, K., Noack, H. (1962). The reaction of fructose with L-lysine and Larginine and its relationship to the nonenzymatic browning reactions (Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin und L-Arginini und deren Beziehung zu nichtenzymatischen Braunungsreaktionen). *Chemische Berichte*, 95:720-7.
67. Heyns, K., Paulsen, H., Eichstedt, R., Rolle, M. (1957). About the formation of 2-aminoaldoses during the decomposition of ketosylamines (Über die Gewinnung von 2-Amino-aldosen durch Umlagerung von Ketosylaminen). *Chemische Berichte*, 90, 2039-49.
68. Heyns, K., Paulsen, H., Schroeder, H. (1961). The reaction of ketohexoses with secondary amino acids and secondary amines (Die Umsetzung von Ketohexosen mit sekundären Aminosäuren und sekundären Aminen). *Tetrahedron*, 13, 247-57.
69. Heyns, K., Rolle, M. (1959). Formation of N-substituted-2-amino-2-deoxyglucoses during the reaction of fructose with peptides (N-Substituierte 2-Amino-2-deoxy-D-glucosen durch Umsetzung von DFructose mit Peptiden). *Chemische Berichte*, 92, 2439-50.
70. Heyns K, Rolle, M. (1959). The reaction of fructose with gelatin (Die Umsetzung von D-Fructose mit Gelatine). *Chemische Berichte*, 92, 2451-60.
71. Higgins, P., Bunn, H. (1981). Kinetics analysis of nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 5204-5208.
72. Hossain, S., Alan, B., Asadujjaman, M., Islam, M., Rahman, A., Islam, A., Islam, A. (2011). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of different fractions of

- Stevia rebaudiana* leaves in alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2, 1722-1729.
73. Huisman, T., Dozy, A. (1962). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 60, 302-19.
 74. Humphrey, T., Richman, A., Menassa, R., Brandle, J. (2006), Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant Molecular Biology*, 61, 47–62.
 75. Ignacimuthu, S., Ayyanar, M and Sivaraman, S. (2006). Ethnobotanical investigations among tribes in Madurai district of Tamil Nadu (India). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 1–7.
 76. Isbell, H., Frush, H. (1958). Mutarotation, hydrolysis, and rearrangement reactions of glycosylamines. *Journal of Organic Chemistry*, 23, 1309-19.
 77. Javanovic, L And Peterson, C. (1981). The Clinical Utility of Glycosylated Hemoglobin. *American Journal of Medicine*, 70, 331-338.
 78. Jeppesen, P., Gregersen, S., Alstrup, K. (2002). Stevioside induces antihyperglycemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: Studies in diabetic Goto-kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*, 9, 9-14.
 79. Jeppesen, P., Gregersen, S., Poulsen, C. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic beta-cells to secrete insulin: Actions independent of cAMP and ATP-sensitive K-channel activity. *Metabolism*, 49, 208-214.
 80. Jeppesen, P., Gregersen, S., Rolfsen, S. (2003). Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rat. *Metabolism*, 52, 372-378.
 81. Kang, W., Yang, J., Chen, Q. etc. (2006). The study of new kind of sweetener sucralose, *China Condiment*, 1. 59.
 82. Katchalsky, A. (1953). Kinetics of aldose-amino acid interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, 290-301.
 83. Kawasaki, T., Ogata, N., Akanuma, H., Sakai, T., Watanabe H., Ichiyanagi, K., Yamanouchi, T. (2004). Postprandial plasma fructose level is associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 53, 583-588.

84. Kendrew, J. (1961). The Three-Dimensional Structure of a Protein Molecule. *Scientific American*, 205, 96-111.
85. Kennelly, E. (2002). Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia*, the Genus *Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles, Vol. 19. Taylor and Francis, London and NY 68–85.
86. Kinghorn, A., Soejarto, D. (1991). Stevioside. Alternative Sweetener (Eds.O'Brien NL, Gelardi RC). Dekker, New York, 2, 157-171.
87. Kobayashi M., Horikawa, S., Degrandi, I., H., Ueno, J., Mitsuhashi, H. (1977). Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 16, 1405-1408.
88. Koenig, R., Blobtein, S and Cerami, A. (1997). Structure of carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Journal of Biology Chemical*, 252, 2992-2997,
89. Koenig, R., Peterson, C., Killo, C., Cerami, A and Illiamsom, Jm. (1976). Hemoglobine A_{1c} as an Indicator of the Degree of Glucose Intolerance in Diabetes. *Diabetes*, 25, 230-232.
90. Kohda. H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., Tanaka, O. (1976). New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 15, 981-983.
91. Kumar, B., Kumar, H. (2005). *Biogenesis of natural products*. India: Alpha science.
92. Levi, B., Werman, M. (1998). Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables. *Journal of Nutrition*, 128, 1442–1449.
93. Lewis, V., Lea, C. (1950). A note on the relative rates of reaction of several reducing sugars with casein. *Biochimica et Biophysical Acta*, 4, 532-4.
94. Li, W., Zheng, H., Bukuru, J and De Kimpe, N. (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 1–21.
95. Lowrey, C., Lynnes, S. J. and Soeloner, S. (1985). The effect of hemoglobin ligands on the kinetics of human hemoglobin formation. *Journal of Biology Chemical*, 260, 11611-11618.
96. Luo, Y., Xu, X., Sun, X. (2008). Synthesis of Strong Sweetener Sucralose. *Modern Applied Science*, 2, 13–15.

