



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**Determinación del efecto hipoglicemiante de tres
macroalgas marinas en un modelo murino de diabetes
inducida por estreptozotocina**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Botánica

AUTOR

Noelia Ivette PEREZ VARILLAS

ASESOR

César Augusto CÓRDOVA CASTAÑEDA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Perez, N. (2021). *Determinación del efecto hipoglicemiante de tres macroalgas marinas en un modelo murino de diabetes inducida por estreptozotocina*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-3079-613X
DNI o pasaporte del autor	72795142
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-9613-7866
DNI o pasaporte del asesor	06563003
Grupo de investigación	ALGAS
Agencia financiadora	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de investigación básica y aplicada (PIBA). PIBA15A105. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Fondos Concursables: Con Asignación a la Investigación y Con Incentivo al Investigador (CON-CON). 161001221
Ubicación geográfica donde se realizó la investigación	Edificio: Laboratorio de Ficología Marina, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: 12°03'34.9"S Longitud: 77°04'55.8"W
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2015-2016
Disciplinas OCDE	Endocrinología, Metabolismo (incluyendo diabetes, hormonas) https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.18 Nutrición, Dietética https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.04 Biología marina, Biología de agua dulce, Limnología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.12



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA CON MENCIÓN EN BOTÁNICA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 17:02 horas del 02 de septiembre de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/ngr-bbun-hpf>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica** de **NOELIA IVETTE PÉREZ VARILLAS**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210060962, la titulando expuso su tesis: **“DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOGLICEMIANTE DE TRES MACROALGAS MARINAS EN UN MODELO MURINO DE DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica** a **NOELIA IVETTE PÉREZ VARILLAS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 18:42 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 02 de septiembre de 2021.

Mg. DOMINGO IPARRAGUIRRE LEÓN
(PRESIDENTE)

Mg. CÉSAR AUGUSTO CÓRDOVA CASTAÑEDA
(ASESOR)

Mg. JOSÉ ROQUE GAMARRA
(MIEMBRO)



Firmado digitalmente por ARBAIZA
PRADO Lourdes Elena FAU
20148092232 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 02.09.2021 22:51:12 -05:00

Blga. LOURDES ELENA ARBAIZA PRADO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres, Olivia y Francisco.

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a los integrantes del Laboratorio de Ficología Marina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el tiempo dedicado, su asesoría y las facilidades brindadas.

Así mismo, hago extensivo mi agradecimiento a mi familia y amigos, en especial a mi madre, Olivia, por el apoyo y fortaleza en todo momento de la realización de la tesis.

ABREVIATURAS

ANOVA	análisis de varianza
DE	desviación estándar
DM	diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirribonucleico
GLI	glibenclamida
GLUT	glucotransportador
h	hora
i. p.	intraperitoneal
L:O	luz:oscuridad
mg FGE	miligramos equivalente de floriglucinol
min	minuto
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
N. V.	nombre vulgar
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa
SA	actividad captadora de radicales
sig.	nivel de significancia
STZ	estreptozotocina
TEAC	capacidad antioxidante equivalente a Trolox

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	Sistemática y descripción de las macroalgas utilizadas	2
2.2.	Diabetes mellitus.....	3
2.3.	La estreptozotocina como inductor de DM	4
2.4.	Metabolitos de macroalgas marinas con actividad hipoglicemiante.....	5
3.	HIPÓTESIS.....	7
4.	OBJETIVOS.....	7
4.1.	Objetivo general.....	7
4.2.	Objetivos específicos	7
5.	MATERIALES	8
5.1.	Material biológico	8
5.2.	Material de laboratorio	8
5.2.1	Reactivos químicos.....	8
5.2.2.	Material de vidrio.....	9
5.2.3.	Equipos.....	9
5.2.4.	Otros.....	10
6.	MÉTODOLÓGÍA	11
6.1.	Recolección de macroalgas	11
6.2.	Inducción a DM con STZ.....	11
6.3.	Preparación del pélet con macroalga	11
6.4.	Preparación de los extractos de macroalgas.....	12
6.5.	Ensayo experimental en ratones con DM inducida.....	12
6.5.1.	Diseño experimental	13
6.5.2.	Indicadores experimentales	14
6.5.2.1.	Medición de glucosa en ayunas y peso corporal.....	14
6.5.2.2.	Determinación de tolerancia al almidón	14
6.5.2.3.	Determinación de tolerancia a la glucosa	14
6.5.2.4.	Caracterización histopatológica	15
6.6.	Ensayos bioquímicos de los extractos de macroalgas: cuantificación, identificación y actividad antioxidante de polifenoles	15
6.7.	Análisis estadístico	17
7.	RESULTADOS	18
7.1.	Inducción de diabetes con STZ	18
7.2.	Actividad hipoglicemiante de las macroalgas pulverizadas y extractos algales	18
7.2.1.	Peso corporal	18
7.2.2.	Glucosa basal.....	20
7.2.3.	Tolerancia a la glucosa.....	25
7.2.4.	Tolerancia al almidón.....	30
7.3.	Caracterización histopatológica	35
7.3.1.	Tejido pancreático	35
7.3.2.	Tejido hepático	37
7.3.3.	Tejido renal.....	38
7.4.	Ensayos bioquímicos de los extractos de macroalgas: cuantificación, identificación y actividad antioxidante de polifenoles	40

8.	DISCUSIÓN	43
9.	CONCLUSIONES.....	46
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
11.	GLOSARIO.....	52
	ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Grupos de experimentación.....	13
Tabla 2.	Preparación de muestras para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu	16
Tabla 3.	Registro de la glucosa basal (mg/dL) en el día 28 de experimentación de cada grupo de tratamiento	24
Tabla 4.	Prueba posterior al ANOVA, test de Duncan de las glicemias en sangre (mg/dL) en el min 120 de la prueba de tolerancia a la glucosa.....	30
Tabla 5.	Prueba posterior al ANOVA, test de Duncan de la glicemia en sangre (mg/dL) en el min 120 de la prueba de la tolerancia al almidón.....	34
Tabla 6.	Registro de la glicemia en sangre (mg/dL) en el min 120 de la prueba de la tolerancia al almidón de cada grupo de tratamiento	35
Tabla 7.	Análisis comparativo de las alteraciones del tejido pancreático entre los grupos de experimentación	36
Tabla 8.	Alteraciones del tejido hepático en los diferentes tratamientos.....	38
Tabla 9.	Alteraciones del tejido renal en los diferentes tratamientos	39
Tabla 10.	Tiempos de retención de los estándares de polifenoles.	40
Tabla 11.	Identificación de polifenoles en los extractos de macroalgas	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cajas plásticas de polipropileno adaptadas a manera de jaulas fabricadas en laboratorio.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2.	Distribución de los pesos y glucosa basal de los ratones después de 20 días de aclimatación, previa a la inducción con STZ	18
Figura 3.	Promedio y desviación estándar de pesos de individuos sometidos a tratamiento durante el bioensayo	19
Figura 4.	Gráficos de la glucosa basal (mg/dL) cada 7 días de tratamiento..	21
Figura 5.	Gráficos de la curva de tolerancia a la glucosa	26
Figura 6.	Gráficos de la curva de tolerancia al almidón	31
Figura 7.	Tejido pancreático de los ratones ensayados.....	36
Figura 8.	Tejido hepático de los ratones ensayados.	37
Figura 9.	Tejido renal de los ratones ensayados.	39
Figura 10.	Cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos de macroalgas.	40
Figura 11.	Cromatogramas de los extractos de macroalgas en superposición al cromatograma de los polifenoles estándares	42

RESUMEN

La diabetes es una enfermedad considerada una amenaza para la salud mundial, pues ha alcanzado cifras alarmantes de morbilidad y mortalidad, y desencadenando graves impactos económicos a nivel mundial. El presente estudio evalúa la actividad antidiabética de tres especies de macroalgas pardas peruanas: *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Petalonia binghamiae*. Se realizaron ensayos *in vivo* en ratones de la cepa BALB/c durante 28 días, los cuales fueron previamente inducidos a diabetes mediante una dosis única de 100 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) (glucosa basal mayor a 150 mg/dL). Como control positivo se utilizaron ratones con diabetes inducida tratados con glibenclamida (GLI). La administración de macroalgas como tratamiento se realizó de dos maneras: macroalga pulverizada como pélet y extracto de macroalga con cánula. Se evaluó semanalmente el peso y la glucosa basal. La tolerancia al almidón se aplicó a los 21 días y la tolerancia a la glucosa a los 28 días. Se aplicó un estudio histopatológico de páncreas, hígado y riñón al concluir el estudio. Así mismo, se realizó la cuantificación de polifenoles totales, actividad antioxidante e identificación de polifenoles mediante RP-HPLC. En los tratamientos con GLI y macroalgas, se observó una pérdida de peso con respecto del valor inicial, mayor en los extractos de *L. trabeculata*. En la glucosa basal, en la prueba de tolerancia a la glucosa y en la prueba de tolerancia al almidón, *L. trabeculata* pulverizada disminuyó la hiperglicemia y reguló la glucosa posprandial. En el estudio histopatológico, los tratamientos con macroalga pulverizada mostraron un efecto protector. Los extractos de *L. trabeculata* presentaron mayor cantidad de polifenoles y mayor capacidad captadora de radicales libres. El mayor número de polifenoles identificados corresponde a *P. binghamiae*.

Palabras clave: hiperglicemia, diabetes, macroalgas marinas, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Petalonia binghamiae*.

ABSTRACT

Diabetes is a disease considered a threat to global health, which has reached alarming morbidity and mortality figures, triggering serious economic impacts worldwide. The present study evaluates the antidiabetic activity of three peruvian brown seaweeds species: *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* and *Petalonia binghamiae*. *In vivo* assays were performed in BALB/c mice for 28 days, which were previously induced to diabetes by a single dose of 100 mg/Kg of streptozotocin (STZ) (basal glucose greater than 150 mg/dL). Glibenclamide (GLI) treated mice with induced diabetes were used as a positive control. The administration of algae as treatment was performed in two ways pulverized algae as pellet and algae extract with cannula. Basal weight and glucose were assessed weekly. Starch tolerance was applied at 21 days and glucose tolerance at 28 days. A histopathological study of pancreas, liver and kidney was applied at the end of the study. Total polyphenol quantification, antioxidant activity and polyphenol identification by RP-HPLC were also performed. In the GLI and algae treatments, a weight loss was observed with respect to the initial value, being greater in the *L. trabeculata* extracts. In basal glucose, glucose tolerance test and starch tolerance test, pulverized *L. trabeculata* decreases hyperglycemia and regulates postprandial glucose. In the histopathological study, pulverized seaweed treatments show a protective effect. *L. trabeculata* extracts have a higher amount of polyphenols and a higher free radical scavenging capacity. The highest number of polyphenols identified corresponds to *P. binghamiae*.

Keywords: hypoglycemic, diabetes, seaweed, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Petalonia binghamiae*.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 12 000 años, las macroalgas marinas formaron parte de la dieta y del uso medicinal de los primeros habitantes de América del Sur (Dillehay et al. 2008). Mientras que, desde hace 6 000 años, los países del oriente les han dado el mismo uso (Nisizawa et al. 1987), siendo el Sudeste de Asia la región con menor prevalencia de diabetes (Federación Internacional de Diabetes 2019). A la fecha, su uso se ha difundido en casi todo el mundo y los estudios se centran en la validación de aquellos compuestos bioactivos (polifenoles y polisacáridos) implicados en la terapia de distintas enfermedades que aquejan frecuentemente a la población mundial; entre ellas, la obesidad y la diabetes (Kang et al. 2008; Kang et al. 2010; Mohamed, Hashim y Rahman 2012; Anand et al. 2016).

La diabetes, enfermedad no transmisible, es de condición crónica, no posee cura, evoluciona rápida y progresivamente, y es actualmente una de las cuatro enfermedades más importantes de salud pública por tener una alta tasa de prevalencia, morbilidad y mortalidad anual a nivel mundial (OMS 2019). En América del Sur y América Central, en 2019, se reportaron aproximadamente 335,1 millones de casos en la población de 20 a 79 años, de los cuales 1,38 millones de casos corresponden al Perú (6,7% de la población nacional) (IDF 2019).

En las costas del Pacífico occidental algunas especies de macroalgas marinas son tradicionalmente consideradas como materia prima para la producción de hidrocoloides y que se comercializa a Asia y Europa. Esta actividad no sustentable genera una gran presión extractiva en los ecosistemas marinos (Acleto 1986; Hoffmann y Santelices 1997; Camus, Hernández-González y Buschmann 2019). El presente estudio pretende demostrar la actividad hipoglicemiante de tres especies de macroalgas pardas, propiedad que les permitiría un mayor valor agregado a estos recursos, promoviendo su uso sustentable a través de la maricultura.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Sistemática y descripción de las macroalgas utilizadas

División	:	Ochrophyta
Clase	:	Phaeophyceae
Orden	:	Laminariales
Familia	:	Lessoniaceae
Especie	:	<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta y Santelices
N. V.	:	“palo blanco”, “cabeza”

“Las plantas son erectas, con apariencia de arbusto o árbol, alcanzan a unos 2.5 m de largo. Están adheridas al sustrato rocoso mediante un disco macizo, de forma irregular, de hasta 20 cm de alto, formado por hapterios fusionados entre sí. De él se originan los estipes, en número que varía entre 1 y 30 (excepcionalmente llegan a ser hasta 50). Los estipes son gruesos, rígidos, ligeramente aplanados. Se ramifican 3-4 veces en forma dicotómica o subdicotómica. Las láminas son lineales o lineal-lanceoladas, con márgenes lisos o dentados, hasta 85 mm en láminas indivisas y hasta 125 mm en láminas en división.

La morfología de las plantas varía con la edad. Los discos de plantas jóvenes (de hasta 20 cm de largo) presentan hapterios libres o sólo parcialmente fusionados, estipes cortos y aplanados y láminas de bordes dentados. Luego los hapterios tienden a fusionarse, iniciando la formación de un disco macizo. El número de estipes disminuye (posiblemente por la acción de pastoreadores) y su longitud aumenta. Las plantas adultas tienen unos pocos estipes alargados, ramificados sólo en sus porciones distales.” (Hoffmann y Santelices 1997, p:181)

División	:	Ochrophyta
Clase	:	Phaeophyceae
Orden	:	Laminariales
Familia	:	Laminariaceae
Especie	:	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C. Agardh
N. V.	:	“huiró”, “sargazo”, “bolas”

“Las plantas, erectas, miden hasta 30 m de largo. Se adhieren al sustrato mediante un disco basal cónico. El disco está formado por hapterios ramificados, de hasta 1 cm de grosor, no fusionados entre sí, que forman una masa densa de más de 1 m de diámetro. Los hapterios nacen en capas superpuestas que, en ejemplares viejos, llegan a circundar la base de los primeros estipes. Del disco nacen los estipes, cilíndricos, que terminan en láminas de hasta 70 cm de largo, provistas de un aerocisto piriforme basal, lleno de aire. Entre la porción terminal del estipe y la base de la lámina se producen fisuras en dirección distal. Al avanzar estas fisuras hasta el borde de la lámina, van dando origen a nuevos estipes y láminas.” (Hoffmann y Santelices 1997, p:189)

División	:	Ochrophyta
Clase	:	Phaeophyceae
Orden	:	Ectocarpales
Familia	:	Scytosiphonaceae
Especie	:	<i>Petalonia binghamiae</i> J. Agardh

“Los talos, de color pardo claro a oscuro, alcanzan hasta 20 cm de alto. A menudo se originan varias láminas de una base discoidea común, formando una especie de penacho. Los estipes son cortos, cilíndricos, de no más de 3 cm de largo. Las frondas son laminares o lineales, de hasta 3 cm de ancho, carecen de nervio medio con superficie lisa y márgenes fuertemente engrosados y ondulados. En ejemplares adultos los ápices son aguzados u obtusos; a menudo la parte distal a las zonas fértiles presenta zonas necrosadas.” (Hoffmann y Santelices 1997, p:165)

2.2. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica de alta incidencia en el mundo, debido al estilo de vida actual. En 2019, afectó a un total de 351,7 millones de personas

a nivel mundial, registrándose 4,2 millones de adultos fallecidos entre los 20 y los 79 años de edad, generando un gasto de 760 mil millones de USD en atención hospitalaria, con un impacto económico negativo significativo. A su vez, se estima que las cifras de personas diabéticas se incrementarán a 417,3 millones en 2030 y a 486,1 millones en 2045 (IDF 2019).

Este trastorno afecta el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, debido a la insuficiencia del páncreas en la producción de insulina o por la ineficiencia de los receptores para el uso de ella, lo que produce un incremento de la glucosa en sangre (Shaw, Sicree y Zimmet 2010).

El tratamiento temprano de pacientes con DM consiste en un control efectivo de la glucosa en sangre; ello, debido a la complejidad de la enfermedad, requiere de una elección de terapia particular, lo cual disminuye las complicaciones y la mortalidad. Las terapias incluyen una diversidad de fármacos que actúan brindando una mayor disponibilidad sistémica de insulina e incrementando la sensibilidad de los tejidos (Bailey 2015)

De modo particular, la glibenclamida (sulfonilurea de segunda generación) tiene efecto betacitotrópico en el páncreas, induciendo la secreción de insulina. Este fármaco es de rápida absorción en el tracto gastrointestinal, alcanza concentraciones plasmáticas máximas después de 2 a 4 h de ingerido, con una vida media de 15 h y acción de 24 h (Jonsson et al. 1994).

2.3. La estreptozotocina como inductor de DM

La estreptozotocina (STZ) es un compuesto análogo de la N-acetil glucosamina que posee un resto de glucosa unido al resto N-metil-N-nitrosourea. Tiene propiedad diabetogénica, que se caracteriza por la destrucción selectiva de células β pancreáticas, deficiencia de insulina, hiperglucemia, polidipsia y poliuria que se asemejan a la diabetes humana. El ingreso de STZ a las células β pancreáticas se produce mediante el

transportador de glucosa GLUT2 y su acumulación produce citotoxicidad debido a la nitrosourea. El daño celular también ocurre en todas las células que poseen el receptor GLUT2. El mecanismo de citotoxicidad de la STZ involucra la genotoxicidad mediante alquilación y metilación del ADN, lo que desencadena el daño celular, eventual apoptosis y necrosis, que resulta en inhibición de la biosíntesis y secreción de insulina. Finalmente, se activan los mecanismos de inflamación, mediante la señalización NF- κ B, que son vías de señalización sensibles al estrés, en un estado de hiperglucemia y estrés oxidativo (Goyal et al. 2016; Lenzen 2008).

2.4. Metabolitos de macroalgas marinas con actividad hipoglicemiante

Hasta hace unos años, las macroalgas marinas solo eran consideradas como productores primarios y como materia prima para la producción de ficocoloides (agar, carragenano y alginato) de necesidad aún creciente en el mercado internacional, pero que no sustenta la acuicultura (Mansilla et al. 2012). Sin embargo, las macroalgas marinas son una fuente de metabolitos secundarios con alto potencial farmacológico, que les ha permitido adaptarse a un ambiente cambiante, con alta exposición a luz, irradiación UV y desecación, que desencadenan la formación de radicales libres fuertemente oxidantes. Estos metabolitos han sido utilizados en la prevención y terapia de síndromes metabólicos, como obesidad, dislipidemia, diabetes e hipertensión, lo que ha incrementado la importancia económica de las macroalgas marinas (Jimenez-Escrig et al. 2001; Jimenez-Escrig, Gomez-Ordenez y Ruperez 2012; Mohamed, Hashim y Rahman 2012).

Algunos compuestos bioactivos de macroalgas marinas podrían estar implicados en la inhibición de enzimas (α -amilasa, α -glucosidasa, aldosa reductasa y proteína tirosina fosfatasa 1B), inhibición hormonal de incretinas y la regulación de glucosa. Estos compuestos bioactivos podrían ser utilizados como antidiabéticos, antiobesidad, antiinflamatorios y citoprotectores de células β pancreáticas (Sharifuddin et al. 2015).

De modo particular, las macroalgas pardas *Ecklonia* spp. y *Petalonia binghamiae* han mostrado actividad antidiabética, inhibiendo actividad enzimática, impidiendo la absorción de glucosa, aumentando la sensibilidad a la insulina y protegiendo al paciente de complicaciones derivadas de la enfermedad (Lee y Jeon 2013; Tong et al. 2014).

Las macroalgas pardas son especialmente ricas en una gran diversidad de polisacáridos sulfatados, entre ellos, los fucoidanos y el ácido algínico. Estos polisacáridos tienen actividad biológica hipoglicemiante e hipolipidémica, por lo cual podrían ser utilizados en el tratamiento de diabetes o como ingredientes de alimentos funcionales en beneficio de la salud (Costa et al. 2010; Jia et al. 2014).

En ensayos *in vivo*, se demostró que los polisacáridos de *Himanthalia elongata* reducen significativamente (hasta el 50%) el nivel de glucosa en sangre posprandial en un modelo de diabetes inducida (Lamela et al. 1989). Así mismo, los fucoidanos de *Sargassum wightii* tienen actividad inhibitoria de la α -glucosidasa y α -amilasa (Senthil et al. 2015; Kumar et al. 2015). Y, finalmente, se ha demostrado que los oligosacáridos de alginatos pueden ser utilizados en el tratamiento de DM debido a su actividad hipoglucémica, hipolipidémica, antiobesidad, antioxidante, inmunorreguladora y antiinflamatoria (Xing et al. 2020).

3. HIPÓTESIS

Hipótesis nula = Las macroalgas pardas estudiadas no tienen actividad hipoglicemiante.

Hipótesis alternativa = Las macroalgas pardas estudiadas tienen actividad hipoglicemiante.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad hipoglicemiante de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Petalonia binghamiae* en ratones diabéticos inducidos.

4.2. Objetivos específicos

- Inducir diabetes con STZ a ratones de la cepa BALB/c y aleatorizar para lograr equivalencia inicial de los tratamientos.
- Determinar la actividad hipoglicemiante de las macroalgas pulverizadas y extractos algales en ratones diabéticos inducidos.
- Caracterizar histológicamente el estado del páncreas, hígado y riñón en los ratones ensayados.
- Realizar la cuantificación de los polifenoles totales, identificar y determinar la capacidad antioxidante de los extractos algales.

5. MATERIALES

5.1. Material biológico

- Ejemplares de las especies: *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices, *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, *Petalonia binghamiae* (J.Agardh) K.L.Vinogradova
- Ratones (*Mus musculus*) cepa BALB/c machos con 4 semanas de edad (con un peso promedio de $19,5 \pm 5,5$ g) del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud

5.2. Material de laboratorio

5.2.1 Reactivos químicos

- Ácido cafeico, Sigma-Aldrich, CAS 331-39-5
- Ácido cítrico monohidratado, Sigma-Aldrich, CAS 5949-29-1
- Ácido clorogénico, Sigma-Aldrich, CAS 327-97-9
- Ácido cumárico, Sigma-Aldrich, CAS 501-98-4
- Ácido ferúlico, Sigma-Aldrich, CAS 537-98-4
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich, CAS 149-91-7
- Ácido protocatecuico, Sigma-Aldrich, CAS 99-50-3
- Ácido siríngico, Sigma-Aldrich, CAS 530-57-4
- Ácido vanílico, Sigma-Aldrich, CAS 121-34-6
- Agar bacteriológico, Criterion, CAS 9002-18-0
- Agua destilada
- Almidón comercial
- Citrato de sodio, CAS 6132-04-32
- Estreptozotocina (STZ), Sigma-Aldrich, CAS 18883-66-4
- Etanol al 96%

- Formol al 10%
- Glibenclamida (GLI) 5 mg en tableta, Farminindustria
- Glucosa mohohidratada al 33,3% en solución inyectable
- Miricetina, Sigma-Aldrich, CAS 529-44-2
- Quercetina, Sigma-Aldrich, CAS 117-39-5
- Solución salina
- Folin-Ciocalteu, Supelco, 109001
- Carbonato de sodio, Supelco, CAS 497-19-8
- Floroglucinol, Supelco, CAS 108-73-6
- ABTS, Sigma-Aldrich, CAS 30931-67-0

5.2.2. Material de vidrio

- Frascos de vidrio estériles de 250 mL
- Kitasato de 2 L
- Matraces de 250 mL
- Placas Petri estériles
- Probetas de 1 L
- Vasos precipitados diversos

5.2.3. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica, marca KERN®, modelo ABJ-220-4NM
- Bomba de vacío
- Cámara de aislamiento térmico
- Centrífuga, marca Gemmy Industrial Corp., modelo PLC-03
- Espectrofotómetro, Genesys 10S UV-VIS

- Estufa universal, marca Memmert GmbH + Co.KG, modelo UFE 400, con flujo de aire caliente, de temperatura y tiempo programable
- Glucómetro, marca Accu-Chek® Active
- Liofilizador, marca Rificor modelo L-I-E300-CRT
- Medidor de pH, marca Hanna Instruments, modelo HI4221
- Micropipetas, marca Axypet, modelo AP-1000/100 - 1000 µL
- Molino eléctrico, marca Moulinex
- Rotavapor, Boeco modelo RVO 400 SD
- Termómetro ambiental, marca Coolbox, modelo 968H
- Termoventilador, marca Miray, modelo ETM - 221
- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento Chromaster HPLC, marca Hitachi High-Technologies
- *Software* de sistema de gestión de datos cromatográficos, EZChrom Elite

5.2.4. Otros

- Agua para consumo estéril
- Alimento balanceado para roedores adquiridos en el Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud.
- Cajas de plásticas de polipropileno adaptadas a manera de jaulas
- Cánulas esofágicas para alimentación de roedores calibre 22 G
- Filtros estériles para jeringa de 45 µm de porosidad
- Frascos plásticos de 200 mL para almacenamiento de muestras histológicas
- Jeringas de 10 mL
- Jeringas de insulina
- Jeringas tuberculina
- Leche en polvo comercial
- Lecho de viruta estéril

6. MÉTODOLÓGÍA

6.1. Recolección de macroalgas

Las macroalgas, identificadas por el Mg. César Córdova (anexo 1, 2 y 3), se recolectaron en el intermareal rocoso y submareal somero de la localidad de Pisco, Ica ($14^{\circ}03'07''$ S, $76^{\circ}16'46''$ W), durante el periodo de baja marea. El material fue enjuagado con agua de mar para retirar epífitos y arena; luego, fue oreado al sol, envuelto en papel toalla humedecida e inmediatamente trasladado al laboratorio de Ficología Marina-UNMSM a una temperatura de 8° C. Una vez en el laboratorio, las macroalgas fueron lavadas rápidamente con un chorro agua de caño para retirar la sal y restos orgánicos; luego, se enjuagaron con agua destilada y, posteriormente, se procedió a secarlas en una estufa de convección forzada a 60° C durante 2 h. Una vez secas, se procedió a trozar y moler en un molino hasta obtener polvo fino que después fue tamizado con malla de $500\ \mu\text{m}$. Las macroalgas pulverizadas se almacenaron en bolsas herméticas y al vacío.

6.2. Inducción a DM con STZ

Para lograr ratones con DM inducida se empleó el método de Wu y Huan (2008) con una modificación, administrando una dosis única de $100\ \text{mg/Kg}$ de STZ. A los 7 días se determinó la glucosa basal en ayunas utilizando un glucómetro. Los ratones que tenían valores superiores a $150\ \text{mg/dL}$ de glucosa basal fueron considerados diabéticos y fueron incluidos en el estudio.

6.3. Preparación del pélet con macroalga

Para la administración oral del macroalga pulverizada se eligió utilizar como vehículo leche en polvo comercial para mejorar la palatabilidad (Chen et al. 2009), formulando el pélet con una mezcla homogénea de 7 g de macroalga pulverizada, 14 g de leche y 1,4 mL de agar al 0,4% (0.5:1:0.1). Cada pélet contiene aproximadamente 0,1 g de macroalga equivalente a la dosis de $4\ \text{g/Kg}$. En el tratamiento con GLI, 5 mg del fármaco

pulverizado se prepararon en las mismas proporciones (0.0005:1:0.01) descritas anteriormente. Para la alimentación del grupo control solo se utilizó leche y agar (1.5:0.01). Para evitar la degradación de los compuestos bioactivos del alga, los pélets fueron preparados para 7 días de tratamiento y conservados a 8 °C.

6.4. Preparación de los extractos de macroalgas

A 100 g de macroalga pulverizada se agregó 1 L de etanol al 80%, se dejó reposar durante 48 h en oscuridad a temperatura ambiente y, finalmente, se filtró. Al residuo se aplicó el mismo tratamiento indicado anteriormente. Ambos sobrenadantes fueron mezclados y se procedió a concentrar la muestra en rotavapor. Se liofilizó hasta polvo seco y se conservó a -20 °C hasta su posterior uso. Para su uso, se agregaron 500 mL de agua destilada y se colocó en agitador magnético durante 24 h.



Figura 1. Jaulas fabricadas en laboratorio.

6.5. Ensayo experimental en ratones con DM inducida

Los ratones fueron pesados, marcados con un código individual e instalados en jaulas individuales (fig. 1) en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. Con

fotoperiodo 12:12 (L:O), temperatura ambiental de 23 °C ± 2, humedad 50% ± 2, iluminación máxima de 323 lux a un metro del piso. El mantenimiento de los ratones (agua, alimentación y limpieza) fue durante la mañana y tuvieron libre acceso al agua y alimento balanceado (*ad libitum*), cumpliéndose con las buenas prácticas para el uso de animales de experimentación.

6.5.1. Diseño experimental

Los ratones fueron agrupados en 12 grupos experimentales conformados por 6 a 10 individuos y sometidos a tratamiento durante 28 días.

Tabla 1. Grupos de experimentación. Se indica el nombre, abreviatura, número de individuos y dosis.

N°	Código	Grupos de Experimentación	N° ratones	Dosis	
				g/Kg	g/individuo
1	ND	No DM inducidos	15	-	-
2	DT0	Diabéticos con placebo	10	-	-
3	DGLi	Diabéticos tratados con Glibenclamida	7	0,004	0,0001
4	Pb0,1P	Diabéticos tratados con pélet de <i>Petalonia binghamiae</i>	6	4	0,1
5	Mp0,1P	Diabéticos tratados con pélet de <i>Macrocystis pyrifera</i>	7	4	0,1
6	Lt0,1P	Diabéticos tratados con pélet de <i>Lessonia trabeculata</i>	6	4	0,1
7	Pb0,1E	Diabéticos tratados con extracto de <i>Petalonia binghamiae</i>	12	4	0,1
8	Mp0,1E	Diabéticos tratados con extracto de <i>Macrocystis pyrifera</i>	8	4	0,1
9	Lt0,1E	Diabéticos tratados con extracto de <i>Lessonia trabeculata</i>	9	4	0,1
10	Pb0,05E	Diabéticos tratados con extracto de <i>Petalonia binghamiae</i>	9	2	0,05
11	Pb0,01E	Diabéticos tratados con extracto de <i>Petalonia binghamiae</i>	6	0,4	0,01
12	Lt0,04E	Diabéticos tratados con extracto de <i>Lessonia trabeculata</i>	6	1,6	0,04

El grupo 1 fue de ratones no DM inducidos (ND), al grupo 2 se le aplicó placebo (DT0), el grupo 3 fue tratado con GLI (DGLi). A los grupos 4, 5 y 6 (*P. binghamiae*, *M. pyrifera* y *L. trabeculata*) se les administró el pélet con macroalga pulverizada a una concentración de 4 mg/Kg (Pb0,1P, Mp0,1P y Lt0,1P). A los grupos 7, 8 y 9 (*P. binghamiae*, *M. pyrifera* y *L. trabeculata*) se les aplicó vía oral el extracto de macroalga mediante cánula a una concentración de 4 mg/Kg (Pb0,1E, Mp0,1E y Lt0,1E) (tabla 1). Los grupos 10 y 11 fueron tratados con menores dosis de extracto de *P. binghamiae*, 2 y 0,4 mg/Kg, respectivamente. Del mismo modo, al grupo 12 se les administró extracto de *L. trabeculata* en una dosis de 1,6 mg/Kg (tabla 1).

6.5.2. Indicadores experimentales

6.5.2.1. Medición de glucosa en ayunas y peso corporal

La medición de los niveles de glucosa en ayunas se realizó cada 7 días durante 4 semanas, en una muestra de sangre extraída de la vena caudal que se midió con el glucómetro. Se registró el peso corporal cada 7 días, durante el periodo de experimentación. En todos los procedimientos para la extracción de sangre se tuvo el cuidado de ocasionar el menor daño posible.

6.5.2.2. Determinación de tolerancia al almidón

Luego de 3 semanas de experimentación, los ratones fueron sometidos a la prueba de tolerancia al almidón; para ello, se comenzó con un periodo de ayuno de 6 horas. Transcurrido este periodo, se administró una solución de 0,2 g/mL de almidón mediante vía oral en una dosis de 2 g/Kg. El volumen de solución de almidón administrado fue ajustado conforme al peso del individuo. Los niveles de glucosa se determinaron en la muestra de sangre al inicio de la prueba (min 0), y posteriormente a los 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de la solución de almidón.

6.5.2.3. Determinación de tolerancia a la glucosa

Luego de 4 semanas de experimentación, los ratones fueron sometidos a la prueba de tolerancia a la glucosa; para ello, se comenzó con un periodo de ayuno de 6 horas, transcurrido el cual se administró glucosa vía intraperitoneal (2 g/Kg). Los niveles de glucosa fueron determinados en una muestra de sangre al inicio de la prueba (min 0), y posteriormente a los 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de glucosa vía intraperitoneal.

6.5.2.4. Caracterización histopatológica

Al finalizar el ensayo *in vivo* (día 28 de experimentación), todos los ratones fueron sacrificados, respetando los lineamientos estipulados en el código de ética para experimentos con animales de laboratorio. Previo a ello, para un estudio histopatológico, se seleccionaron 5 ratones al azar de cada uno de los siguientes grupos de experimentación: ND, DT0, DGli y diabéticos tratados con macroalga pulverizada de *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae*. Se extrajeron páncreas, hígado y riñón derecho, se lavaron con suero fisiológico para remover la sangre y partículas adheridas al tejido y se procedió con la fijación en una solución de formaldehído al 10%.

Las muestras fueron enviadas para su procesamiento hasta láminas histológicas al Instituto de Patología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En el instituto, las muestras fueron incluidas en parafina, cortadas y teñidas en hematoxilina-eosina.