97. Maki, K., Curry, L., Reeves, M., Toth, P., McKenney, J., Farmer, M. (2008). Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7 Suppl 1), S47–53.
98. Marcano, D., Hasegawa, M. (2002). *Fotoquímica Orgánica*. Caracas, Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.
99. Martínez, M., Márquez, H., Sánchez, A., Romero, J., Chávez, R., Lascurain, R., et al. (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas, *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria*, 15, 39-47.
100. McGarvey, B., Attygalle, A., Starratt, A., Xiang, B., Schroeder, F., Brandle, J and Meinwald, J. (2003). New non-glycosidic diterpenes from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Product*, 66, 1395-1398.
101. McPherson, J., Shilton, B., Walton, D. (1988). Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry*, 27, 1901-7.
102. Mezitis, N., Maggio, C., Koch, P., Quddoos, A., Allison, D., Pi-Sunyer, F. (1996). Glycemic effect of a single high oral dose of the novel sweetener sucralose in patients with diabetes. *Diabetes Care*, 19, 1004-5.
103. Miyata, T., Van Y., Kurokawa, K., Baynes, J. (1999). Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney International*, 55, 389-399.
104. Mogra, R., Dashora, V. (2009). Exploring the use of *Stevia rebaudiana* as a sweetener in comparison with other sweeteners. *Journal of Human Ecology*, 25, 117-120.
105. Mohameda, A., Ceunen, S., Geuns, J., Van den Ende, W., De Ley, M. (2011). UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1136–1141.
106. Monnier, V., Cerami, A. (1983). Factors Influencing Extent of Glucosylation “in vivo”, In: G.R. Waller and M.S. Feather (Eds). The Maillard Reaction in Foods and Nutrition, *American Chemistry Society Symposium*, 215, 431-439.
107. Monsan, P. and Ouarne, F. (2010). Oligosaccharides derived from sucrose. Prebiotics and probiotics science and technology. D. Chalarampopoulos and R. A. Ratstall. Berlin, Springer: 293-336.

108. Mori, N., Sakanoue, M., Takcuchi, M., Shimpo, K., Tanabe, T. (1981). Effect of Stevioside on fertility in rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 22, 409–414.
109. Morlock, G., Prabha, S. (2007). Analysis and stability of sucralose in a milk-based confection by a simple planar chromatographic method. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 7217–7223.
110. Moore, J. Dalrymple, D. (1976). *Experimental methods in organic chemistry*. (2^a ed). Philadelphia: W. B. Sauders Company.
111. Munch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., Riederer, P. (1997). Advanced glycation end products in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 23, 134-143.
112. Nathan, D. (1994). Relationship between metabolic control and long-term complications of diabetes. In Joslin's Diabetes. C.R.Kahn, G. Weir, Eds. Philadelphia, Lea & Febiger.
113. Nathan, D., Kuenen, J., Borg, R., Zheng, H., Schoenfeld. D., Heine. R. (2008) Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 31, 1473–1478.
114. Oliveira, R., Uehara, O., Minetti, C., Valle, L. (1989). Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton in rats: endocrine effects. *General Pharmacology*, 2, 187–191.
115. Oubre, A., Carlson, T., King, S and Reaven, G. (1997). From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40, 614–617.
116. Papachristodoulou, D., Heath, H., Kang, S. (1976). The development of retinopathy in sucrose-fed and streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia*, 12, 367.
117. Pennington, J., Harding, J. (1994). Identification of the site of glycation of gamma-II-crystallin by (14C)-fructose. *Biochimica Biophysica Acta*, 1226(2), 163–167.
118. Peña, M. (1996). El DPG cataliza la glucación no enzimática de la hemoglobina ¿Qué grupos catalizan la reacción?. Trabajo especial de grado. Universidad de Los Andes. Venezuela.

119. Perutz, M. (1978). Hemoglobin Structure and Respiratory Transport. *Scientific American*, 239, 92-125.
120. Powell, H., Ivor, L., Costello, M., Wolf, P. (1982). Elevated hemoglobin A1 in streptozotocin diabetic rats and in rats on sucrose and galactose-enriched diets *Clinical Biochemistry*, 15, 133-137.
121. Rahbar, S. (1969). An abnormal hemoglobin in red cells of diabetes. *Clinical Chemical Acta*, 22:296-8.
122. Rahbar, S., Blumenfeld, O., Ranney, H. (1969). Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36, 838-43.
123. Raskovic, A., Jakovijevic, Y., Mikov, M., Gavrilovic, M. (2004). Joint effect of commercial preparations of *Stevia rebaudiana* Bertoni and sodium monoketocholate on glycaemia in mice. *European journal Drug Metabolism Pharmacokinet*, 29, 83-86.
124. Raskovic, A., Momir, M., Ranko, S., Vida, J., Velibor, V., Mihau, P., Ksenia, K., Slavko, K., Zdenko, T., Djendji S. (2007). Effect of stevioside and sodium salt of monoketocholic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *European Journal Of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*, 33, 17-22.
125. Rendle, A. (1979). The classification of flowering plants. Cambridge University Press, Vol. II, India, 587p.
126. Reynolds, T., (1963). Chemistry of nonenzymatic Browning. *Advances in Food Research*, 12, 1-52.
127. Reynolds, T. (1965). Chemistry of nonenzymic browning II. *Advances in Food Research*, 14, 167-283.
128. Ribeiro, R. L., W., Legare, D., Macedo, M., (2005). Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia*, 48, 976-983.
129. Richman, A., Gijzen, M., Starrat AN, Yang Z, Brandle J. (1999). Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal*, 19, 411-21.

130. Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R. (2005). Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal*, 41, 56-67.
131. Roberts, A., Renwick, A., Sims, J., Snodin, D. (2000). Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food Chemical Toxicology*, 8, S31-S41.
132. Sabban, E. (2011). La glicosilación no enzimática: una vía común en la diabetes y el envejecimiento. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 39, 243-246
133. Saenz, G; Barrantes, A; Chaves, M. (1987). Hepatología analítica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 2da edición.
134. Sakamoto I, Yamasaki K, Tanaka, O. (1977a). Application of ¹³C NMR spectroscopy to the chemistry of natural glycosides: rebaudioside C, a new sweet diterpene glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 844-846.
135. Sakamoto I, Yamasaki K, Tanaka, O. (1977b). Application of ¹³C NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides D and E, new sweet diterpene glucosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 25: 3437-3439.
136. Sasaki, N., Fukatsu, R., Tsuzuki, K., Hayashi, Y., Yoshida, T., Fujii, N., Koike, T., Wakayama, I., Yanagihara, R., Garruto, R., Amano, N., Makita, Z. (1998). Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *American Journal of Pathology*, 153, 1149-1155.
137. Savita, S., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A., Ramakrishna, P and Sakey, S. (2004). Health implications of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Human Ecology*, 15, 191-194.
138. Schnek, A., Schroeder, W. (1961). The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*, 83, 1472-8.
139. Shapiro, R., Mc Manue, M., Zalut, C and Bunn, H. (1980). Sites of Nonenzymatic Glycosylation of Human Hemoglobin. *Journal of Biology Chemistry*, 255, 3120-3127.

140. Sigurd, D., Torjesen, P., Kilhovd, B., Berg, T., Sandvik, L., Hanssen, K. (2006). Increased serum levels of the specific advanced Glycation endmproduct methylglyoxal-derived hydroimidazolone are associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 55, 232-236.
141. Sims, J., Roberts, A., Daniel, J., Renwick, A. (2000). The metabolic fate of sucralose in rats. *Food Chemical Toxicology*, 38, S115-21.
142. Skyler, J. (1990). Relation of metabolic control of diabetes Mellitus to chonic Complications. In *Diabetes Mellitus: Theory and practice*. H. Rifkim, D. Jr Porte, Eds. New York, Elseiver 856-868p.
143. Stanforth, S. (2006). *Natural Products Chemistry at a Glance*. USA: Blackwell Publishing.
144. Stevens, V., Rouzer, C., Monnier, V., Cerami, A. (1978). Diabetic Cataract formation: potential role of glycation of glucosylation of Lens Crystallins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 2918-2922.
145. Sumon, H., Mostofa, M., Jahan, M., Kayesh, E and Haque, M. (2008). Comparative efficacy of powdered form of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves and glimepiride in induced diabetic rats. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 211–215.
146. Suarez, G., Rajaram, R., Oronsky, A. (1989). Gawinowicz MA. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation), comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 3674-9.
147. Sweazea, K., Lekic, M., Walker, B. (2010). Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats, *Nutrition & Metabolism*, 7, 48.
148. Takagi, Y., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Asahina, T., Kikkawa, R., Shigeta, Y. (1995). Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end products. *Journal of Diabetes and its Complications*, 9, 87–91. Taylor, R. and Agius, L. (1988). The biochemistry of Diabetes. *Biochemical Journal*, 250, 625- 640.

149. Tedesse, B. (2008). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Ajuga remota* Benth grown in Ethiopia on alloxan-induced diabetic mice. Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy. Addis Ababa University. Thesis. Masters of Science in Medicinal Chemistry.
150. Tian, T., Tian, Y. (2006). The advance of synthetic technology study on the sweetener sucralose. *Hebei Chemical*, 29, 3.
151. Thomas, J and Gadel M. (2010). Stevia: It's not just about calories. *The Open Obesity Journal*. 2, 101-109.
152. Tomita, T., Sato, N., Arai, T. (1997). Bactericidal activity of a fermented hot-water extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enter hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol Immunol*, 41, 1005-9.
153. Tomlinson, T and Akerele, O. (1998). Medicinal plants their role in health and biodiversity. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 11-41.
154. Urbanowski, J., Coheford, A. (1987). Nonenzymatically Glycosylate serum albumin in a galactosemic infac. *New England Journal of Medicine*, 306, 84-86.
155. Vanek, T., Nepovim, A and Valicek, P. (2001). Determination of Stevioside in plant material and fruit teas. *Journal of food composition and analysis*, 14, 383-388.
156. Vásquez, B. (2000). Aspectos mecanísticos *in vitro* de la glucación no enzimático de la hemoglobina usando fosfatos orgánicos y carboxilatos. Trabajo especial de grado. Universidad de Los Andes. Venezuela.
157. Velázquez. (2008). *Farmacología básica y clínica*. (18^a ed). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
158. Vitek, P., Bhattacharya, K., Glendening, J., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K and Cerami, A. (1994). Advanced Glycation endproducts contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4766-4770.
159. Vlassara H. (1994) Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Annals of Medicine*, 28,419-26.
160. Wade, L. (1993). *Química Orgánica*. (2^{da} ed). México: Preticen Hall Hispanoamericana, S.A.

161. Watkins, N., Neglia-Fisher, C., Dyer, D., Thorpe, S., Baynes, J. (1987). Effect phosphate on kinetics of glycation of protein. *Journal Biological Chemistry*, 262, 7207-7212.
162. Wautier, J.L., Guillausseau, P. (1998). Diabetes, advanced glycation end products and vascular disease. *Vascular Medicine*, 3, 131-137.
163. Wiet, S., Miller, G. (1997). Does chemical modification of tastants merely enhance their intrinsic taste qualities? *Food Chemical Toxicology*, 35, 305-11.
164. Xi, Y., Yamaguchi, T., Sato, M., Takeuchi, M. 1998. Antioxidant mechanism of *Stevia rebaudiana* extract and antioxidant activity of inorganic salts. *Japanese Society for Food Science and Technology*, 45, 317-22.
165. Xiao, J., Hermansen, K. (2005). The mechanism underlying the insulintropic effect of stevioside- activation of acetyl-CoA carboxylase. *Diabetes*, 54, A131.
166. Yan, R. (2004). Study on the synthesis of sucralose. *Chemical World*, 45, 165.
167. Yan, S., Chen X., Schmidt, A., Brett, J., Godman, G., Zou, Y., Scott, C., Caputo, C., Frappier, T., Smith, M., Perry, G., Yen, S., Stern, D. (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 7787-7791.
168. Yang, H., Miyahara, H., Takeo, J., Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology Metabolic Syndrome*, 4, 32.
169. Yang, P., Lee, J., Tsao, C., Wu, H., Cheng, J. (2009). Stimulatory effect of stevioside on peripheral mu opioid receptors in animals. *Neuroscience Letters*, 454, 72-5.
170. Yodyingyuad, V., Bunyawong, S. (1991). Effect of stevioside on growth and reproduction. *Human Reproduction*, 6, 158-165.
171. Yudkin, J. (1978). Dietary factors in atherosclerosis: sucrose. *Lipids*, 13, 370-372.
172. Yue D., McLennan, S., Church, D., Turtle, J. (1982). The measurement of glycosylated hemoglobin in man and animals by aminophenyl boronic acid affinity chromatography. *Diabetes*, 31, 701-705.