Con la finalidad de observar las alteraciones microscópicas producidas por la STZ y su posible recuperación con los diferentes tratamientos, las láminas preparadas fueron analizadas empleando un microscópico óptico Leica. Se observó el tejido de los ratones sin diabetes inducida, su alteración por STZ y los efectos de los tratamientos sobre los tejidos, lo cual fue registrado a través de microfotografías.

6.6. Ensayos bioquímicos de los extractos de macroalgas: cuantificación, identificación y actividad antioxidante de polifenoles

La cuantificación de polifenoles en los extractos de macroalgas, previo a su uso en los ratones, fue determinada empleando el método de Folin y Ciocalteu (1927) y se usó como curva estándar ($y = 0,0008x - 0,0038$; $R^2 = 0,9989$) de equivalentes de floroglucinol.

Tabla 2. Preparación de muestras para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

	R1 (mL)	R2 (mL)	R3 (mL)	ESTÁNDAR (mL)	BLANCO (mL)
EXTRACTO	0,1	0,1	0,1	-	-
FLOROGLUCINOL	-	-	-	0,1	-
AGUA DESTILADA	6	6	6	6	6,1
FOLIN-CIOCALTEU	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
CARBONATO DE SODIO AL 20%	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
AGUA DESTILADA	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9

Para ello, se tomó 0,1 mL de extracto empleando una micropipeta, se mezcló con 7,9 mL de agua destilada, 0,5 mL de Folin-Ciocalteu y 1,5 mL de NaCO₃ al 20%; la reacción fue realizada en frascos ámbar adicionando los reactivos de acuerdo con la tabla 2, se procedió a agitar y se mantuvo en oscuridad y refrigeración durante 2 horas; cada extracto fue evaluado tres veces (R1, R2 y R3). Como estándar se usó una solución de floroglucinol al 0,5 mg/mL y como solución blanco se usó agua destilada. Inmediatamente, después del tiempo de reacción (2 h) se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV visible.

También se evaluó la actividad captadora de radicales libres del catión radical ABTS⁺, empleando la metodología de Jimenez-Escrig, Gomez-Ordenez y Ruperez (2012). Para la producción del ABTS⁺, se mezclaron 66 mg de ABTS con 10 mL de solución de 2,5 mM de persulfato de potasio; esta mezcla fue conservada en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso. La solución se diluyó con agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de 0,70 ± 0,02 a 658 nm en un espectrofotómetro UV visible. Así mismo, para determinar la actividad captadora de radicales (SA) de los extractos de macroalgas se agregó 0,1 mL de extracto a 3,9 mL de la solución de ABTS⁺ y la lectura de la absorbancia fue tomada a 734 nm en intervalos de 1 min hasta el min 10. El porcentaje de SA se calculó con siguiente fórmula: SA% = [(Abs muestra - Abs blanco)/Abs blanco] x 100. Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Por último, se realizó la identificación de polifenoles de los extractos mediante el análisis en cromatografía líquida de alta eficiencia de fase inversa (RP-HPLC) empleando el

método de López et al. (2011), el cual consistió en un sistema de gradiente en dos fases móviles, donde el eluyente A fue agua con ácido fórmico al 0,1% y el eluyente B fue metanol. Además, se empleó una columna de fase reversa C18, con un sistema de caudal de 1,0 mL/min, el volumen de inyección fue de 240 µL de extracto (conteniendo 96 mg de macroalga) y fue operado a una temperatura de 27 °C. Las condiciones de elución aplicadas fueron de 0 a 5 min en isocrático al 20% de B, de 5 a 30 min en gradiente lineal del 20% al 60% de B, de 30-35 min en isocrático al 60% de B, de 35 a 40 min en gradiente lineal de 60% a 20% de B. Posteriormente, se lavó y reacondicionó la columna para proceder el análisis de la siguiente muestra. Para la identificación fue establecido el monitoreo simultáneo a 270 nm para ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, a 324 nm para ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y a 373 nm para miricetina y quercetina.

Los análisis cromatográficos fueron realizados en un equipo de RP-HPLC del Laboratorio de Equipamiento Especializado (LEE) de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM.

6.7. Análisis estadístico

Con la finalidad de demostrar el efecto hipoglicemiante de los extractos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata* y *P. binghamiae*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía; para ello, previamente se aplicó la prueba de homocedasticidad de varianzas de Cochran ($\alpha = 0,05$) y la prueba de bondad de ajuste para normalidad de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de confianza de 95%, para evaluar si los datos presentaban una distribución normal. A determinadas diferencias significativas (*p* valor < 0,05) se les aplicó una comparación múltiple posterior al análisis de varianza mediante la prueba de Duncan.

7. RESULTADOS

7.1. Inducción de diabetes con STZ

Los ratones se adaptaron a las condiciones del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM y al término de 20 días se registraron su peso y la glucosa basal para comprobar su estado normoglicémico, los cuales fueron $22,6 \pm 2,5$ g y $67,9 \pm 13,6$ mg/dL, respectivamente (fig. 2 A y B).

Aplicando una dosis de 100 mg/Kg de STZ, se tuvo como resultado el 50,7% de ratones diabéticos (106 individuos), con una media de glucosa basal de 305 ± 116 mg/dL.

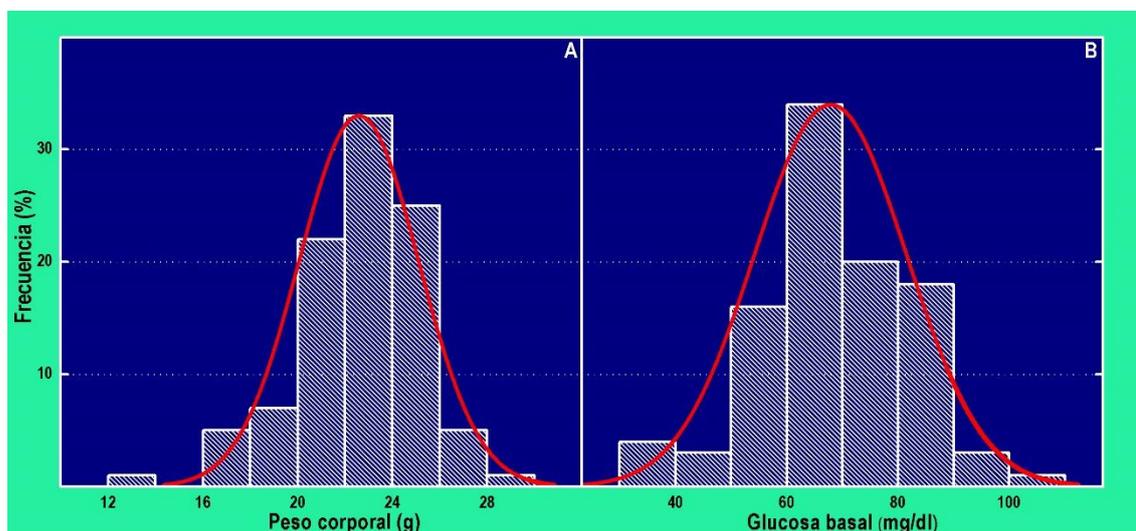


Figura 2. Distribución de los pesos y glucosa basal de los ratones después de 20 días de aclimatación, previa a la inducción con STZ. A. Histograma de pesos. B. Histograma de la glucosa basal.

7.2. Actividad hipoglicemiante de las macroalgas pulverizadas y extractos algales

7.2.1. Peso corporal

Al iniciar los tratamientos (día 0), el grupo ND registró un peso corporal de $34,4 \pm 2,7$ g; mientras que los ratones diabéticos tuvieron valores promedio entre 28,8 y 32,1 g. Pese a las diferencias, estas no fueron estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; 0,137) entre los grupos de experimentación con DM inducida. Entre los ratones con DM inducida

fueron encontradas diferencias significativas dependientes de los tratamientos aplicados durante el bioensayo. Con la prueba posterior al ANOVA —el test de Duncan— en el día 7, el grupo ND tuvo un peso corporal promedio de $36,3 \pm 3,1$ g y fue diferente estadísticamente de los DM inducidos, los cuales estaban entre 27,3 y 31,1 g (fig. 3).

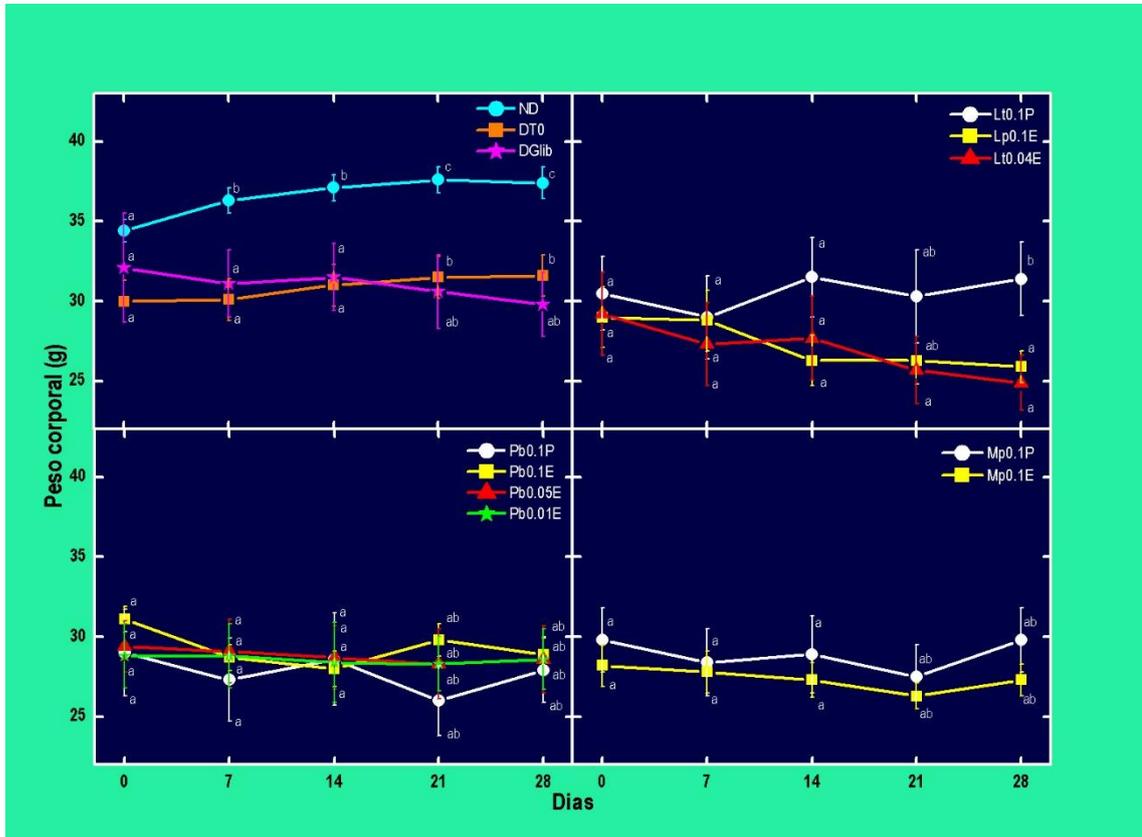


Figura 3. Promedio y desviación estándar de pesos de individuos sometidos a tratamiento durante el bioensayo. Las letras en minúscula indican los grupos de homogeneidad de la prueba posterior al ANOVA, test de Duncan. **A.** Peso de los grupos ND, DT0 y DGlib. **B.** Peso de los grupos tratados con *L. trabeculata* (Lt0,1P, Lt0,1E y Lt0,04E). **C.** *P. binghamiae* (Pb0,1P, Pb0,1E, Pb0,05E y Pb0,01E). **D.** *M. pyrifera* (Mp0,1P y Mp0,1E).

Igualmente, en el día 14, el grupo ND tuvo un peso corporal promedio de $37,1 \pm 3,1$ g y fue diferente estadísticamente a los DM inducidos, los cuales estaban entre 26,3 y 31,5 g. En el día 21, el grupo ND tenía un promedio de $37,6 \pm 3,2$ g, los DT0 tuvieron un promedio de $31,5 \pm 4,2$ g, mientras que el tratamiento Lt0,04E tuvo un peso de $25,7 \pm 5,2$ g. El resto de grupos tuvieron valores promedio entre 26,0 y 30,3 g. Finalmente, en el día 28 los ND tuvieron un peso promedio de $37,4 \pm 3,7$ g, los DT0 y Lt0,1P pertenecen al mismo grupo de homogeneidad con valores promedio de $31,6 \pm 4,1$ y $31,4 \pm 5,7$ g,

respectivamente. Por otro lado, los grupos Lt0,1E y Lt0,04E alcanzaron valores promedio de $25,9 \pm 2,9$ g y $24,9 \pm 4,1$ g, por lo que pertenecen ambos al mismo grupo de homogeneidad. El peso del resto de individuos en los tratamientos osciló entre 27,8 g y 29,8 g (fig. 3).

Al compararse el peso inicial (Día 0) y el peso final (día 28) en cada tratamiento se puede observar que el tratamiento con pélet de *L. trabeculata* incrementa el peso corporal hasta un 3% (+0,9 g) del peso inicial, con lo que se obtienen 31,4 g. Similarmente, se observó que los ratones sanos (ND) incrementan su peso cerca de 9% (+3 g), alcanzando 37,4 g. Al igual que los ratones diabéticos sin tratamiento (DT0), que incrementaron su peso más del 5% (+1,6 g), alcanzando 31,6 g, Caso contrario ocurre con los demás tratamientos, donde los extractos de *L. trabeculata* en las dosis de 1,6 y 4 g/Kg disminuyeron el peso de los ratones en 14,7 y 10,7% del peso inicial, respectivamente, alcanzando 24,9 y 25,9 g, y formando un grupo de homogeneidad diferente de los demás tratamientos.

7.2.2. Glucosa basal

Los resultados de la glucosa basal fueron medidos cada semana durante el periodo de ensayo *in vivo*; estos datos fueron expresados en promedio y se presentan en la fig. 4. Se observó que, al inicio de los tratamientos (día 0), los ratones que pertenecerían al grupo de los no diabéticos (ND) tuvieron un nivel de glucosa de 88 ± 2 mg/dL, y se mantuvieron entre valores normoglicémicos conforme pasaron los días de experimentación: en el día 7, fue 117 ± 3 mg/dL; en el día 14, fue 103 ± 2 mg/dL; en el día 21, fue 103 ± 21 mg/dL; y, al final de la experimentación, fue 100 ± 32 mg/dL. Todos los valores registrados fueron inferiores a 150 mg/dL de glucosa. Resultaron significativamente diferentes de los demás grupos que fueron inducidos a diabetes empleando STZ, durante todo el experimento. En el caso de los grupos de ratones diabéticos, los ratones del grupo DT0 tuvieron un nivel de glucosa inicial de 260 ± 108

mg/dL, mientras que los que serían tratados con GLI tuvieron una concentración de 225 ± 166 mg/dL. En ambos grupos, la glucosa se incrementó progresivamente. En los grupos que serían tratados con ingesta de pélet de macroalga, para *L. trabeculata* fue 229 ± 115 mg/dL, 321 ± 185 en *P. binghamiae* y 348 ± 153 en *M. pyrifera*. En los que iban a ser tratados con extracto de macroalga, para la mayor dosis de *L. trabeculata* fue 309 ± 113 mg/dL y en la menor dosis fue 291 ± 98 mg/dL. Para *M. pyrifera* fue 317 ± 49 mg/dL y para *P. binghamiae* en la mayor dosis fue 364 ± 61 mg/dL, en la dosis intermedia fue 287 ± 73 mg/dL y en la dosis más baja fue 270 ± 66 mg/dL. Al inicio del experimento no fueron observadas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inducido a diabetes con STZ ($p < 0,05$; 0,238).

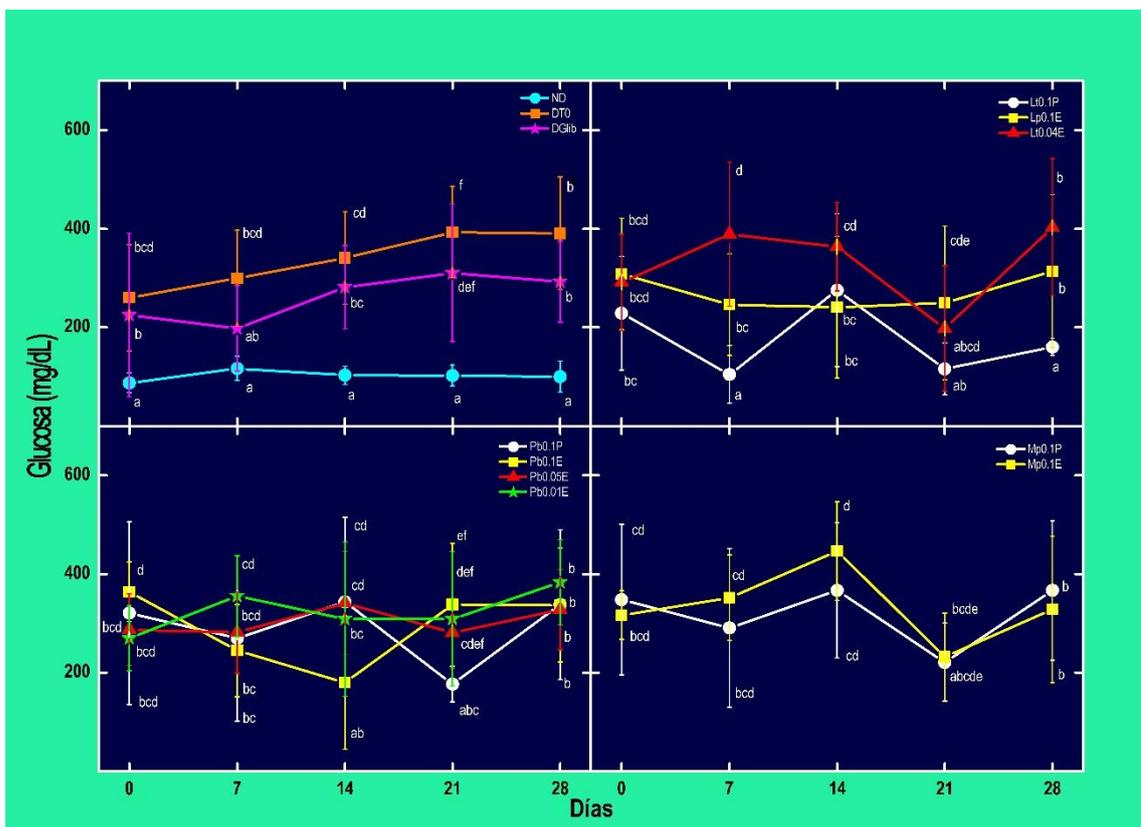


Figura 4. Gráficos de la glucosa basal (mg/dL) cada 7 días de tratamiento. Media \pm error estándar (a, b y c son grupos posteriores al análisis de ANOVA). **A.** Glucosa basal registrada en los controles No diabéticos (ND), Diabéticos sin tratamiento (DT0) y Glibenclamida (DGIIb) **B.** Glucosa basal registrada en los tratamientos con *L. trabeculata* (Lt0,1P, Lt0,1E y Lt0,04E). **C.** Glucosa basal registrada en los tratamientos con *P. binghamiae* (Pb0,1P, Pb0,1E, Pb0,05E y Pb0,01E). **D.** Glucosa basal registrada en los tratamientos con *M. pyrifera* (Mp0,1P y Mp0,1E).

En el día 7, se pudo observar que el grupo DT0 incrementó la glucosa basal, obteniendo 300 ± 98 mg/dL, el tratamiento con GLI disminuyó a 198 ± 87 mg/dL. En los tratados con ingesta de pélet de macroalga, todos los grupos disminuyeron la glucosa basal, para *L. trabeculata* fue 105 ± 58 mg/dL, estadísticamente similar a los ratones no diabéticos. Para *M. pyrifera* fue 291 ± 161 mg/dL y para *P. binghamiae* fue 269 ± 168 mg/dL. En los tratamientos con extractos de macroalga, en la mayor dosis se observó disminución de la glucosa basal en los tratamientos con *L. trabeculata* y *P. binghamiae*, con los resultados de 246 ± 103 y 245 ± 93 mg/dL, respectivamente. En *M. pyrifera*, se incrementó la glucosa basal a 352 ± 87 mg/dL. En los ratones tratados con dosis menores de extracto, se observó que la glucosa basal aumentó en todos los tratamientos, en *L. trabeculata* fue 389 ± 146 mg/dL, en *P. binghamiae*, con dosis intermedia fue 281 ± 82 mg/dL, y 355 ± 83 mg/dL en la dosis más baja (fig. 4).

En el día 14, se observó que, en comparación con los resultados del día 7, el grupo DT0 incrementó la glucosa basal y alcanzó 341 ± 94 mg/dL; el tratamiento con GLI aumentó a 281 ± 84 mg/dL. Los ratones tratados con ingesta de pélet de macroalga incrementaron la glucosa basal, para *L. trabeculata* fue 275 ± 155 mg/dL, para *M. pyrifera* resultó 367 ± 137 mg/dL y para *P. binghamiae* fue 343 ± 172 mg/dL. Los ratones que fueron tratados con extracto de macroalga tuvieron resultados variables: aquellos que recibieron mayor dosis de extracto disminuyeron su nivel de glucosa, en *L. trabeculata* fue 241 ± 144 mg/dL; igualmente, *P. binghamiae* bajó a 180 ± 135 mg/dL. Sin embargo, el efecto de disminución de glucosa no se vio en *M. pyrifera*, que aumentó a 446 ± 100 mg/dL, el mayor nivel de glucosa y significativamente diferente de los otros tratamientos. En los grupos tratados con menores dosis de extracto de macroalgas, en *L. trabeculata* disminuyó su glucosa basal a 364 ± 90 mg/dL, y los que fueron tratados con *P. binghamiae*, en la dosis intermedia aumentaron de glucosa a 341 ± 105 mg/dL y la dosis baja disminuyó a 308 ± 156 mg/dL (fig. 4).

En el día 21, en comparación con los resultados del día 14, el grupo de DT0 incrementó su glucosa a 393 ± 92 mg/dL, el mayor nivel de glucosa y significativamente diferente de los demás tratamientos. Los tratados con GLI aumentaron de glucosa a 310 ± 139 mg/dL. En los que fueron tratados con ingesta de pélet de macroalga disminuyeron su glucosa basal, para *L. trabeculata* fue 116 ± 52 mg/dL, para *M. pyrifera* fue 221 ± 80 mg/dL y para *P. binghamiae* fue 177 ± 36 mg/dL. Los tratamientos con extractos de macroalga, en la mayor dosis se observaron comportamientos diferentes, para *L. trabeculata* y *P. binghamiae* aumentaron de glucosa basal a 250 ± 156 y 338 ± 124 mg/dL, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento que disminuyó de nivel fue *M. pyrifera*, que alcanzó 232 ± 89 mg/dL. En los tratamientos con menores dosis de extractos disminuyó la glucosa, los tratados con *L. trabeculata* a 198 ± 127 mg/dL y los tratados con *P. binghamiae* disminuyeron a 281 ± 73 mg/dL; los de dosis más baja aumentaron de glucosa, alcanzaron 309 ± 136 mg/dL (fig. 4).

En el día 28, al comparar con los resultados del día 21 se observó que el grupo DT0 no varió de glucosa basal, la cual resultó ser de 391 ± 114 mg/dL. Los ratones del tratamiento DGli disminuyeron a 293 ± 82 mg/dL. Los grupos tratados con ingesta de pélet de macroalga no consiguieron regular la glucosa e incrementaron de nivel, en *M. pyrifera* y *P. binghamiae* se obtuvo 367 ± 141 mg/dL y 338 ± 152 mg/dL, respectivamente. Sin embargo, los ratones tratados con *L. trabeculata* obtuvieron un valor de 161 ± 17 mg/dL, no hallándose diferencias significativas con los ratones no diabéticos. En los tratamientos con extractos, para la mayor dosis se observaron comportamientos diferentes, *L. trabeculata* y *M. pyrifera* aumentaron de nivel de glucosa basal a 314 ± 155 y 328 ± 148 mg/dL, respectivamente. Los ratones que fueron tratados con *P. binghamiae* disminuyeron a 337 ± 115 mg/dL. Por otro lado, en los tratamientos con dosis menores se observó que no consiguieron regular el nivel de glucosa basal, obteniendo 403 ± 139 mg/dL en *L. trabeculata*; y, en las dosis intermedia y más baja de *P. binghamiae*, se obtuvo 327 ± 81 y 383 ± 87 mg/dL, respectivamente (fig. 4).

Tabla 3. Registro de la glucosa basal (mg/dL) en el día 28 de experimentación de cada grupo de tratamiento, organizado por especie de macroalga. Media \pm desviación estándar. (a, b y c: grupos posteriores al ANOVA)

	Dosis (mg)	<i>Lessonia trabeculata</i> (Lt)	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Mp)	<i>Petalonia binghamiae</i> (Pb)	DGLi	DT0	ND
Día 28: Glucosa basal (mg/dL)	100*	161 \pm 17 ^a	367 \pm 141 ^b	338 \pm 152 ^b			
	100	314 \pm 155 ^b	328 \pm 148 ^b	337 \pm 115 ^b			
	50			327 \pm 81 ^b			
	40	403 \pm 139 ^b					
	10			383 \pm 87 ^b			
	0,1				293 \pm 82 ^b		
	0					391 \pm 114 ^b	100 \pm 32 ^a
Media \pm DE		296 \pm 153 ^b	346 \pm 141 ^{bc}	344 \pm 107 ^{bc}	293 \pm 82 ^b	391 \pm 114 ^c	100 \pm 32 ^a

*Tratamientos donde se administró pélet de macroalga.

Al realizarse el análisis estadístico del efecto de las macroalgas *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* sobre los niveles de glucosa basal de los ratones al finalizar el experimento, se pudo observar que los tratados con *L. trabeculata* obtuvieron el menor valor de glucosa basal en comparación con otros grupos tratados con macroalgas, fue similar al tratamiento con GLI y resultó significativamente diferente que el grupo DT0. Sin embargo, fue superior al grupo ND (tabla 3).

En general, la cantidad de glucosa basal en los tratamientos con ratones diabéticos, el grupo DT0 incrementó progresivamente el nivel de glucosa basal en el transcurso del experimento. En los demás tratamientos, el nivel de glucosa basal osciló cada semana, pero la mayoría tuvo tendencia a aumentar al final del tratamiento, sin lograr regular en su totalidad los niveles de glucosa. En el tratamiento DGLi, la glucosa aumentó progresivamente, pero se mantuvo por debajo de los niveles alcanzados por los ratones sin tratamiento. En los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga se observó una oscilación de los niveles de glucosa cada semana de tratamiento; al comparar los valores de glucosa basal inicial y final durante la experimentación, *L. trabeculata* fue el tratamiento que consiguió regular eficientemente la glucosa basal. En *M. pyrifera* no se registró un aumento del valor de glucosa, es decir, detuvo el daño progresivo de la STZ. Y en *P. binghamiae* se observó un ligero aumento del nivel de glucosa basal, de donde

se infiere que detuvo parcialmente el daño de la STZ. En los tratamientos con extractos de macroalgas se tendió a oscilar cada semana. En su mayoría aumentaron los niveles de glucosa basal, para la mayor dosis de *L. trabeculata*, aumentó ligeramente, deteniendo parcialmente el daño de la STZ. Sin embargo, en la menor dosis no se consiguió detener el daño de la STZ y se incrementó el nivel glicémico. El tratamiento con *M. pyrifera* no varió drásticamente el nivel de glucosa, deteniendo parcialmente el detrimento de la STZ. En los tratamientos con *P. binghamiae*, el de mayor dosis disminuyó levemente la glucosa basal. Por el contrario, en las dosis más bajas, la glucosa basal aumentó y no se observó un efecto hipoglicemiante.

7.2.3. Tolerancia a la glucosa

La prueba de la tolerancia a la glucosa fue realizada en el día 28 del ensayo *in vivo* y se determinaron los niveles de glucosa en sangre durante 2 h cada 30 min (0, 30, 60, 90 y 120 min), los valores fueron expresados en promedio y se presentan en la fig. 5. Se observó en el grupo de ratones no diabéticos (ND) que, al inicio de la prueba, la glucosa tuvo un valor de 100 ± 32 mg/dL, este valor se incrementó luego de la administración vía oral de una solución de glucosa en una dosis de 2 g/Kg, obteniendo un valor máximo en el min 30 se registró 216 ± 46 mg/dL, valor que disminuyó a medida que transcurrió el tiempo, registrándose 163 ± 23 mg/dL (min 60), 127 ± 16 mg/dL (min 90) y 104 ± 16 mg/dL al final de la prueba (min 120). Todos estos valores de glucosa fueron inferiores que los demás grupos experimentales (se hallaron diferencias significativas) y se dedujo que los ratones consiguieron regular los niveles de glucosa en sangre. En los ratones que fueron inducidos a diabetes, el grupo DT0 tuvo como glucosa basal (min 0) 412 ± 99 mg/dL, los ratones del tratamiento DGI tuvieron 293 ± 82 mg/dL de glucosa. En ambos grupos, el nivel de glucosa se incrementó progresivamente. En los grupos que fueron tratados con pélet de macroalga se tuvo como glucosa basal inicial 161 ± 17 mg/dL con *L. trabeculata*, 367 ± 141 mg/dL en el grupo que se trató con *M. pyrifera* y 338 ± 152 mg/dL en los tratados con *P. binghamiae*. Los ratones que fueron tratados

con extracto de macroalga, para la mayor dosis de *L. trabeculata* fue 324 ± 162 mg/dL y en la dosis menor fue 403 ± 139 mg/dL. Para *M. pyrifera* el nivel de glucosa inicial fue 359 ± 128 mg/dL. Para *P. binghamiae*, los valores de glucosa inicial fueron los siguientes: en la dosis más alta, fue 337 ± 115 mg/dL; en la dosis intermedia, 327 ± 81 mg/dL; y, en la dosis más baja, 383 ± 87 . Al inicio de la prueba de tolerancia (min 0) no fueron observadas diferencias significativas entre los grupos inducidos a diabetes con STZ, a excepción de los que fueron tratados con pélet de *L. trabeculata*, que resultaron similares al grupo de ratones no diabéticos (ND).

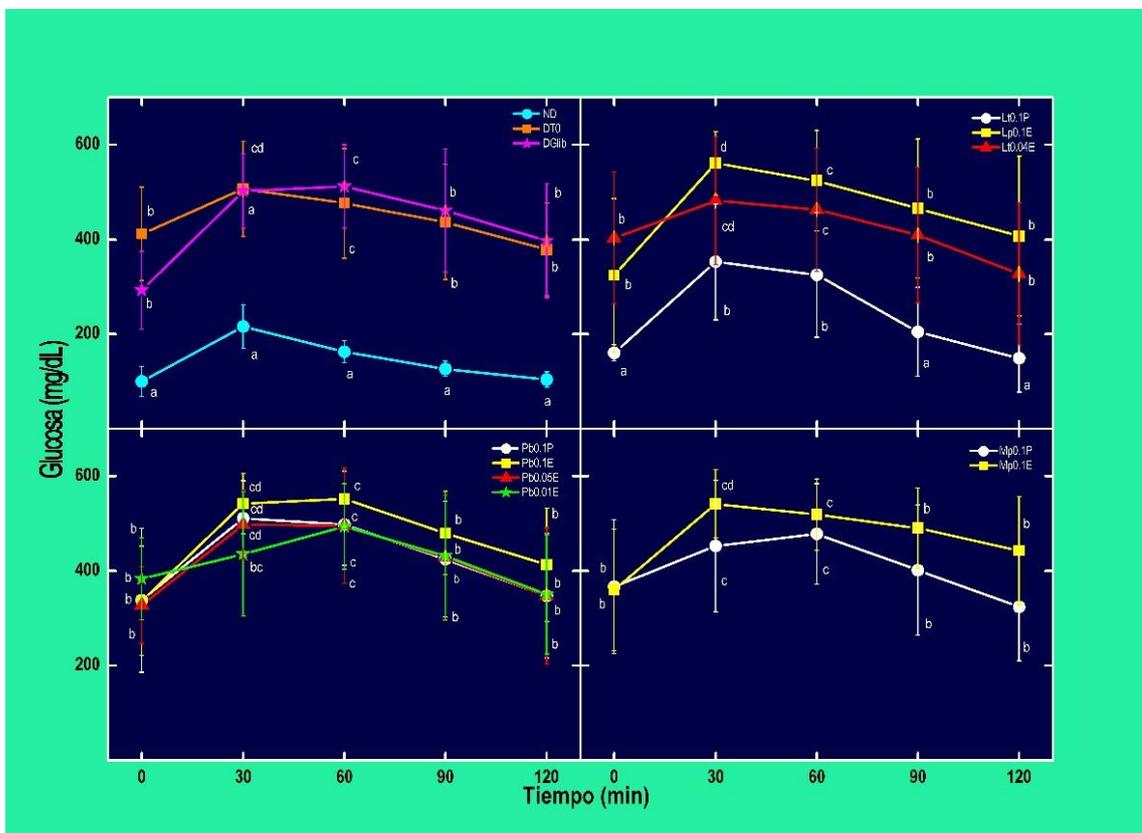


Figura 5. Gráficos de la curva de tolerancia a la glucosa en el día 28 de tratamiento. Los valores mostrados son el promedio de la glicemia en sangre (mg/dL) durante la prueba de 2 h cada 30 min Media \pm error estándar (a, b y c son grupos posteriores al análisis de ANOVA). **A.** Curvas de tolerancia a la glucosa de los controles: ND, DT0 y DGli. **B.** Curvas de tolerancia a la glucosa de los tratamientos con *L. trabeculata* (Lt0,1P, Lt0,1E y Lt0,04E). **C.** Curvas de tolerancia a la glucosa de los tratamientos con *P. binghamiae* (Pb0,1P, Pb0,1E, Pb0,05E y Pb0,01E). **D.** Curvas de tolerancia a la glucosa de los tratamientos con *M. pyrifera* (Mp0,1P y Mp0,1E).

En el min 30 de la prueba de tolerancia a la glucosa, se pudo observar que los grupos inducidos a diabetes con STZ tendieron a aumentar drásticamente de glucosa. El grupo DT0 aumentó su nivel de glucosa a 507 ± 100 mg/dL, valor máximo de la curva de

tolerancia a la glucosa. Los ratones del tratamiento DGli aumentaron su valor de glucosa a 502 ± 78 mg/dL. En los tratados con pélet de macroalga, en todos los tratamientos aumentó la glucosa, con *L. trabeculata* a 353 ± 123 mg/dL, alcanzando el valor máximo de la curva de tolerancia y resultando inferior y significativamente diferente que los otros tratamientos con ratones diabéticos. En *M. pyrifera* se incrementó ligeramente a 452 ± 139 mg/dL, y en *P. binghamiae* aumentó a 511 ± 79 mg/dL, alcanzando el valor máximo de la curva de tolerancia.