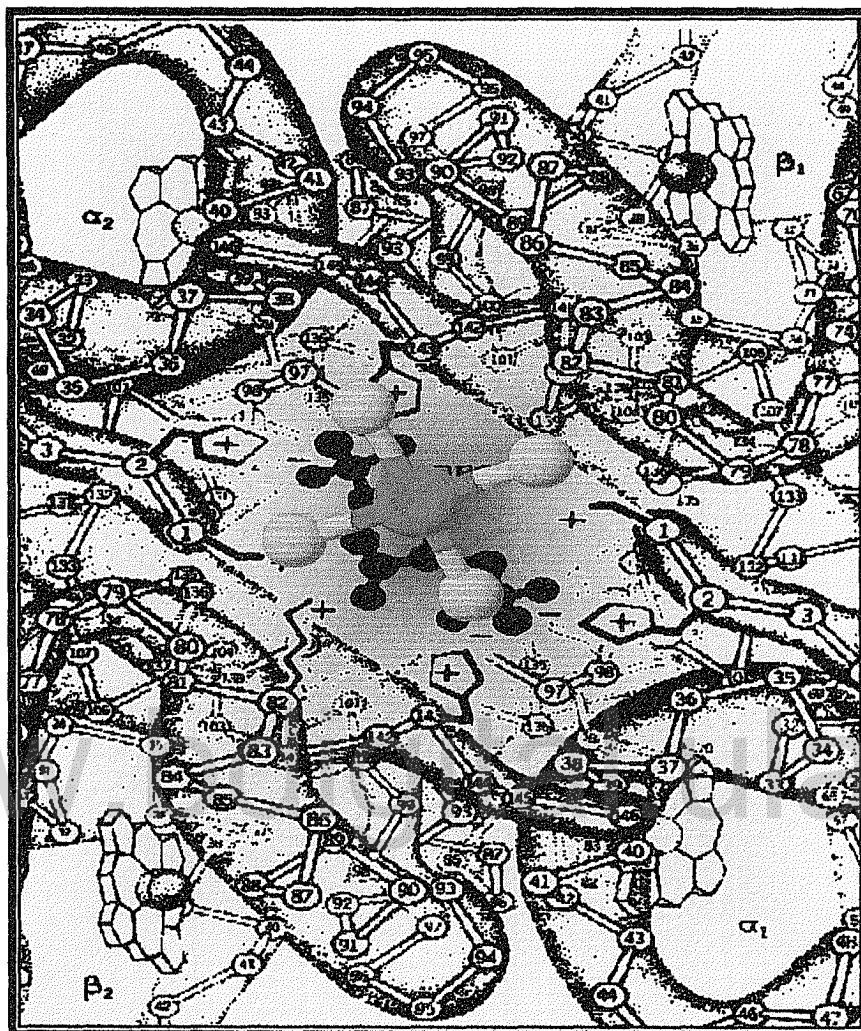
IX. Apéndices

Apéndice 1. Aminoácidos presentes en las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina A

(Saenz *et al*, 1987)

Nombre de aminoácidos	Abreviatura	Nº de residuo en la cadena α	Nº de residuo en la cadena β
Ácido aspártico	Asp	10	40
Ácido glutámico	Glu	4	6
Alanina	Ala	21	15
Arginina	Arg	3	3
Asparagina	Asn	2	3
Cisteína	Cys	2	2
Fenilalanina	Phe	7	8
Glicina	Gly	7	13
Glutamina	Gln		5
Histidina	His	10	9
Isoleucina	Ile		
Leucina	Leu	18	18
Lisina	Lys	11	11
Metionina	Met	2	1
Prolina	Pro	7	7
Serina	Ser	11	5
Tirosina	Tyr	3	3
Treonina	Thr	9	7
Triptofano	Trp	1	2
*Valina	Val	13	18
		141	146

Apéndice 2. Estructura de rayos X de la hemoglobina (Kendrew, 1961; Perutz, 1978)



Apéndice 3. Kit para determinación cuantitativa de hemoglobina glucada (HbA_{1C}) en sangre humana *Teco diagnostics*.

Procedimiento

Parte A: Preparación del hemolizante

Se agregaron 500 µL de reactivo lisante en tubos de ensayo, luego se le añadió 100 µL de la muestra (mezcla de reacción), se agitó hasta formar una mezcla hemolizante y se dejó en reposo por 5 minutos.

Parte B:

Se mezcló la resina de intercambio catiónico, luego se agregaron 3,0 mL de la resina en un tubo de ensayo, después añadieron 100 µL del hemolizado de parte A. Se introdujo el tubo separador quedando la banda de goma a 1 cm por encima del nivel del líquido, se mezcló durante 5 minutos.

Luego se empujó el tubo separador hasta que la resina quedo comprimida en el fondo del tubo y el líquido sobrenadante quedó retenido dentro del tubo separador. Después se vertió el líquido sobrenadante en un tubo o directamente en la celda de lectura y se midió la absorbancia (Abs) en un espectrómetro UV a 415 nm. Esta lectura corresponde a la hemoglobina glucada HbA_{1C}.

Parte C:

Se añadió 5,0 mL de agua destilada en un tubo de ensayo, luego se agregaron 20 µL del hemolizado de la parte A y se mezclaron. Después se midió en un espectrómetro UV la absorbancia. Esta lectura corresponde a la hemoglobina total HbA_{total}.