Del mismo modo, en los tratados con extractos de macroalga se observó el incremento de los niveles de glucosa; en la mayor dosis de *L. trabeculata*, la glucosa aumentó drásticamente a 561 ± 67 mg/dL, resultando un valor significativamente mayor a los demás grupos experimentales y se deduce que no se pudieron regular los niveles de glucosa posprandial. Para *M. pyrifera* se incrementó a 541 ± 72 mg/dL, alcanzando el pico máximo de tolerancia. Para la mayor dosis de *P. binghamiae* se obtuvo 542 ± 64 mg/dL. En los tratados con menor dosis de extracto aumentó el nivel de glucosa, en *L. trabeculata* aumentó ligeramente a 482 ± 135 mg/dL, en la dosis intermedia de *P. binghamiae* subió a 497 ± 74 mg/dL y en la dosis más baja aumentó a 435 ± 131 mg/dL (fig. 5).

En el min 60 de la prueba de tolerancia a la glucosa se observó que, en comparación con los resultados del min 30, el grupo DT0 registró un descenso en el valor de glucosa a 476 ± 115 mg/dL. Los ratones tratados con DGli aumentaron su nivel de glucosa a 512 ± 88 mg/dL, alcanzando el máximo valor de la curva de la tolerancia. En los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga se mostraron resultados variables, los que disminuyeron su nivel de glucosa fueron los tratados con *L. trabeculata*, obteniendo 325 ± 131 mg/dL, significativamente inferior a los demás grupos experimentales con ratones diabéticos. Así mismo, para *P. binghamiae* se observó una disminución de los niveles de glucosa a 497 ± 86 mg/dL, en el caso de los tratados con *M. pyrifera* aumentó su nivel de glucosa a 478 ± 106 mg/dL, registrando su máximo valor de la curva de

tolerancia. En los tratamientos con extracto de macroalga tuvieron resultados variables; en los grupos tratados con mayor dosis de extracto de macroalga, algunos disminuyeron de glucosa, como los tratados con *L. trabeculata* y *M. pyrifera*, que obtuvieron 524 ± 106 y 519 ± 75 mg/dL, respectivamente. Sin embargo, en *P. binghamiae* aumentó a 551 ± 59 mg/dL, siendo el valor máximo de la curva de tolerancia. En los tratamientos con dosis menores de extracto de macroalga, con *L. trabeculata* disminuyó su nivel de glucosa a 463 ± 130 mg/dL, y en *P. binghamiae*, en la dosis intermedia, el nivel de glucosa disminuyó a 495 ± 122 mg/dL y en la dosis más baja aumentó a 494 ± 91 mg/dL, alcanzando el máximo valor de glucosa de la curva de tolerancia. Al realizarse el análisis estadístico de comparación múltiple de Duncan entre todos los grupos experimentales, se determinó que quien obtuvo menor valor de glucosa entre los diabéticos en el min 60 fue el tratamiento con ingesta de pélet de *L. trabeculata*, diferenciándose de los demás tratamientos que formaron otro grupo estadístico (fig. 5).

En el min 90, en comparación con los resultados del min 60, el grupo de DT0 disminuyó el nivel de glucosa a 437 ± 121 mg/dL. El tratamiento DGLi aumentó su nivel de glucosa a 461 ± 130 mg/dL. En los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga se disminuyó el valor de glucosa basal, para *L. trabeculata* se obtuvo 205 ± 94 mg/dL, similar al grupo de ratones no diabéticos (ND). Por otro lado, en *M. pyrifera* disminuyó ligeramente a 401 ± 137 mg/dL. Igualmente, *P. binghamiae* disminuyó a 490 ± 85 mg/dL. En los tratamientos con extracto de macroalga, en la mayor dosis se observó disminución de la glucosa, para *L. trabeculata* fue 465 ± 147 mg/dL, para *M. pyrifera* fue 490 ± 85 mg/dL y para *P. binghamiae* fue 480 ± 88 mg/dL. En los tratamientos con menores dosis de extracto también se registró la reducción del nivel de glucosa: en *L. trabeculata* se obtuvo 409 ± 142 mg/dL. En la dosis intermedia y más baja de *P. binghamiae* se observó descenso de la glucosa a 427 ± 133 mg/dL y 432 ± 135 mg/dL, respectivamente. Al realizarse el análisis estadístico de comparación múltiple de Duncan entre todos los grupos experimentales, se determinó que quien obtuvo menor nivel de glucosa entre los

diabéticos en el min 90 fue el tratamiento con ingesta de pélet de *L. trabeculata*, el cual resultó similar al grupo de ratones sanos (ND) y con diferencias significativas de los demás tratamientos que formaron otro grupo estadístico (fig. 5).

En el minuto final de la prueba de tolerancia a la glucosa (min 120), en comparación a los resultados del min 90, se encontró que todos los grupos experimentales disminuyeron de nivel de glucosa. En los ratones inducidos a diabetes, el grupo de DT0 obtuvo 397 ± 120 mg/dL, los ratones del tratamiento DGLi obtuvieron 221 ± 139 mg/dL. En los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga disminuyeron su valor de glucosa, los tratados con *L. trabeculata* obtuvieron 149 ± 72 mg/dL, similar y no hallándose diferencias significativas con el grupo de ratones no diabéticos (ND). Por otro lado, para *M. pyrifera* y *P. binghamiae* disminuyeron a 323 ± 113 mg/dL y 347 ± 132 mg/dL, respectivamente. En los tratamientos con extractos de macroalga, para la mayor dosis se observó descenso de los niveles de glucosa; con *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* disminuyeron a 407 ± 169 , 443 ± 114 y 412 ± 120 mg/dL, respectivamente. En los tratamientos con menores dosis de extractos también se evidenció disminución de los niveles de glucosa: para *L. trabeculata* fue 328 ± 150 mg/dL y para *P. binghamiae* en las dosis intermedia y más baja se redujo a 347 ± 144 y 350 ± 126 mg/dL, respectivamente. Al realizarse el análisis estadístico de comparación múltiple de Duncan entre todos los grupos experimentales, se determinó que quien obtuvo menor nivel de glucosa entre los ratones diabéticos en el min 120 fueron los tratados con ingesta de pélet de *L. trabeculata*, que resultó similar al grupo de ratones no diabéticos (ND) y se diferenció de los demás tratamientos que formaron otro grupo estadístico (fig. 5).

Se realizó el análisis estadístico de los niveles de glucosa en sangre en el minuto final de la prueba de tolerancia a la glucosa empleando la prueba posterior al ANOVA, el test de Duncan, donde se compararon los tratamientos con ingesta de pélet de *L. trabeculata* (Lt0,1P), *M. pyrifera* (Mp0,1P) y *P. binghamiae* (Pb0,1P), con los controles, no diabéticos (ND), diabéticos sin tratamiento (DT0) y los diabéticos tratados con GLI (DGLi). Se

observó que el tratamiento de *L. trabeculata* tuvo un comportamiento similar al de los No diabéticos, no hallándose diferencias significativas entre estos dos grupos experimentales ($p < 0,05$; $\alpha = 0,33$) (tabla 4).

Tabla 4. Prueba posterior al ANOVA, test de Duncan de las glicemias en sangre (mg/dL) en el min 120 de la prueba de tolerancia a la glucosa. Los tratamientos analizados fueron ingesta de pélet de macroalga: Lt0,1P, Mp0,1P y Pb0,1P y los controles: ND, DT0 y DGli. Media \pm desviación estándar (a, b y c: Grupos posteriores al ANOVA)

Test de Duncan ^{a,b}			
Tratamiento	Nº	Subconjunto para $\alpha=0,05$	
		1	2
No diabéticos (ND)	15	104 \pm 16 ^a	
<i>L. trabeculata</i> (Lt0,1P)	6	149 \pm 72 ^a	
<i>M. pyrifera</i> (Mp0,1P)	7		323 \pm 113 ^b
<i>P. binghamiae</i> (Pb0,1P)	6		347 \pm 132 ^b
Diabéticos sin tratamiento (DT0)	9		379 \pm 98 ^b
Gibenclamida (DGlib)	7		397 \pm 121 ^b
Sig.		0,33	0,15

7.2.4. Tolerancia al almidón

La prueba de tolerancia al almidón (mg/dL), fue realizada en el día 21 del ensayo *in vivo* y se registró la glicemia en sangre durante 2 h cada 30 min (0, 30, 60, 90 y 120 min), estos datos fueron expresados en promedio y se presentan en la fig. 6.

Se observó que, al inicio de la prueba de tolerancia al almidón (min 0), la glucosa basal del grupo ND fue 95 ± 13 mg/dL, este valor se incrementó luego de la administración del almidón por vía oral en una dosis de 2 g/Kg, alcanzando el valor máximo de la curva de tolerancia con 159 ± 31 mg/dL, y disminuyó a medida que transcurría el tiempo, registrándose 125 ± 46 mg/dL (min 60), 116 ± 29 mg/dL (min 90) y 97 ± 30 mg/dL (min 120), hasta el final de la prueba. Todos estos valores de glucosa fueron significativamente inferiores que en los demás grupos experimentales, conformados por ratones diabéticos. En los grupos experimentales inducidos a diabetes, el grupo DT0 tuvo como glucosa inicial de 372 ± 122 mg/dL. Los ratones que fueron tratados con GLI iniciaron con una glucosa de 298 ± 143 mg/dL. En los grupos que fueron tratados con pélet de macroalga, en *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* iniciaron con valores

de glucosa de 118 ± 43 mg/dL, 203 ± 34 y 175 ± 53 mg/dL, respectivamente. Los que fueron tratados con extracto de macroalga en la mayor dosis de *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae*, iniciaron la prueba de tolerancia con valores de glucosa de 292 ± 153 , 232 ± 89 y 332 ± 145 mg/dL, respectivamente. En las menores dosis de extracto, los tratados con *L. trabeculata* iniciaron la prueba con un nivel de glucosa de 230 ± 134 mg/dL. Para las dosis intermedia y más baja de extracto de *P. binghamiae* iniciaron la prueba con 260 ± 92 y 309 ± 136 mg/dL, respectivamente. Al inicio de la prueba de tolerancia (min 0) fueron observadas diferencias significativas entre los grupos inducidos a diabetes con STZ ($\alpha = 0.05$; 0.023), donde el grupo Lt0,1P fue diferente de los demás grupos experimentales con ratones diabéticos, resultando ser estadísticamente similar al grupo de ratones sanos, ND.

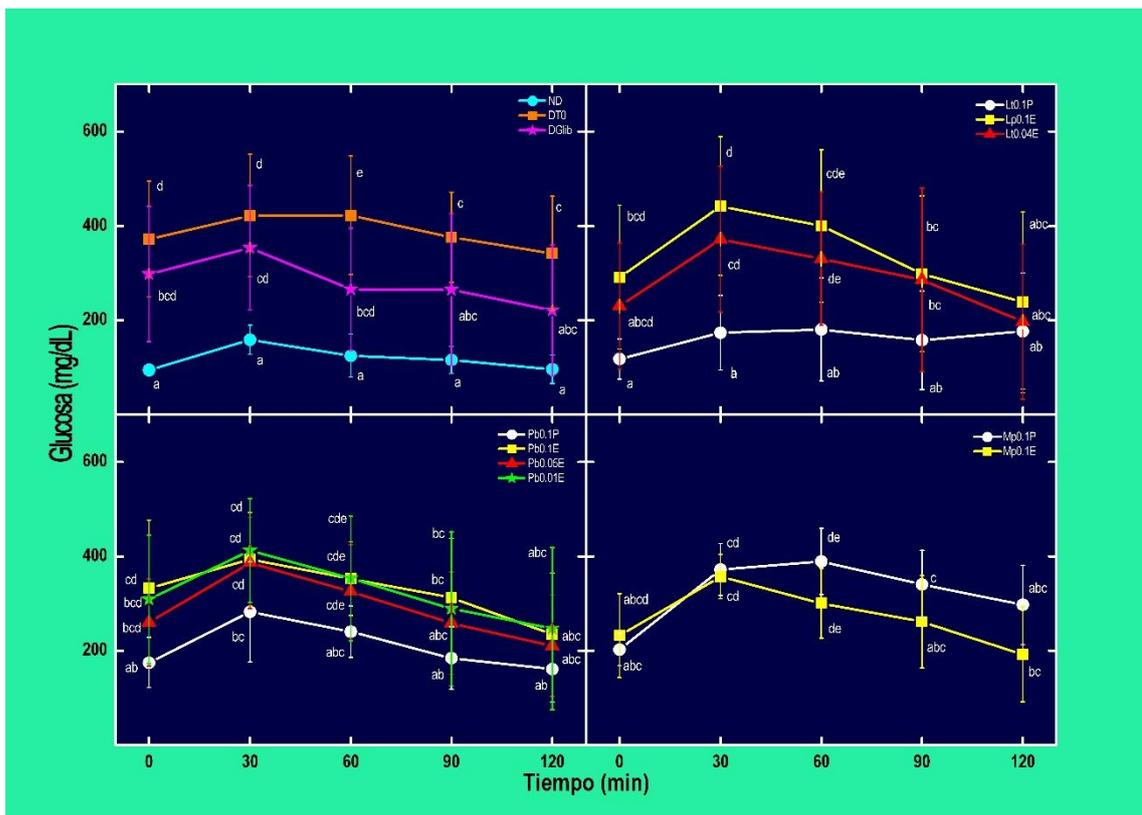


Figura 6. Gráficos de la curva de tolerancia al almidón en el día 21 de experimentación. Los valores mostrados son el promedio de la glicemia en sangre (mg/dL) durante la prueba de 2 h cada 30 min Media \pm error estándar (a, b y c son grupos posteriores al análisis de ANOVA). **A.** Curvas de tolerancia al almidón de los controles: ND, DT0 y DGli. **B.** Curvas de tolerancia al almidón de los tratamientos con *L. trabeculata* (Lt0,1P, Lt0,1E y Lt0,04E). **C.** Curvas de tolerancia al almidón de los tratamientos con *P. binghamiae* (Pb0,1P, Pb0,1E, Pb0,05E y Pb0,01E). **D.** Curvas de tolerancia al almidón de los tratamientos con *M. pyrifera* (Mp0,1P y Mp0,1E).

En el min 30 de la prueba de tolerancia al almidón se pudo observar, en comparación con el min 0, que los grupos inducidos a diabetes con STZ incrementaron drásticamente su nivel de glucosa. El grupo DT0 aumentó a 422 ± 129 mg/dL y resultó significativamente superior a los demás tratamientos; los tratados con GLI aumentaron su valor de glucosa a 354 ± 132 mg/dL, alcanzando el valor máximo de la curva de tolerancia. En los ratones que fueron tratados con ingesta de pélet de macroalga, todos los grupos incrementaron el nivel de glucosa, con *L. trabeculata* se alcanzó 174 ± 79 mg/dL, con *M. pyrifera* y *P. binghamiae* aumentaron a 372 ± 55 y 282 ± 106 mg/dL, respectivamente, siendo el máximo valor de la curva de tolerancia. Del mismo modo, en los tratados con extractos de macroalgas en la mayor dosis, los niveles de glucosa incrementaron: para *L. trabeculata* se obtuvo 442 ± 147 mg/dL, resultando significativamente superior a los demás grupos experimentales y no se hallaron diferencias significativas con el grupo DT0, infiriéndose que no se consiguió regular los niveles de glucosa. En *M. pyrifera* aumentó a 357 ± 47 mg/dL y los tratados con *P. binghamiae* incrementaron a 394 ± 99 mg/dL. En los tratamientos con dosis menores de extracto de macroalga, para *L. trabeculata* incrementó a 372 ± 154 mg/dL, los tratados con *P. binghamiae*, en la dosis intermedia y más baja, tuvieron un valor de glucosa de 386 ± 97 y 412 ± 110 mg/dL, respectivamente (fig. 6).

En el min 60 de la prueba de tolerancia al almidón se observó que, en comparación con los resultados del min 30, el grupo DT0 aumentó su valor de glucosa a 422 ± 125 mg/dL. A diferencia de los demás grupos experimentales, los ratones que fueron tratados con GLI disminuyeron de nivel de glucosa, obteniendo 265 ± 130 mg/dL. Los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga tuvieron resultados variables: los ratones a los que se les administró *L. trabeculata* disminuyeron la glucosa a 181 ± 109 mg/dL. Igualmente, disminuyó la glucosa de los ratones a los que se les administró *P. binghamiae*, resultando 240 ± 54 mg/dL. El tratamiento con *M. pyrifera* no consiguió regular los niveles de glucosa, por lo que los valores aumentaron a 389 ± 70 mg/dL y alcanzó el

máximo valor de la curva de tolerancia. Los grupos que fueron tratados con extracto de macroalga tuvieron resultados variables: los grupos tratados con mayor dosis de extracto de macroalga disminuyeron de glucosa, en los tratamientos con *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* obtuvieron 400 ± 161 , 300 ± 74 y 353 ± 78 mg/dL, respectivamente. En los grupos tratados con menores dosis de extracto de macroalgas, el tratado con *L. trabeculata* disminuyó su nivel de glucosa a 331 ± 141 mg/dL, y los que fueron tratados con *P. binghamiae* en las dosis intermedia y más baja disminuyeron a 325 ± 100 y 353 ± 132 mg/dL, respectivamente. Al realizarse el análisis estadístico de comparación múltiple de Duncan entre todos los grupos experimentales de ratones diabéticos, se determinó que quien obtuvo menor nivel de glucosa entre los diabéticos en el min 60 fue el tratamiento Lt0,1P, hallándose diferencias significativas con los demás tratamientos, Por otro lado, el grupo DT0 resultó significativamente el de mayor valor de glucosa entre los ratones diabéticos (fig. 6).

En el min 90, en comparación con los resultados del min 60, se obtuvo que el grupo de DT0 disminuyó la glucosa a 265 ± 161 mg/dL. Los ratones que fueron tratados con GLI mantuvieron su nivel de glucosa al obtener 265 ± 161 mg/dL. En los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga, los que fueron tratados con *L. trabeculata*, y *P. binghamiae* disminuyeron a 158 ± 104 y 184 ± 66 mg/dL, respectivamente. Para *M. pyrifera* se redujo a 340 ± 72 mg/dL y resultó similar al grupo DT0. En los tratamientos con extractos de macroalga, en la mayor dosis se observó disminución de la glucosa para *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae*, que obtuvieron 299 ± 165 , 261 ± 98 y 312 ± 126 mg/dL, respectivamente. En los tratamientos con dosis menores de extractos disminuyeron la glucosa; los tratados con *L. trabeculata* obtuvieron 286 ± 194 mg/dL, y con *P. binghamiae* en las dosis intermedia y más baja obtuvieron 258 ± 109 y 289 ± 163 mg/dL, respectivamente. Al realizarse el análisis estadístico de comparación múltiple de Duncan entre todos los grupos experimentales, se determinó que existen diferencias

significativas entre los niveles de glucosa registrados en el min 90 $p < 0,05$; 0,197 (fig. 6).

En el minuto final de la prueba de tolerancia al almidón (min 120), se obtuvo como resultado, en comparación con los resultados del min 90, que todos los grupos experimentales disminuyeron la glucosa. En el grupo de DT0, la glucosa fue 342 ± 121 mg/dL, estadísticamente superior a los demás tratamientos. En los ratones tratados con GLI se obtuvo 221 ± 139 mg/dL. En los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga disminuyeron el nivel de glucosa, donde *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* obtuvieron 177 ± 123 , 297 ± 84 y 161 ± 70 mg/dL, respectivamente. En los tratamientos con extractos de macroalgas, en la mayor dosis se observó aumento de los niveles de glucosa en *L. trabeculata* a 238 ± 192 mg/dL, en *M. pyrifera* y *P. binghamiae* disminuyeron a 192 ± 100 y 234 ± 130 mg/dL, respectivamente. En los tratamientos con menores dosis de extractos también se observó la disminución de glucosa, en *L. trabeculata* se obtuvo 197 ± 164 mg/dL y en los tratamientos con *P. binghamiae*, en la dosis intermedia y la dosis más baja obtuvieron 210 ± 107 y 247 ± 171 mg/dL, respectivamente.

Tabla 5. Prueba posterior al ANOVA, test de Duncan de la glicemia en sangre (mg/dL) en el min 120 de la prueba de la tolerancia al almidón de los tratamientos con 0,1 g de macroalga pulverizada: Lt0,1P, Mp0,1P y Pb0,1P y los controles: ND, DT0 y DGLi. Media \pm desviación estándar (a, b y c: grupos posteriores al ANOVA)

Tratamiento	Nº	Test de Duncan ^{a,b}	
		Subconjunto para $\alpha=0,05$	
		1	2
No diabéticos (ND)	15	96 \pm 30 ^a	
<i>P. binghamiae</i> (Pb0,1P)	5	161 \pm 70 ^b	
<i>L. trabeculata</i> (Lt0,1P)	4	177 \pm 123 ^a	
<i>M. pyrifera</i> (Mp0,1P)	5		297 \pm 84 ^b
Diabéticos sin tratamiento (DT0)	9		342 \pm 121 ^b
Sig.		0,127	0,361

Por otro lado, al realizarse el análisis de la prueba posterior al ANOVA, el test de Duncan, de las glicemias en sangre en el minuto final de los tratamientos con ingesta de pélet de las macroalgas *L. trabeculata* (Lt0,1P), *M. pyrifera* (Mp0,1P), *P. binghamiae* (Pb0,1P), siendo comparados con los controles no diabéticos (ND) y diabéticos sin

tratamiento (DT0), se observó que los tratamientos con *L. trabeculata* y *P. binghamiae* tuvieron comportamiento similar a los no diabéticos (tabla 5).

Además, al ser analizado estadísticamente el efecto de las macroalgas *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* en la glicemia de los ratones al finalizar la prueba de tolerancia al almidón (min 120), se puede observar que los tratados con macroalgas conformaron un subgrupo en el análisis posterior al ANOVA, el test de Duncan, siendo similar al tratamiento con GLI, y fueron inferiores que el grupo DT0, diabéticos sin tratamiento, infiriendo su efecto tipo GLI (tabla 6).

Tabla 6. Registro de la glicemia en sangre (mg/dL) en el min 120 de la prueba de la tolerancia al almidón de cada grupo de tratamiento, organizado por especie de macroalga. Media \pm desviación estándar (a, b y c: grupos posteriores al ANOVA)

Nivel de Glucosa final en la prueba de tolerancia al almidón (min120)	Dosis (mg)	<i>Lessonia trabeculata</i> (Lt)	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Mp)	<i>Petalonia binghamiae</i> (Pb)	DGlib	DT0	ND
	100*	177 \pm 123 ^{ab}	297 \pm 84 ^{bc}	139 \pm 83 ^{ab}			
	100	238 \pm 191 ^{abc}	192 \pm 100 ^{bc}	234 \pm 130 ^{abc}			
	50			210 \pm 107 ^{abc}			
	40	197 \pm 164 ^{abc}					
	10			247 \pm 171 ^{abc}			
	0,1				221 \pm 139 ^{abc}		
	0					342 \pm 121 ^c	96 \pm 30 ^a
	Media \pm DE	212 \pm 159 ^b	230 \pm 105 ^b	218 \pm 123 ^b	221 \pm 139 ^b	342 \pm 121 ^c	96 \pm 30 ^a
	Sig		0,738			1,00	1,00

*Tratamientos donde se administró alga pulverizada.

7.3. Caracterización histopatológica

7.3.1. Tejido pancreático

En los tejidos pancreáticos de los ratones no diabéticos (ND), se observó que las células de los acinos pancreáticos tienen forma triangular, con uno a dos núcleos redondeados de posición basal. El citoplasma es basófilo, con numerosos gránulos de zimógeno y eosinófilos, a lo cual se denomina estructura conservada del páncreas exocrino (fig. 7A). Del mismo modo, en los ratones con diabetes inducida y en aquellos sometidos a tratamiento, los tejidos del páncreas exocrino se mantuvieron conservados (fig.7B, C, D, E y F).

En la porción del páncreas endocrino, en los ratones del grupo ND se observan abundantes islotes pancreáticos dispersos con una morfología redondeada a más o menos alargada y de diversos tamaños. Los más grandes se ubicaron cercanos al sistema circulatorio. Las células son poligonales de tinción pálida con un núcleo central y se encuentran rodeadas por numerosos capilares sanguíneos. A esta descripción se la denomina islotes pancreáticos conservados (fig. 7A).

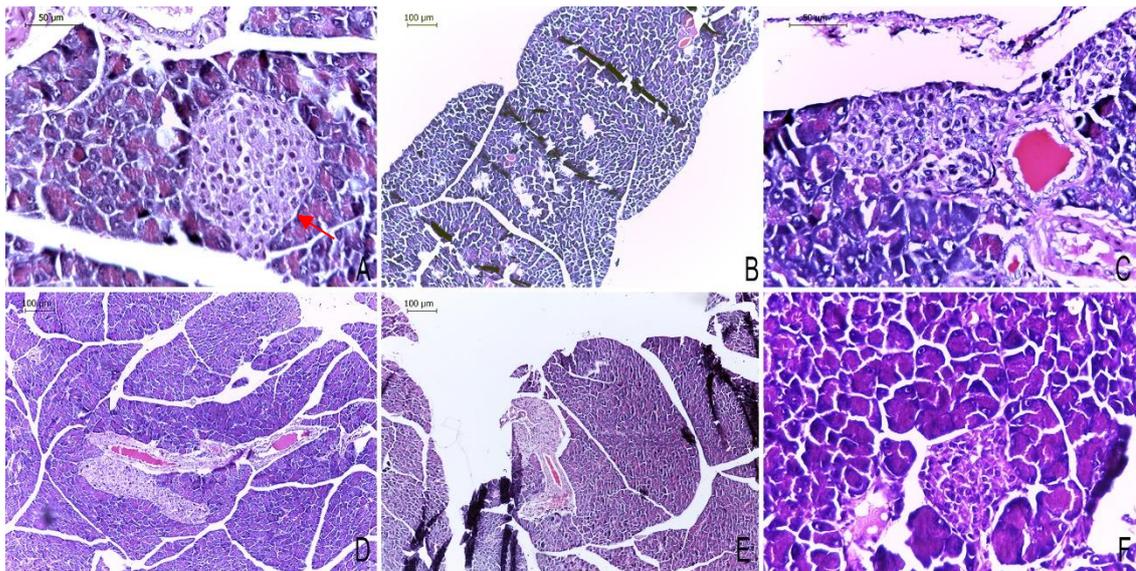


Figura 7. Tejido pancreático de los ratones ensayados. **A.** No diabéticos, **B.** Diabéticos sin tratamiento, **C.** Diabéticos tratados con GLI, **D.** Diabéticos tratados con *L. trabeculata*, **E.** Diabéticos tratados con *M. pyrifer* y **F.** Diabéticos tratados con *P. binghamiae*. Tinción H&E. 10X. La flecha señala el islote pancreático.

En el páncreas endocrino de ratones diabéticos sin tratamiento (DT0) se observó un menor número de islotes pancreáticos notoriamente alterados, de contornos estrellados y de menor tamaño (fig. 7B; tabla 7).

Tabla 7. Análisis comparativo de las alteraciones del tejido pancreático entre los grupos de experimentación

ESTRUCTURAS	ALTERACIONES	ND	DT0	DGLi	Lt0,1P	Mp0,1P	Pb0,1P	
Páncreas endocrino	Muerte celular	Apoptosis (citoplasma hipereosinófilo, picnosis)	0	***	**	**	*	*
		Lisis tisular	0	***	**	0	0	0
	Necrosis	Inflamación (infiltración celular)	0	***	**	*	0	**
		Depósitos de amilina	0	**	**	*	*	*
	Zona perivascular	Inflamación (infiltración celular)	0	***	**	*	*	**

Grave: ***; Moderado: **; Leve: *; Conservado: 0.

Las células se encontraron en estado de apoptosis, desorganizadas, con citoplasma hipereosinófilo y núcleos picnóticos. Así mismo, se observó necrosis celular,

evidenciada por una infiltración celular en respuesta a la inflamación. En algunos individuos diabéticos se observaron depósitos amilina, de coloración rosado hialino, como evidencia de una diabetes crónica tipo II (fig. 7B; tabla 7).

En los ratones diabéticos tratados con pélet de macroalgas, se observó que el daño de los islotes pancreáticos fue menor en comparación con el grupo DT0 y los tratados con GLI; las macroalgas impidieron la lisis tisular de los islotes, y se destacó la especie *M. pyrifera*, donde no se observó necrosis celular (fig. 7D, E y F; tabla 7).

7.3.2. Tejido hepático

El tejido hepático del grupo de ratones no diabéticos (ND) se encontró dentro de los parámetros histológicos considerados como diagnóstico normal o tejido hepático conservado (tabla 8; fig. 8A).

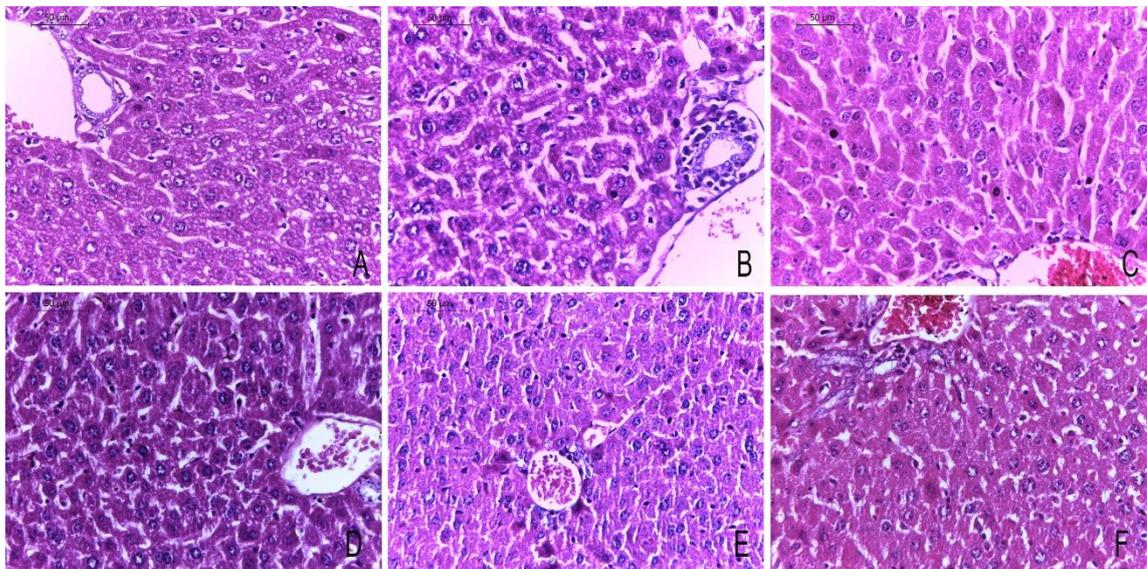


Figura 8. Tejido hepático de los ratones ensayados. **A.** No diabéticos, **B.** Diabéticos sin tratamiento, **C.** Diabéticos tratados con GLI, **D.** Diabéticos tratados con *L. trabeculata*, **E.** Diabéticos tratados con *M. pyrifera* y **F.** Diabéticos tratados con *P. binghamiae*. Tinción H&E. 10X.

En el hígado de ratones diabéticos sin tratamiento (DT0) se diagnosticó la existencia de una lesión necroinflamatoria aguda y crónica, caracterizada por la presencia de muerte celular por apoptosis o necrosis, observándose respuesta inflamatoria con infiltración linfocitaria, y fibrosis moderada en diversas zonas del parénquima hepático. Esto se

evidencia con la pérdida de la arquitectura en los lobulillos hepáticos (con colapso completo y ruptura de la trama reticular), disociación trabecular (sin preservación de la trama reticular) y atrofia (trabéculas adelgazadas), siendo alteraciones características de injurias tóxico-medicamentosas (tabla 8; fig. 8B).

En tratamiento con GLI, el daño fue similar, indicándose que la lesión necroinflamatoria deja de ser aguda, pero es crónica evidenciándose mayor presencia de fibrosis (tabla 8; fig.8C). En los tratamientos con las tres macroalgas, el diagnóstico corresponde a una lesión leve con presencia de una inflamación leve, con zonas de regeneración. Se destacó el tratamiento con *L. trabeculata*, que presentó hepatocitos conservados sin presencia de necrosis, ni apoptosis (tabla 8; fig. 8D, E y F).

Tabla 8. Alteraciones del tejido hepático en los diferentes tratamientos.

PARTES	ALTERACIONES	ND	DT0	DGli	Lt0,1P	Mp0,1P	Pb0,1P
Lobulillos Hepáticos	Inflamación	0	** (M, P)	** (P)	* (M, P)	* (C, M, P)	* (C,M, P)
	Fibrosis	0	** (P)	*** (P)	0	0	0
	Pérdida de la arquitectura	0	***	0	0	0	0
Trabéculas	Disociación trabecular	0	***	0	0	0	0
	Atrofia	0	***	***	***	***	***
Hepatocitos	Células aplanadas con disminución del citoplasma y tamaño	0	***	***	***	0	0
	Degeneración hidrópica	0	**	0	0	0	0
	Megalocitosis	0	**	0	0	0	0
	Muerte celular	0	*** (M, C)	** (P, C)	0	* (M, C)	* (M, C)
	Necrosis	0	***	0	0	0	0
	Degeneración grasa : esteatosis microvesicular	0	*	0	0	0	0
Sinusoides	Congestión	0	***	** (M)	**	**	** (C,P)
Células Kúpffer	Hipertróficas	0	***	***	*	*	*
	Hiperplásicas	0	***	***	*	*	*
Vena Centrolobulillar	Congestión	0	**	***	**	**	**
Triada portal	Inflamación	0	**	***	0	0	0
Zonas de Regeneración	Hiperplasia regenerativa	No	No	No	Sí	Sí	Sí
	Hepatocitos binucleados	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí

Grave: ***; Moderado: **; Leve: *; Conservado: 0
M: Mediozonal, P: Periportal y C: Centrolobulillar

7.3.3. Tejido renal

En los ratones sin diabetes inducida (ND), las estructuras renales se encontraban conservadas (fig. 9A; tabla 9). En los ratones con diabetes inducida (DT0) presentaron

alteraciones como glomerulopatía diabética, observándose glomérulos pequeños, esclerosados, con depósitos hialinos, los túbulos con el epitelio descamado, células con muerte celular por apoptosis e inflamación renal generalizada, nefritis (fig. 9B; tabla 9).