Cálculos:

Se Calculó la proporción entre la absorbancia de la HbA_{1C} y HbA_{total} para cada muestra y patrón.

$$R = \frac{\text{AbsHbA}_{1C}}{\text{AbsHbA}_{\text{total}}} \quad \text{Ec. 5}$$

Los valores de HbA_{1C} fueron expresados en porcentaje % y se determinaron utilizando la siguiente expresión:

$$\%HbA_{1C} = \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{patrón}}} * [\text{Patrón}] \quad \text{Ec. 4}$$

Otra manera de calcular el porcentaje de HbA_{1C} formada durante la reacción sin la utilizar del patrón de HbA_{1C} se realizó por la siguiente ecuación:

$$\%HbA_{1C} = \frac{\text{AbsHbA}_{1C}}{\text{AbsHbA}_{\text{total}} \times F} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde: F es el factor de corrección del método empleado.

Cálculo del factor de corrección por la dilución F:

En la parte B, se mezclaron 3,0 mL de resina más 0,1 mL de hemolizado de la parte A equivalente a tener un volumen total de muestra de 3,1 mL, este se divide entre el volumen de muestra del hemolizado.

$$\frac{3,1}{0,1} = 31$$

En la parte C, se mezclaron 5,0 mL de agua más 0,02 mL del hemolizado de la parte A teniendo un volumen total de muestra de 5,02 mL, este se dividió entre el volumen de muestra del hemolizado.

$$\frac{5,02}{0,02} = 251$$

Para obtener el factor de dilución F se dividió, el valor de dilución de la parte C entre el valor de dilución de la parte B.

$$F = \frac{251}{31} = 8,10 \quad \text{Ec. 8}$$

Siendo 8,10 el factor de corrección para la Absorbancia de la hemoglobina total.

Apéndices 4. Kit para la determinación enzimática cuantitativa de glucosa. Método Gol-PAP 900. *BIOSCIENCE*.

Reactivos:

- Vial con enzima Glucosa oxidasa GOD
- Solución de Fenol
- Patrón de glucosa 100 mg/100 mL

Preparación del reactivo de trabajo:

Se transvaso el vial que contenía la enzima a un frasco ámbar de 250 mL. Se añadió 245 mL de agua destilada agitó suavemente con movimientos rotatorios hasta que se disolvió la enzima. Se añadió 5 mL del reactivo fenólico. Este reactivo es estable por 45 días si se mantiene en la nevera y protegido de la luz.

Técnica:

Se marcaron los tubos de ensayo como blanco, muestra (mezcla de reacción) y patrón se procederá como indica la Tabla 9.

Tabla 9. Preparación de los tubos de ensayo blanco, patrón y muestra para la determinación de la glucosa.

	Muestra	Patrón	Blanco
Reactivo de trabajo	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Muestra	0,020 mL	-	-
Patrón	-	0,020 mL	-

Se mezclaron e incubarán a 37 °C durante 10 minutos. Se enfriaron con agua y se midió la absorbancia (Abs) en un espectrómetro UV a 510 nm se ajustó el cero con el blanco y se calibró con el patrón.

Cálculos:

$$\text{Concentración de glucosa en la muestra} = \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 \text{ mg/dL} \quad \text{Ec. 9}$$

Apéndices 5. Artículo científico generado de parte de los resultados de la presente investigación.



www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 9(2), 49-53 (2014)
 Artículo científico

Avances en
Química 49

Effect of buffer phosphate in the reaction of hemoglobin with fructose

Johanna E. Peña*, Herminia D. Gil

Laboratorio de Fisicoquímica Orgánica. Departamento de Química,
 Universidad de los Andes. Mérida 5251. Venezuela.

(*) johannap@ula.ve

Recibido: 04/02/2014

Revisado: 02/05/2014

Aceptado: 14/07/2014

Resumen

La reacción de la hemoglobina con fructosa es catalizada por el buffer de fosfato. La cinética exhibe tanto, un término independiente del buffer (k_0) como un término de segundo orden dependiente del buffer (k_B). La constante catalítica (k_B) para el fosfato es $(11,40 \pm 0,60) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. La velocidad de reacción espontánea (k_0) para el fosfato es $(5,30 \pm 1,60) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. La glucación de la hemoglobina con fructosa exhibe idénticos resultados en buffer fosfato preparado en H_2O y D_2O . Las constantes de velocidad para el fosfato en H_2O y D_2O son $(5,31 \pm 0,30) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ y $(5,30 \pm 0,09) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. La ausencia de efecto isotópico de solvente es indicativo que un grupo básico en la molécula de hemoglobina pueda estar involucrado en la abstracción del protón 2 en el reordenamiento de Amadori.

Palabras claves: hemoglobina; glucación; fructosa; fosfato

Abstract

The reaction of hemoglobin with fructose is catalyzed by buffer phosphate. The kinetics exhibited both, a buffer independent term (k_0) and a second-order term in buffer (k_B). The catalytic constants (k_B) for phosphate is $(11,40 \pm 0,60) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. The spontaneous rate reaction (k_0) for phosphate is $(5,30 \pm 1,60) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. The glycation of hemoglobin with fructose exhibits identical rates in protium and deuterium oxides in phosphate buffer. The first rate constant for phosphate in H_2O and D_2O are $(5,31 \pm 0,30) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ and $(5,30 \pm 0,09) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. The absence of solvent isotope effect is indicative that a catalyst base group on the hemoglobin molecule may be involved in the abstraction of proton 2 in the Amadori rearrangement.

Keywords: Hemoglobin; Glycation; Fructose; Phosphate

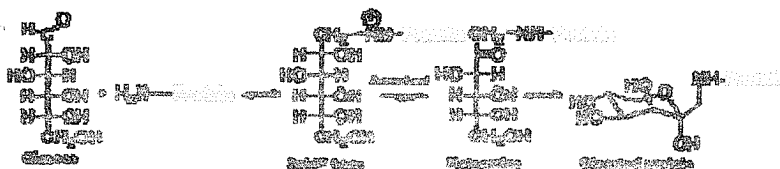
Introduction

Non-enzymatic glycation, is a natural phenomenon, which is the attachment of free sugar molecules to certain amino acid residues of proteins. The reaction between glucose and free amino structures in proteins forms complex cyclic structures that are related to diabetes complications and ageing.