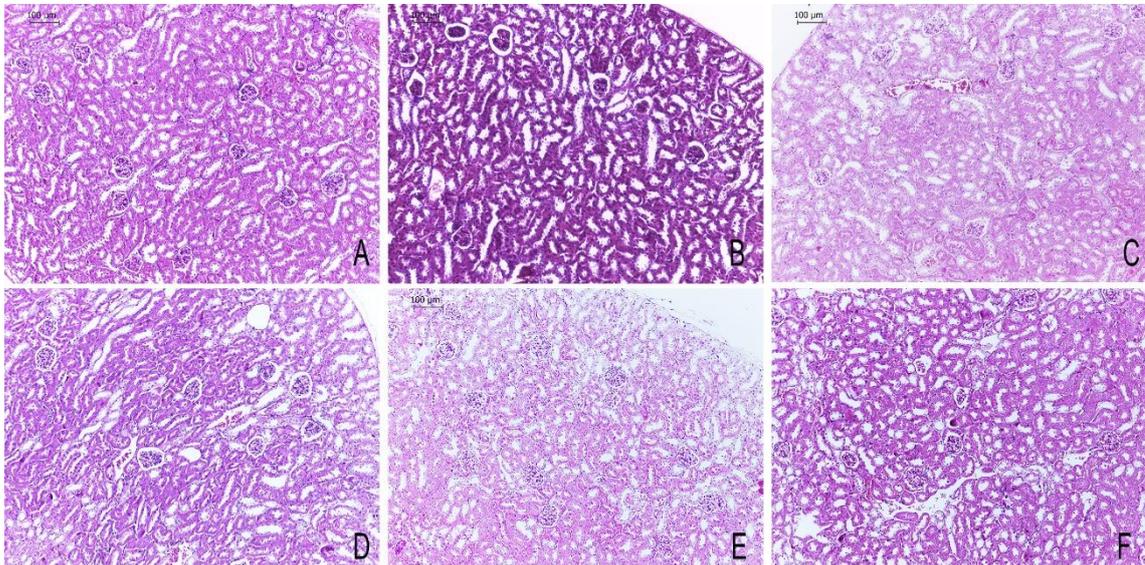


Figura 9. Tejido renal de los ratones ensayados. **A.** No diabéticos, **B.** Diabéticos sin tratamiento, **C.** Diabéticos tratados con GLI, **D.** Diabéticos tratados con *L. trabeculata*, **E.** Diabéticos tratados con *M. pyrifera* y **F.** Diabéticos tratados con *P. binghamiae*. Tinción H&E. 10X.

En el tratamiento con GLI, el diagnóstico corresponde a una glomerulopatía diabética moderada con túbulos con el epitelio descamado, con células en apoptosis y nefritis con infiltración celular moderada (fig. 9C; tabla 9).

Tabla 9. Alteraciones del tejido renal en los diferentes tratamientos

ESTRUCTURAS		ALTERACIONES	ND	DT0	Dgli	Lt0,1P	Mp0,1P	Pb0,1P
Corteza	Glomérulos	Glomerulopatía diabética incipiente	0	***	**	*	*	*
		Depósitos hialinos	0	***	**	*	*	0
	Túbulos (T. Proximales / T. Distales)	Descamación del revestimiento tubular	0	***	***	**	*	0
		Apoptosis	0	***	***	*	*	*
	Instersticio	Nefritis intersticial	0	***	**	*	*	0
Médula	Túbulos (T. Proximales / T. Distales)	Apoptosis	0	***	***	*	*	*
Componente Vascular	Congestión vascular		0	***	**	*	*	0
	Infiltración celular (Inflamación)		0	***	*	0	0	0

Grave: ***; Moderado: **; Leve: *; Conservado: 0

En los tratamientos con las tres macroalgas se presentaron alteraciones leves en los glomérulos con cápsula ligeramente engrosada, leve daño tubular y pocas células en

apoptosis. Se destacó *P. binghamiae*, donde no se presentó nefritis intersticial (inflamación) ni descamación del epitelio de los túbulos renales (fig. 9D, E y F; tabla 9).

7.4. Ensayos bioquímicos de los extractos de macroalgas: cuantificación, identificación y actividad antioxidante de polifenoles

La cantidad total de polifenoles cuantificados con el método de Folin-Ciocalteu en los extractos de las tres macroalgas se muestra en la fig. 10. *L. trabeculata*, la especie con mayor cantidad de polifenoles, alcanzó un valor de 255,6 mg FGE en 100 g de macroalga seca, seguida por *P. binghamiae* con 237,9 y finalmente, *M. pyrifera* con 60,8.

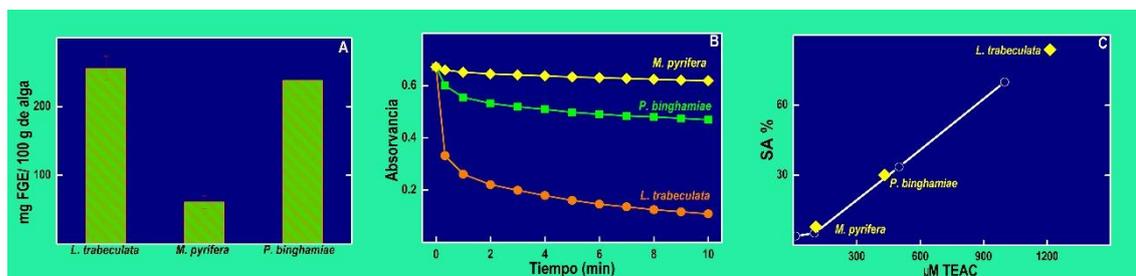


Figura 10.A. Cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de las macroalgas *L. trabeculata*, *M. pyrifera* y *P. binghamiae* totales. A. Cantidad de polifenoles expresados en mg FGE. B. Cinética de extinción de ABTS+ con extractos de macroalgas marinas a una dilución 10^{-1} . C. Porcentaje de captación de radicales libres de los extractos de macroalgas y concentraciones de TROLOX.

La actividad antioxidante *in vitro* se califica cuantificando la extinción de radicales libres en un medio acuoso. El método de ABTS+ facilita las lecturas, pues la diferencia de densidad óptica está correlacionada con la actividad captadora de radicales y, por ende, permite cuantificar la actividad antioxidante de los extractos.

Tabla 10. Tiempos de retención de los estándares de polifenoles.

Polifenol estándar	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención (min)		
		Inicio	Final	Pico máximo
Ácido Gálico	270	4,8	6,8	5,2
Ácido Protocatecuico		9	11,2	9,4
Ácido Vanílico		16,5	18,4	16,9
Ácido Cafeico		17,2	18,2	17,5
Ácido Siríngico		17,7	19,4	18,0
Ácido Clorogénico	324	14,6	15,4	15,0;
Ácido Cumárico		22,1	23,8	22,5
Ácido Ferúlico		23,0	24,8	23,4
Miricetina	373	27,8	31,2	29,4
Quercetina		32,4	35,2	33,6

En la figura 10B, se muestra la cinética de actividad captadora de radicales libres de los extractos de macroalgas. El extracto de *L. trabeculata* muestra la mayor actividad captadora de radicales, con un valor de 367,31 mg TEAC y valores más reducidos para *P. binghamiae* con 156,34 y *M. pyrifera* con 99,09 (fig. 10C).

Para la identificación de los polifenoles se utilizaron los cromatogramas obtenidos con RP-HPLC de los estándares mostrados como capas superpuestas con los cromatogramas de los extractos de macroalgas (fig. 11).

Tabla 11. Identificación de polifenoles en los extractos de macroalgas

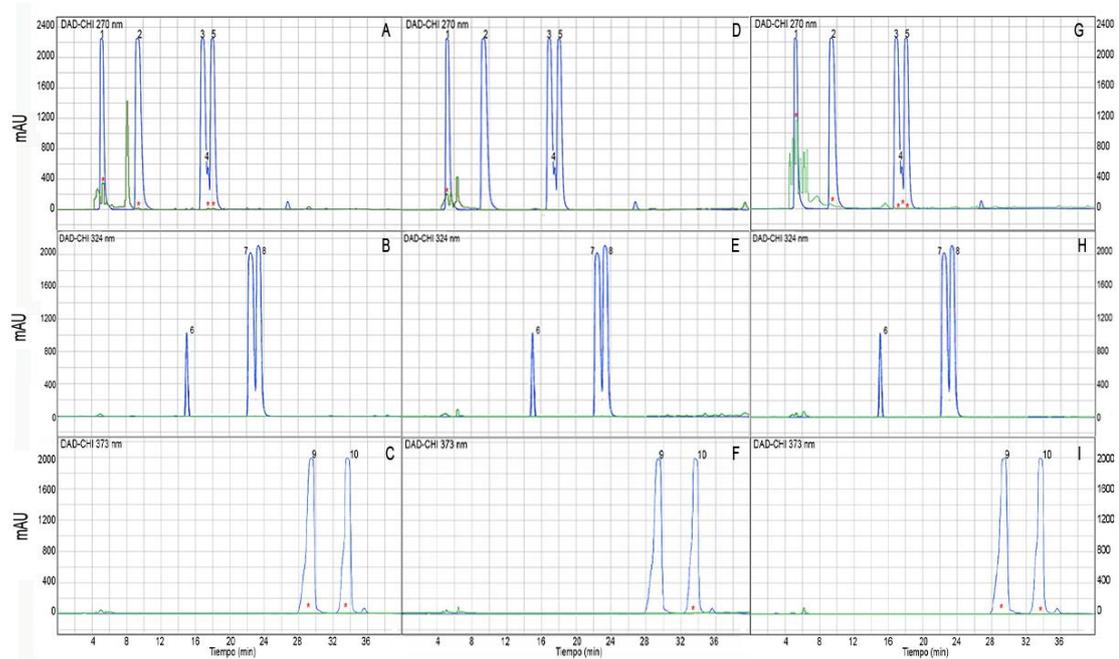
	<i>L. trabeculata</i>	<i>M. pyrifera</i>	<i>P. binghamiae</i>
Ácido gálico	X	X	X
Ácido protocatecuico	X		X
Ácido vanílico	X		X
Ácido cafeico	X		X
Ácido siríngico	X		X
Ácido clorogénico			X
Ácido cumárico			X
Ácido ferúlico			X
Miricetina	X		X
Quercetina	X	X	X

Adicionalmente, en la tabla 10 se muestran los tiempos de retención en minutos (inicio, pico y final) de los estándares dependiendo de la longitud de onda a la que se leyeron.

La identificación de polifenoles presentes en los extractos fue confirmada por el *software* EZChromElite, mediante la comparación de tiempos de retención y por superposición de los perfiles cromatográficos de los estándares de polifenoles en las tres longitudes de onda, los cuales fueron graficados y agrupados por especie de macroalga.

En los extractos de las tres especies de macroalgas fueron detectados polifenoles como el ácido gálico y la quercetina. Además, se consiguió realizar el mayor número de identificación de polifenoles en el extracto de *P. binghamiae*, seguida por *L. trabeculata*

y, por último, *M. pyrifera*. En *P. binghamiae* fueron encontrados los ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, cafeico y siríngico (a 270 nm), el clorogénico, el cumárico y el ferúlico (a 324 nm) y miricetina y quercetina (a 373 nm).



* Polifenoles identificados.

Figura 11. Cromatogramas de los extractos de las especies de macroalgas (verde) en superposición al cromatograma de los polifenoles estándares (azul): **A, B y C)** *P. binghamiae*; **D, E y G)** *L. trabeculata* **G, H, I)** *M. pyrifera*. **A, D y G)** 270 nm, pico 1: ácido gálico, pico 2: ácido protocatecuico, pico 3: ácido vanílico, pico 4: ácido cafeico, pico 5: ácido siríngico; **B, E y H)** 324 nm, pico 6: ácido clorogénico, pico 7: ácido cumárico, pico 8: ácido ferúlico; **C, F e I)** 373 nm, pico 9: miricetina, pico 10: quercetina.

También fue considerable la identificación de polifenoles en el extracto de *L. trabeculata*, donde se encontraron los ácidos gálico, protocatecuico, vanílico y siríngico (a 270 nm) y miricetina y quercetina (a 373 nm). Finalmente, en el extracto de *M. pyrifera* únicamente fueron detectados el ácido gálico y la quercetina (tabla 11; fig. 11).

8. DISCUSIÓN

Para lograr la inducción de diabetes en ratones utilizando STZ se presentaron muchas dificultades, debido a que la mayoría de los protocolos estaban aplicados a otros modelos animales. Así, diferentes autores utilizan una dosis entre 30 a 50 mg/Kg en ratas Wistar, con lo que se logra hasta un 40% de roedores diabéticos que presentan niveles de glucosa de 300 mg/dL a los 7 días posteriores a la inducción (Mythili et al. 2004; Mostafavinia et al. 2016). Por otro lado, Wu y Huan (2008) recomiendan una dosis de 50 mg/Kg en cuatro aplicaciones o una dosis de 200 mg/Kg para ratones machos CD-1, para lograr hasta un 80% de efectividad. En el presente estudio, se administró una dosis única de 100 mg/Kg, con la que se obtuvo un 50,7% de diabéticos con una hiperglucemia moderada, mayor a 150 mg/dL.

En los animales con diabetes inducida se observó una disminución progresiva en la tasa de aumento de peso corporal, coincidentemente con otros autores que indican que ello puede conllevar incluso a la disminución de la sobrevivencia, debido probablemente a la muerte de las células β -pancreáticas (Lu et al. 1998; Dekel et al. 2009; Montanya et al. 2000).

En tratamientos con GLI, macroalgas y extractos de macroalgas se hace más evidente la disminución del peso corporal (Iwai 2008; Kang et al. 2008). En el presente estudio, solo en los tratamientos con extractos de *L. trabeculata* se registró una pérdida de peso corporal significativa debido, probablemente, al efecto antiobesidad, explicado por otros autores para otras especies de macroalgas pardas (Kang et al. 2011; Kang et al. 2012); mientras que con el consumo de macroalga molida (pélet) de *L. trabeculata* se tuvo una tendencia ligera a incrementar el peso corporal, como se indica para el macroalga parda *Ecklonia cava* (Kim y Kim 2012).

La glucosa basal en los ratones DT0 aumenta semanalmente por el deterioro de las células β -pancreáticas causado por daño progresivo de la STZ (Lenzen 2008). En los

ratones diabéticos tratados con GLI se observa una regulación de la glucosa, sin alcanzar los niveles normoglicémicos, probablemente debido al incremento del número de sus receptores, mejorando así la sensibilidad a la insulina (Beck-Nielsen, Pedersen y Lindskov 1979).

En el presente estudio, la concentración de macroalga para la obtención de los extractos fue equivalente a 4 g de macroalga molida por 1 Kg de peso del individuo, lo que significa que una persona de 60 Kg con hiperglucemia debería consumir diariamente 240 g de macroalga seca, lo que es una cantidad exagerada para el consumo humano. No se ha logrado detectar ningún efecto hipoglicemiante para ninguno de los extractos hidroalcohólicos. En estudios previos de Corea de Sur, con extractos de *P. binghamiae*, se evidenció actividad hipoglicemiante en la suplementación dietética de 1% equivalente a 0,9 g de macroalga pulverizada, y no se registró ninguna actividad al 0,5%, esta cantidad indica que una persona de 60 Kg debería consumir diariamente más de 2 Kg de macroalga para lograr el efecto (Kang et al. 2008; Kang et al. 2012). Coincidentemente a los resultados con GLI, los tratamientos de ratones diabéticos con macroalga pulverizada muestran una disminución de la glucosa basal. Esta actividad hipoglicemiante se diferenció significativamente en *L. trabeculata*, mientras que en *P. binghamiae* y *M. pyrifera*, solo se observa una tendencia a disminuir. La diferencia que existe entre los tratamientos con ingesta de pélet de macroalga y los que fueron tratados con extractos se debe, probablemente, a que el proceso de extracción no logró fraccionar los compuestos con actividad hipoglicemiante, polisacáridos que actúan estimulando la secreción de insulina *in vitro*, con mecanismos diferentes a GLI (Zhang et al. 2008; Hao et al. 2011; Lan et al. 2017).

La prueba de tolerancia a la glucosa consumida directamente o en forma de almidón tiene como objetivo evaluar el metabolismo de carbohidratos en un lapso de 2 h, lo cual puede ser influido por compuestos bioactivos de las macroalgas, como los polifenoles, que regulan la absorción de la glucosa e inhiben la digestión del almidón (Kim, Keogh,

y Clifton 2016; Sun y Miao 2020). Estos metabolitos secundarios con potencial antidiabético han sido encontrados en algunas especies de macroalgas pardas (Lopez et al. 2011; Murugan et al. 2015). Las especies estudiadas tienen un valor significativo de polifenoles, cuya actividad captadora de radicales resultó hasta 400 mg TEAC para la especie *L. trabeculata*. Los polifenoles como el ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico y miricetina, identificados en *P. binghamiae*, *L. trabeculata* y *M. pyrifera*, coincidentemente tienen actividad antidiabética (Li y Ding 2012; Vinayagam, Jayachandran y Xu 2016), inhibición de las actividades de α -glucosidasa y α -amilasa (Sharifuddin et al. 2015)

Yoon, Choi y Jun (2017) mostraron que la disminución de niveles de glucosa en sangre por acción de los polifenoles reduce el daño al páncreas, hígado y riñón. Así mismo, Kim y Kim (2012) demostraron el efecto hepatoprotector (hipolipémico) de macroalgas en ratones diabéticos tratados con dietas suplementadas con hasta 5% de *Ecklonia cava* durante cuatro semanas. Similarmente, en el presente estudio, los tejidos (pancreático, hepático y renal) presentaron un menor daño con las tres especies estudiadas, en comparación con los ratones diabéticos sin tratamiento.