Studies with a number of proteins indicate that glycation is not a random chemical modification of amino groups in proteins. There is preferential glycation of β -chain terminal

valine residues in hemoglobin¹ and a selective modification of a limited set of lysine residues in hemoglobin¹, albumin² and lipoprotein³. As shown in Scheme 1, the initial reversible condensation step of glucose and hemoglobin forms an aldimine or Schiff base which is able to undergo a nearly irreversible intermolecular Amadori rearrangement⁴.

Several factors have been reported that can influence the rate of glycation of hemoglobin: pH ^{4,6}, sugar concentration⁷, catalysis by buffer phosphate^{6,8}, arsenate and catalysis by



Scheme 1: Glycation of Hemoglobin.

buffer phosphate^{6,8}, arsenate and carbonate⁹, catalysis by 2,3-diphosphoglycerate^{5,10-12}, 3-phospho-glycerate, 2-phosphoglycerate and 2-glycerolphosphate¹³. Clearly inorganic^{6,8} and organic phosphates^{10,13,14} play an important role in determining the kinetics and specificity of glycation of hemoglobin. The role of inorganic phosphate and carbonate is not classical, proteolytic general acid-base catalysis, showing that a functional group on the hemoglobin is the abstracting base in the Amadori rearrangement⁶. The catalytic constants (k_B) for carbonate⁹ and phosphate⁸ buffer are the same with glucose.

Glucose is the most abundant reducing sugar in the body. This implies that the reducing sugar is generally considered in the non-enzymatic glycation reactions of biological interest. No clutch, any sugar that has a free carbonyl group can react with primary amino groups of proteins to form Schiff base.

The reactivity of the different sugars is given by the availability of its carbonyl group. Sugar molecules get stabilized by a balance between the open form and at least two closed forms (cyclic anomers) in which the carbonyl group disappeared. In 1953 Kastchalsky group showed a correlation between the reaction rate and the glycation ratio of the open form of the sugar. Have demonstrated the relative reactivity of hemoglobin with certain monosaccharides¹⁸, where the correlation is observed between the rate of interaction with the protein and the open form of the sugar.

Fructose, as is the case of other reducing sugars, undergoes Maillard reaction with proteins and amino acids. The initial stages of the reaction occur faster than with glucose fructose, approximately the rate of formation of Schiff base from amino groups of the hemoglobin with fructose is 7.5 times faster than that formed with glucose¹⁸.

The Maillard reaction with fructose is very similar to that with glucose (Scheme 2), but presents another grouping is called "Heyns rearrangement" and is shown generally as the replacement of 2-amino-2-deoxyaldose^{19,20} as shown in

Scheme 2. Others found to the 1-amino-1-deoxy-D-fructose is also formed in the reaction of fructose with amino acids^{19,20} and protein²¹.

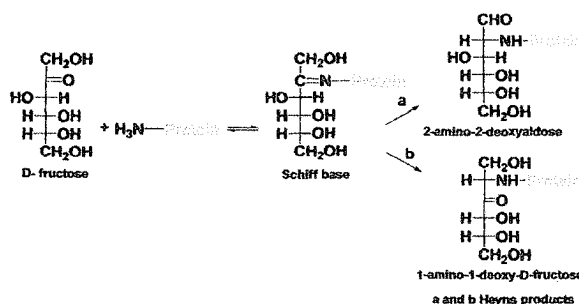
Studies indicate that high levels of fructose postprandial plasma are associated with retinopathy and possibly nephropathy in patients with type 2 diabetes²². Diets high in fructose (72 % by weight) in rats caused the development of diabetes mellitus and diffuse glomerulosclerosis²³.

Cataract formation in diabetes occurs through non - enzymatic glycation of proteins in the lens due to higher concentrations of sugars in the lens of the diabetic patients. Research conducted with [¹⁴C]fructose and gamma-II-crystalline bovine radiolabeled indicated that fructose had reacted in one site of the protein. The results of the amino acid analysis to the amino acid sequence of gamma-II-crystalline, it was concluded that the labeled peptide corresponded to the N-terminal dipeptide²⁴. The site of glycation of bovine gamma-II-crystalline by fructose was thereby identified as the alpha-NH₂ group of the N-terminal glycine²⁴. Molecular modeling study revealed that the most likely to join between fructose and hemoglobin sites are lysines: Lys 7 (α), Lys 127 (α) and Lys 66 (β)²⁵.

Because of all these factors that involve high consumption of fructose, we propose to perform a mechanistic study of the behavior of fructose directly with hemoglobin in the presence of phosphate buffer, if they react faster than glucose with hemoglobin formation HbA1c glyated hemoglobin should not be a substitute for glucose as side reactions accelerate diabetes and normal aging.

Experimental

Human hemoglobin was obtained from Sigma Chemical Co., fructose Sodium dihydrogen phosphate (NaH₂PO₄), disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄·7H₂O) and sodium chloride were purchased from Merck. Acrodisc filters 0.2 μm was from Gelman Sciences.



Scheme 2: Fructose Maillard reaction causes two (a and b) products Heyns¹⁹.

Phosphate buffer solutions at pH = 7.3 were prepared by mixing appropriate volumes of sodium dihydrogen phosphate (10 mM), disodium hydrogen phosphate (10 mM) and NaCl (0.15 M).

The reaction mixtures were prepared by mixing known volumes of hemoglobin with different concentrations of buffer phosphate, NaCl (0.15 M), pH = 7.3, fructose (40 mM) at 0°C. The final pH for phosphate buffer was 7.3 for all solutions. The reaction was started and maintained at 37 °C. All solutions were sterilized by ultrafiltration through a Gelman 0.2 µm filter (Acrodisc) in sterile plastic tubes.

The rates of glycation of hemoglobin under an atmosphere of air were measured by the appearance of the glycated hemoglobin¹⁵. Glycohemoglobin HbA_{1c} was eluted from a cation-exchange column and measured spectrophotometrically at 415 nm (Teco Diagnostics Kit^{15,17}). Hemoglobin concentration of 9.2×10^{-2} mM was employed with fructose (40 mM). The reaction media were 0.15 M of NaCl, buffered at 37 °C with mixtures of sodium dihydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate^{15,17}.

In the experiments to determinate solvent isotope effects for: phosphate buffer was held at 4.8 mM, pH 7.30, pD 7.84, at 37°C under similar condition of hemoglobin and fructose concentration. All solutions were sterilized by ultra-filtration thorough a Gelman 0.2 µm filter (Acrodisc) in sterile plastic tubes.

Results and discussion

Figure 1 shows an increase in the percent of HbA_{1c} formation with time at fixed concentrations of phosphate buffer at pH = 7.3, NaCl (0.15 M) at 37°C. The concentrations of hemoglobin and fructose were kept at 9.2×10^{-2} mM and 40 mM, respectively. Phosphate buffer was varied from 1.6 mM to 8 mM. The increase of HbA_{1c} formation with increase in phosphate concentration is indicative of catalysis by phosphate buffer.

Table 1 list the first order rate constants for Glycation of hemoglobin as a function of phosphate buffer concentrations at pH = 7.30, NaCl (0.15 M) at 37°C. The concentration of hemoglobin and fructose were held constant at 9.2×10^{-2} mM and 40 mM, respectively, and phosphate was varied from 1.6 mM to 8.0 mM. The first-order rate constants were calculated as the best-fit parameters which were obtained from a non-linear least squares fitting procedure to the first order equation:

$$[\text{HbA}_{1c}]_t = [\text{HbA}_{1c}]_{\infty} + ([\text{HbA}_{1c}]_0 - [\text{HbA}_{1c}]_{\infty})e^{-k_{\text{obs}}t}$$

Figure 2 shows an increase in the first order rate constants for glycation of hemoglobin as a function of phosphate buffer concentrations, pH 7.30, NaCl 0.15 M at 37°C. The concentration of hemoglobin and fructose were held

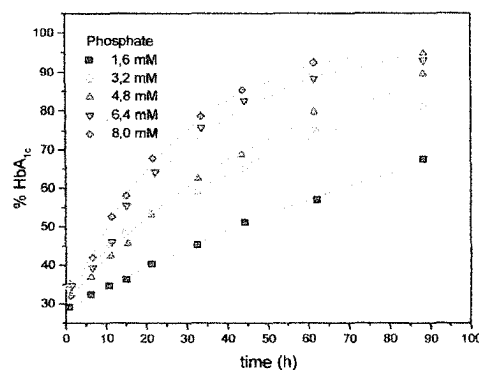


Fig. 1: Plot of formation of HbA_{1c} as a function of time in different concentration of phosphate buffer, pH 7.30 for glycation of hemoglobin at 37°C.

Table 1: First order rate constants for glycation of hemoglobin with fructose as a function of phosphate buffer pH 7.30, NaCl 0.15 M at 37°C.

[Fosfato] mM	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
1.6	2.38 ± 0.05
3.2	4.04 ± 0.10
4.8	5.31 ± 0.30
6.4	8.33 ± 0.40
8.0	10.07 ± 0.30

constant at 9.2×10^{-2} mM and 40 mM respectively, phosphate was varied from 1.6 mM to 8.0 mM. The first-order rate constants were calculated as the best-fit parameters obtained from a non-linear least squares fitting procedure to the first order equation.

The increase of rate constants (k_{obs}) with phosphate buffer is indicative of catalysis by phosphate. The kinetics exhibited both, a buffer independent term reflecting that the reaction assisted by water, ions (hydroxide or hydronium ions), or protein functional groups and a second-order term in buffer ($k_{\text{obs}} = k_0 + k_B [\text{Buffer}]$). The second order rate constants (k_B) calculated from the slopes (Figure 2) and the first order rate constant (k_0) for the spontaneous reaction from the intercepts (Figure 2). The catalytic constants (k_B) (slope) for phosphate is, $(11.40 \pm 0.60) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, the spontaneous rate reaction (k_0) (intercept) is $(5.30 \pm 1.60) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. A similar effect with hemoglobin and glucose was reported, $k_B = (1.67 \pm 0.11) \times 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $k_0 = (0.57 \pm 0.19) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. The glycation of hemoglobin is greater with fructose than glucose, figure 3. This observation is consistent with the extent to which the sugar exists in the open form. The equilibrium between the open and ring structures for glucose is 0.002 % and from fructose is 0.7 %¹⁶.

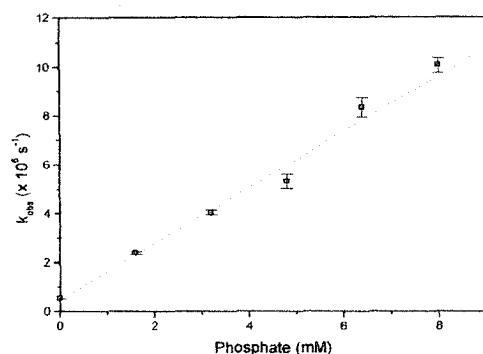


Fig. 2: Plot of first order rate constants for the glycation of hemoglobin with fructose as a function of phosphate concentration 37 °C y pH 7.3

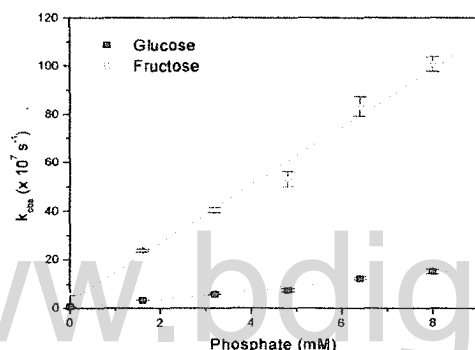


Fig. 3: Plot of first order rate constants for the glycation of hemoglobin with fructose and glucose as a function of phosphate concentration 37 °C y pH 7.3

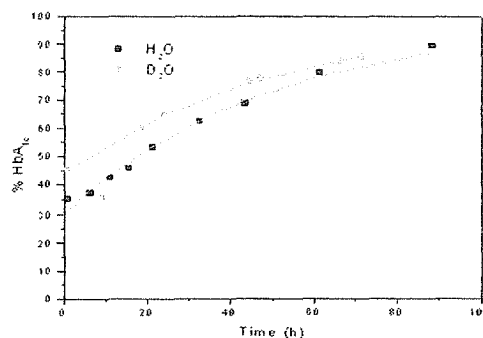


Fig. 4: Plot of formation of HbA_{1c} as a function of time in H₂O and D₂O phosphate 4.8 mM, pH 7.30, pD 7.84 at 37°C.