9. CONCLUSIONES

Con respecto a la glucosa basal y la prueba de tolerancia a la glucosa, al finalizar el tratamiento con *L. trabeculata* pulverizada disminuyó la hiperglicemia (efecto hipoglicemiante) y se reguló la glucosa posprandial, de modo similar a los ratones ND. Del mismo modo, en la prueba de tolerancia al almidón, *L. trabeculata* y en menor grado *P. binghamiae*, ambas macroalgas pulverizadas, regularon la glucosa posprandial.

Los tratamientos con macroalga pulverizada tuvieron un efecto protector del páncreas endocrino; se destacó *M. pyrifera*, con la que solo se observó una leve inflamación. Del mismo modo, también se observó un efecto hepatoprotector y regenerativo, con tejidos mayormente conservados con *L. trabeculata*. Con respecto al tejido renal, se observó un menor daño, donde destacó *P. binghamiae* con un tejido más conservado y menor grado de inflamación.

Los extractos de *L. trabeculata* presentaron mayor cantidad de polifenoles y mayor capacidad captadora de radicales libres. El mayor número de polifenoles identificados correspondió a *P. binghamiae*.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acleto, C. 1986. *Algas marinas del Perú de importancia económica*. 2ª ed. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Museo de Historia Natural Javier Prado, Departamento de Botánica.
- Anand, N., D. Rachel, N. Thangaraju, y P. Anantharaman. 2016. "Potential of marine algae (sea weeds) as source of medicinally important compounds". *Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization* 14 (4): 303-313. <https://doi.org/10.1017/s1479262116000381>.
- Bailey, C. J. 2015. "The current drug treatment landscape for diabetes and perspectives for the future". *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 98 (2): 170-184. <https://doi.org/10.1002/cpt.144>.
- Beck-Nielsen, H., O. Pedersen y H. Lindskov. 1979. "Increased insulin sensitivity and cellular insulin binding in obese diabetics following treatment with glibenclamide". *Acta Endocrinologica* 90 (3): 451-462. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0900451>. https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/90/3/acta_90_3_009.xml.
- Camus, C., M. Hernández-González y A. Buschmann. 2019. "The seaweed resources of Chile over the period 2006-2016: moving from gatherers to cultivators." *Botanica Marina* 62 (3): 237-247. <https://doi.org/10.1515/bot-2018-0030>.
- Chen, W. Y., C. J. Chen, C. H. Liu y F. C. Mao. 2009. "Chromium supplementation enhances insulin signalling in skeletal muscle of obese KK/HIJ diabetic mice". *Diabetes Obesity & Metabolism* 11 (4): 293-303. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00936.x>.
- Costa, L. S., G. P. Fidelis, S. L. Cordeiro, R. M. Oliveira, D. A. Sabry, R. B. G. Camara, Ldb Nobre, Mssp Costa, J. Almeida-Lima, E. H. C. Farias, E. L. Leite y H. A. O. Rocha. 2010. "Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64 (1): 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.005>.
- Dekel, Y., Y. Glucksam, I. Elron-Gross y R. Margalit. 2009. "Insights into modeling streptozotocin-induced diabetes in ICR mice". *Lab Animal* 38 (2): 55-60. <https://doi.org/10.1038/labon0209-55>.
- Dillehay, T. D., C. Ramirez, M. Pino, M. B. Collins, J. Rossen y J. D. Pino-Navarro. 2008. "Monte Verde: Seaweed, food, medicine, and the peopling of South America". *Science* 320 (5877): 784-786. <https://doi.org/10.1126/science.1156533>.
- Federación Internacional de Diabetes-IDF. 2019. *IDF Diabetes Atlas*. 9ª ed. Bruselas Federación Internacional de Diabetes.
- Folin, O. y V. Ciocalteu. 1927. "On tyrosine and tryptophane determinations in proteins." *Journal of Biological Chemistry* 73 (2): 627-650. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)84277-6).
- Goyal, S. N., N. M. Reddy, K. R. Patil, K. T. Nakhate, S. Ojha, C. R. Patil y Y. O. Agrawal. 2016. "Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics". *Chemico-Biological Interactions* 244: 49-63. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.032>.

- Hao, C., J. J. Hao, W. Wang, Z. R. Han, G. S. Li, L. J. Zhang, X. Zhao y G. L. Yu. 2011. "Insulin sensitizing effects of oligomannuronate-chromium (iii) complexes in C2C12 skeletal muscle cells". *Plos One* 6 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024598>.
- Hoffmann, A. y B. Santelices. 1997. *Flora marina de Chile central*. Santiago. Ediciones Universidad Catolica de Chile.
- Iwai, K. 2008. "Antidiabetic and Antioxidant Effects of Polyphenols in Brown Alga *Ecklonia stolonifera* in Genetically Diabetic KK-A(y) Mice". *Plant Foods for Human Nutrition* 63 (4): 163-169. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0098-4>.
- Jia, X. B., J. Yang, Z. Wang, R. C. Liu y R. J. Xie. 2014. "Polysaccharides from *Laminaria japonica* show hypoglycemic and hypolipidemic activities in mice with experimentally induced diabetes". *Experimental Biology and Medicine* 239 (12): 1663-1670. <https://doi.org/10.1177/1535370214537751>.
- Jimenez-Escrig, A., E. Gomez-Ordóñez y P. Ruperez. 2012. "Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals". *Journal of Applied Phycology* 24 (5): 1123-1132. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9742-8>.
- Jimenez-Escrig, A., I. Jimenez-Jimenez, R. Pulido y F. Saura-Calixto. 2001. "Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (5): 530-534. <https://doi.org/10.1002/jsfa.842>.
- Jonsson, A., T. Rydberg, G. Ekberg, B. Hallengren y A. Melander. 1994. "Slow elimination of glyburide in NIDDM subjects". *Diabetes Care* 17 (2): 142-145. <https://doi.org/10.2337/diacare.17.2.142>.
- Kang, S. I., Y. J. Jin, H. C. Ko, S. Y. Choi, J. H. Hwang, I. Whang, M. H. Kim, H. S. Shin, H. B. Jeong y S. J. Kim. 2008. "Petalonia improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic mice". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373 (2): 265-269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.015>.
- Kang, S. I., M. H. Kim, H. S. Shin, H. M. Kim, Y. S. Hong, J. G. Park, H. C. Ko, N. H. Lee, W. S. Chung y S. J. Kim. 2010. "A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet". *Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (12): 1251-1257. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.008>.
- Kang, S. I., H. C. Ko, H. S. Shin, H. M. Kim, Y. S. Hong, N. H. Lee y S. J. Kim. 2011. "Fucoxanthin exerts differing effects on 3T3-L1 cells according to differentiation stage and inhibits glucose uptake in mature adipocytes". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409 (4): 769-774. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.086>.
- Kang, S. I., H. S. Shin, H. M. Kim, S. A. Yoon, S. W. Kang, J. H. Kim, H. C. Ko y S. J. Kim. 2012. "Petalonia binghamiae Extract and Its Constituent Fucoxanthin Ameliorate High-Fat Diet-Induced Obesity by Activating AMP-Activated Protein Kinase". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (13): 3389-3395. <https://doi.org/10.1021/jf2047652>.
- Kim, M.-J. y H. K. Kim. 2012. "Insulinotropic and hypolipidemic effects of *Ecklonia cava* in streptozotocin-induced diabetic mice". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5 (5): 374-379. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(12\)60062-5](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(12)60062-5).

- Kim, Y., J. Keogh y P. Clifton. 2016. "Polyphenols and Glycemic Control". *Nutrients* 8 (1): 17. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>. <https://www.mdpi.com/2072-6643/8/1/17/pdf>.
- Kumar, T. V., S. Lakshmanasenthil, D. Geetharamani, T. Marudhupandi, G. Suja y P. Suganya. 2015. "Fucoidan - A alpha-D-glucosidase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to type 2 diabetes mellitus therapy". *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 1044-1047. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.013>.
- Lamela, M., J. Anca, R. Villar, J. Otero y J.M. Calleja. 1989. "Hypoglycemic activity of several seaweed extracts". *Journal of Ethnopharmacology* 27 (1-2): 35-43. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90075-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90075-5).
- Lan, Y., X. Zeng, Z. Guo, P. Zeng, C. Hao, X. Zhao, G. Yu y L. Zhang. 2017. "Polyguluronate sulfate and its oligosaccharides but not heparin promotes FGF19/FGFR1c signaling". *Journal of Ocean University of China* 16 (3): 532-536. <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3195-x>.
- Lee, S. H. y Y. J. Jeon. 2013. "Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms". *Fitoterapia* 86: 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.02.013>.
- Lenzen, S. 2008. "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes". *Diabetologia* 51 (2): 216-226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>.
- Li, Y. y Y. Ding. 2012. "Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus". *Food Science and Human Wellness* 1 (1): 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2012.08.002>.
- Lopez, A., M. Rico, A. Rivero y M. S. de Tangil. 2011. "The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts". *Food Chemistry* 125 (3): 1104-1109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.101>.
- Lu, W. T., J. H. Juang, B. R. S. Hsu y H. S. Huang. 1998. "Effects of high or low dose of streptozotocin on pancreatic islets in C57BL/6 and C.B17-SCID mice". *Transplantation Proceedings* 30 (2): 609-610. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(97\)01425-5](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(97)01425-5).
- Mansilla, A., M. Avila y N. S. Yokoya. 2012. "Current knowledge on biotechnological interesting seaweeds from the Magellan Region, Chile". *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22 (4): 760-767. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000074>.
- Mohamed, S., S. N. Hashim y H. A. Rahman. 2012. "Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy". *Trends in Food Science & Technology* 23 (2): 83-96. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>.
- Montanya, E., V. Nacher, M. Biarnes y J. Soler. 2000. "Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats - Role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy". *Diabetes* 49 (8): 1341-1346. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.8.1341>.

- Mostafavinia, A., A. Amini, S. K. Ghorishi, R. Pouriran y M. Bayat. 2016. "The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats". *Laboratory Animal Research* 32 (3): 160. <https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.3.160>.
- Murugan, A. C., M. R. Karim, M. B. M. Yusoff, S. H. Tan, M. F. B. Asras y S. S. Rashid. 2015. "New insights into seaweed polyphenols on glucose homeostasis". *Pharmaceutical Biology* 53 (8): 1087-1097. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.959615>.
- Mythili, M. D., R. Vyas, G. Akila y S. Gunasekaran. 2004. "Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets". *Microscopy Research and Technique* 63 (5): 274-281. <https://doi.org/10.1002/jemt.20039>.
- Nisizawa, K., H. Noda, R. Kikuchi y T. Watanabe. 1987. "The main seaweed foods in Japan". *Hydrobiologia* 151-152 (1): 5-29. <https://doi.org/10.1007/bf00046102>.
- Organización Mundial de la Salud-OMS. 2019. *Classification of diabetes mellitus*. Ginebra: OMS.
- Santome, S., L. Vera, N. Pérez, J. Leandro, J. Vélez, N. Salas, R. Lengua, E. Becerra, L. Arbaiza y C. Córdova. 2016. "Actividad antioxidante *in vitro* mediante método de ABTS de dos tipos de extractos de macroalgas pardas". Documento presentado en la XXV Reunión científica ICBAR, Lima, 15-18 de agosto.
- Senthil, S. L., T. V. Kumar, D. Geetharamani, G. Suja, R. Yesudas y A. Chacko. 2015. "Fucoidan - An alpha-amylase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to NIDDM". *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 644-647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.065>.
- Sharifuddin, Y., Y. X. Chin, P. E. Lim y S. M. Phang. 2015. "Potential bioactive compounds from seaweed for diabetes management". *Marine Drugs* 13 (8): 5447-5491. <https://doi.org/10.3390/md13085447>.
- Shaw, J. E., R. A. Sicree y P. Z. Zimmet. 2010. "Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030". *Diabetes Research and Clinical Practice* 87 (1): 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>.
- Sun, L. J. y M. Miao. 2020. "Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60 (4): 541-555. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544883>.
- Tong, T., J. Li, D. O. Ko, B. S. Kim, C. Zhang, K. S. Ham y S. G. Kang. 2014. "In vitro antioxidant potential and inhibitory effect of seaweed on enzymes relevant for hyperglycemia". *Food Science and Biotechnology* 23 (6): 2037-2044. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0277-z>.
- Vinayagam, R., M. Jayachandran y B. J. Xu. 2016. "Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review". *Phytotherapy Research* 30 (2): 184-199. <https://doi.org/10.1002/ptr.5528>.
- Wu, K. K. y Y. Huan. 2008. "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats". *Current Protocols in Pharmacology* 40 (1): 5.47.1-5.47.14. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s40>.

- Xing, M. C., Q. Cao, Y. Wang, H. Xiao, J. R. Zhao, Q. Zhang, A. G. Ji y S. L. Song. 2020. "Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides". *Marine Drugs* 18 (3). <https://doi.org/10.3390/md18030144>.
- Yoon, J. Y., H. Choi y H. S. Jun. 2017. "The Effect of Phloroglucinol, A Component of *Ecklonia cava* Extract, on Hepatic Glucose Production". *Marine Drugs* 15 (4). <https://doi.org/10.3390/md15040106>.
- Zhang, D. D., I. Fujii, C. Z. Lin, K. Ito, H. S. Guan, J. E. Zhao, M. Shinohara y M. Matsukura. 2008. "The stimulatory activities of polysaccharide compounds derived from algae extracts on insulin secretion in vitro". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31 (5): 921-924. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.921>.

11. GLOSARIO

BALB/c:	Cepa de ratón endogámica, inmunodeficiente y albina. Los ratones BALB / c tienen las características de reproducción fácil y variaciones mínimas de peso entre machos y hembras.
bioterio:	Es el lugar destinado a la cría y control de los animales de laboratorio utilizados como reactivos biológicos en protocolos experimentales.
camadas:	Conjunto de las crías de ciertos animales nacidas en el mismo parto.
hiperglucemia:	Condición que se caracteriza por niveles altos de azúcar en la sangre.
hipoglucemia:	Condición que se caracteriza por niveles bajos de glucosa en la sangre (anormales), usualmente menos de 70 mg/dL.
normoglucémico:	Valores normales de glucosa en sangre.
palatabilidad:	Cualidad de ser grato al paladar un alimento.
pélet	Alimento con forma esférica y cilíndrica.
picnosis:	Condensación celular en la que el protoplasma se hace más denso propia de una célula que se muere.
posprandial:	Posterior a las comidas.

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Fundada en 1551

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

CONSTANCIA N° 001-LFM-FCB-UNMSM-2021

El JEFE del LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA (LFM) de la FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, de la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, deja constancia que:

La muestra vegetal (Planta estéril), recibida de Noelia Ivette Pérez Varillas; de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices, y tiene la siguiente posición taxonómica

DIVISION:	OCHROPHYTA
CLASE:	PHAEOPHYCEAE
ORDEN:	LAMINARIALES
FAMILIA:	LESSONIAEAE
GÉNERO:	<i>Lessonia</i>
ESPECIE:	<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta y Santelices
NOMBRE VULGAR:	"palo blanco", "cabeza"

Determinado por el suscrito.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 15 de julio de 2021

Mag. Cesar Augusto Córdova Castañeda
JEFE DE LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA
FCB-UNMSM
CBP: 2628





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia "

CONSTANCIA N° 002-LFM-FCB-UNMSM-2021

El JEFE del LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA (LFM) de la FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, de la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, deja constancia que:

La muestra vegetal (Planta estéril), recibida de Noelia Ivette Pérez Varillas; de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C.Agardh, y tiene la siguiente posición taxonómica

DIVISION:	OCHROPHYTA
CLASE:	PHAEOPHYCEAE
ORDEN:	LAMINARIALES
FAMILIA:	LAMINARIACEAE
GÉNERO:	<i>Macrocystis</i>
ESPECIE:	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C.Agardh
NOMBRE VULGAR:	"Huiro", "sargazo", "bolas"

Determinado por el suscrito.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 15 de julio de 2021

Mag. César Augusto Córdova Casanueva
JEFE DE LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA
FCB-UNMSM
CBP: 2628





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Fundada en 1551
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

CONSTANCIA N° 003-LFM-FCB-UNMSM-2021

El JEFE del LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA (LFM) de la FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, de la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, deja constancia que:

La muestra vegetal (Planta estéril), recibida de Noelia Ivette Pérez Varillas; de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices, y tiene la siguiente posición taxonómica

DIVISION:	OCHROPHYTA
CLASE:	PHAEOPHYCEAE
ORDEN:	ECTOCARPALES
FAMILIA:	SCYTOSIPHONACEAE
GÉNERO:	<i>Petalonia</i>
ESPECIE:	<i>Petalonia binghamiae</i> (J.Agardh) K.L.Vinogradova
NOMBRE VULGAR:	no registra.

Determinado por el suscrito.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 15 de julio de 2021

Mag. Cesar Augusto Córdova Castañeda
JEFE DE LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA
FCB-UNMSM
CBP: 2628