The glycation of hemoglobin with fructose exhibits identical rates in protium and deuterium oxides in phosphate buffer, figure 4. The first rate constant for phosphate in H₂O and D₂O are $(5.31 \pm 0.30) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ and $(5.30 \pm 0.09) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Phosphate buffer was held at 4.8 mM, pH 7.30, pD 7.84, at 37°C under similar condition of hemoglobin and fructose concentration. The absence of solvent isotope effect is indicative that the a catalyst base group on the hemoglobin is the proton-abstracting base in the Amadori rearrangement.

Conclusions

1. The reaction of hemoglobin with fructose is catalyzed by buffer phosphate.
2. The catalytic constant (k_B) for fructose is seven times higher than glucose.
3. The spontaneous reaction (k_0) for fructose is nine times bigger than glucose.
4. The glycation of hemoglobin with fructose exhibits identical rates in protium and deuterium oxides in phosphate buffer.
5. Non solvent isotope effect for phosphate is indicative that a functional group in the hemoglobin is the abstracting base in the Amadori rearrangement.

References

1. R Shapiro, M McManus, C Zulueta, C, H Bunn. Sites of Nonenzymatic Glycosylation of Human Hemoglobin *Journal of Biological Chemistry*, 255, 3120-3127 (1980).
2. R Garlick, J Mazer. Characterization of Glycosylated Hemoglobins: Relevance to Diabetic Control and Analysis of Other Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 6142-6146 (1983).
3. U Steinbrecher, J Witzum. Glycosylation of Low-Density Lipoproteins to an Extent Comparable to that Seen in Diabetes Slows Their Catabolism. *Diabetes*, 33, 130-134 (1984).
4. P Higgins, H Bunn. Kinetics Analysis of Nonenzymatic Glycosylation of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 5204-5208 (1981).
5. C Lowrey, S Lyness, J Soeldner. The Effect of Hemoglobin Ligands on the Kinetics of Human Hemoglobin Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 11611-11618 (1985).
6. H Gil, J Mata-Sagreda, R Schowen. Isotope Effects in the Nonenzymatic Glycation of Hemoglobin Catalyzed by Phosphate. *Actualidades de Fisicoquímica Orgánica*, 1, 286-306 (1991).
7. N Watkins, C Neglia-Fischer, D Dyer, S Thorpe, J Baynes. Effects of Phosphate on Kinetics of Glycation of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 7207-7212 (1987).

8. H Gil, J Mata-Sagreda, R Schowen. Proton Transfer Is not Rate Limiting in Buffer-Induced Nonenzymic Glycation of Hemoglobin. *Journal American of Chemical Society*, **110**, 8265-8266 (1988).
9. H Gil, B Vásquez, M Peña, J Uzcategui. Effect of Carbonate and Arsenate on the Kinetics of Glycation of Human Hemoglobin. *Journal Physical Organic Chemistry*, **17**, 537-540 (2004).
10. H Gil, J Uzcategui. Isotope Effects in the Non enzymatic Glycation of Hemoglobin Catalyzed by DPG. *Actualidades de Fisicoquímica Orgánica*, **1**, 109-121 (1993).
11. J Baynes, S Thorpe, M Murtiashaw. Non enzymatic Glucosylation of Lysine Residues in Albumin. *Method. Enzymol.*, **106**, 88-98 (1984).
12. R Smith, R Koenig, A Arjen, J Soeldner, T Aoki. Regulation of Hemoglobin A1C Formation in Human Erythrocytes in Vivo. *Journal Clinical Investigation*, **69**, 1164-1168 (1982).
13. H Gil, M Peña, B Vásquez, J Uzcategui. Catalysis by Organic Phosphates on the Glycation of Human Hemoglobin. *Journal Physical Organic Chemistry*, **15**, 820-825 (2002).
14. H Bunn, D Haney, K Gabbay, P Gallop. Further Identification of the Nature and Linkage of the Carbohydrate in Hemoglobin A1c. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **67**, 105-109 (1975).
15. V Stevens, H Vlassara, A Abati, A Cerami. Non enzymatic Glycosylation of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **252**, 2998-3002 (1977).
16. MF Perutz. Stereochemistry of Cooperative Effects in Hemoglobin. *Nature*, **228**, 726-739 (1970).
17. H Gil, J Peña and D Salcedo. Kinetics of Desolvation of the Glycation of hemoglobin catalyzed by buffer phosphate and arsenate. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **6**, 410-416 (2012).
18. H Bunn, P Higgins, P. Reaction of monosaccharide with proteins: Possible Evolutionary Significance. *Science*, **213**, 222-224 (1981).
19. G Suarez, R Rajaram, R, A Oronsky, Gawinowicz MA. Non enzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation), comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 3674-9 (1989).
20. W Dills. Protein fructosylation: Fructose and the Maillard reaction. *Journal of Clinical Nutrition*, **58**, 779-787 (1993).
21. J McPherson, B Shilton, D Walton. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry*, **27**, 1901-1907 (1988).
22. T Kawasaki, N Ogata, H Akanuma, T Sakai, H Watanabe, K Ichiiyanagi, T Yamanouchi. Postprandial plasma fructose level is associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, **53**, 583-588 (2004).
23. A Cohen, A Teitelbaum, E Rosenman. Diabetes induced by a high fructose diet. *Metabolism*, **26**, 17-24 (1977).
24. J Pennington, J Harding. Identification of the site of glycation of gamma-II-crystallin by (14C)-fructose. *Biochimica Biophysica Acta*, **1226**(2), 163-167 (1994).
25. T Bose, A Chakraborti. (2008). Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: Implication for oxidative stress in diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1780**, 800-808 (2008).