



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA

**Estudio fitoquímico y evaluación de las propiedades hipoglucemiantes
de *Clusia latipes***

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Silva Rivas, Ronald Santiago

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ph.D.

LOJA - ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Juan Carlos Romero Benavides.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, denominado: Estudio fitoquímico y evaluación de las propiedades hipoglucemiantes de *Clusia latipes*, realizado por Silva Rivas Ronald Santiago, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre 2017

f).

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Silva Rivas Ronald Santiago declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Estudio fitoquímico y evaluación de las propiedades hipoglucemiantes de *Clusia latipes*, de la Maestría en Química Aplicada, siendo Juan Carlos Romero Benavides, Ph.D. director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, concepto, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f).

Autor: Ronald Santiago Silva Rivas

Cédula: 1105048183

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a mi madre Sra. Lilia Mariana Rivas Rivas por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación y por enseñarme a ser perseverante cada día; a mi hermano por su apoyo y mis amigos cercanos por haber compartido buenos momentos.

Ronald Silva

AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a mi madre por ser parte de mi vida cada día y por convertirse en una fuente de motivación y apoyo indispensable.

Agradezco al Ph. D. Jun Carlos Romero Benavides por su orientación y apoyo en el desarrollo del presente trabajo y por haber compartido sus conocimientos elementales para lograr culminar satisfactoriamente la presente investigación.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de fitoquímica por compartir sus experiencias, enseñanzas y alegrías.

Ronald Silva

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Diabetes mellitus.....	6
1.2. Criterios de diagnóstico para diabetes mellitus.....	6
1.3. Clasificación de la diabetes	7
1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)	7
1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	8
1.3.3. Diabetes mellitus gestacional (DMG).....	8
1.3.4. Otros tipos específicos	9
1.4. Daño oxidativo y diabetes mellitus	9
1.5. Tratamiento de la diabetes mellitus	10
1.5.1. Fármacos antidiabéticos	10
1.6. Productos naturales	12
1.7. Plantas medicinales.....	12
1.8. Metabolitos secundarios.....	13
1.9. Género <i>Clusia</i>	14
1.10. <i>Clusia latipes</i>	15
2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	16
2.1. Métodos	17
2.2. Materia vegetal	17
2.3. Obtención de los extractos	18
2.4. Ensayo de inhibición sobre α -glucosidasa.....	18
2.5. Actividad antioxidante	19
2.5.1. Curva de calibración	19
2.5.2. Ensayo de barrido de radicales de DPPH	20

2.5.3.	Cálculo de resultados	21
2.5.4.	Ensayo de barrido de radicales de ABTS	21
2.6.	Extracción líquido-líquido.....	22
2.7.	Tamizaje fitoquímico	23
2.8.	Cromatografía en columna.....	23
2.9.	Cromatografía en capa fina	23
2.10.	Purificación e identificación	24
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1.	Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Clusia latipes</i>	26
3.2.	Ensayo de inhibición de α -glucosidasa	26
3.2.1.	Inhibición de α -glucosidasa de los extractos obtenidos de <i>Clusia latipes</i>	26
3.3.	Extracción líquido-líquido.....	27
3.3.1.	Inhibición de α -glucosidasa de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos	28
3.4.	Evaluación de la actividad antioxidante.....	29
3.4.1.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de barrido de radicales de DPPH y ABTS de los extractos de <i>Clusia latipes</i>	29
3.4.2.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de barrido de radicales de DPPH y ABTS de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos.....	30
3.4.3.	SC ₅₀ de los extractos de <i>Clusia latipes</i>	31
3.4.4.	SC ₅₀ de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos.	32
3.5.	Tamizaje fitoquímico de los extractos más activos y sus fracciones.....	33
3.6.	Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de <i>Clusia latipes</i>	34
3.6.1.	Cromatografía en columna con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt	34
3.6.2.	Cromatografía en columna de la fracción F4 obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt	37
3.6.2.1.	Cromatografía en columna de la fracción F4b obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4	38
3.6.2.2.	Cromatografía en columna de la fracción F4d obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4	39
3.6.2.3.	Cromatografía en columna de la fracción F5d obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F5	41
3.6.3.	Cromatografía en capa fina preparativa en placas de aluminio cubiertas de silica gel fase normal de las fracciones F4e, F4f, F4d(III), F4d(IV), F5a, F5b y F5c	42
	CONCLUSIONES	45
	RECOMENDACIONES	46

BIBLIOGRFÍA	47
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud de los criterios de diagnóstico para la diabetes y la hiperglicemia intermedia (World Health Organization, 2016c). 7	
Tabla 2. Mecanismos de acción y efectos secundarios de algunos fármacos utilizados en la diabetes mellitus tipo 2. 11	11
Tabla 3. Taxonomía de <i>Clusia latipes</i> 15	15
Tabla 4. Estándares para el análisis de actividad antioxidante (DPPH y ABTS). 20	20
Tabla 5. Pesos y rendimiento de extractos. 26	26
Tabla 6. Inhibición de α -glucosidasa de los extractos de hojas y tallos de <i>Clusia latipes</i> 26	26
Tabla 7. Pesos y rendimientos de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos. 27	27
Tabla 8. Inhibición de α -glucosidasa de las fracciones (particiones) obtenidas de los extractos de metanólicos de hojas y tallos. 28	28
Tabla 9. Barrido de radicales de DPPH y ABTS de extractos de hojas y tallos de <i>Clusia latipes</i> 29	29
Tabla 10. Barrido de radicales de DPPH y ABTS de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos de <i>Clusia latipes</i> 30	30
Tabla 11. SC_{50} de los extractos obtenidos de hojas y tallos de <i>Clusia latipes</i> 31	31
Tabla 12. SC_{50} de la fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos de <i>Clusia latipes</i> 32	32
Tabla 13. Tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de hojas y tallos y sus fracciones. 34	34
Tabla 14. Separaciones obtenidas en cromatografía en columna con silica gel inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt. 35	35
Tabla 15. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución cromatográfica con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt. 36	36
Tabla 16. Separaciones obtenidas en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4. 37	37
Tabla 17. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4. 37	37
Tabla 18. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4b. 38	38

Tabla 19. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4d.	39
Tabla 20. Separaciones obtenidas en cromatografía en columna con silica fase normal de la fracción F5.....	40
Tabla 21. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F5.	40
Tabla 22. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F5d.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especie <i>Clusia latipes</i>	15
Figura 2. Esquema de la metodología desarrollada en el presente trabajo.	17
Figura 3. Mapa del sitio de recolección de la especie <i>Clusia latipes</i> entre los cantones Gonzanamá y Quilanga.....	18
Figura 4. Esquema de fraccionamiento de los extracto metanólicos de hojas y tallos.....	22
Figura 5. Fracción H-MeOH-F-AcOEt eluida en cromatografía en capa fina fase inversa. A. UV 365 nm. B. UV 254. C. Luego de aplicar la solución de revelado.....	35
Figura 6. Cromatografía en capa fina fase directa de los compuestos 1 y 2.....	42

RESUMEN

En la diabetes la insulina no controla los niveles de azúcar en la sangre, la más común es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), producida por la secreción inadecuada de insulina. Una estrategia para controlar la hiperglucemia postprandial en DM2 por bajo costo y baja incidencia de efectos secundarios es el consumo de inhibidores de α -glucosidasa naturales. Los extractos en hexano, acetato de etilo y metanol de *Clusia latipes* fueron evaluados *in vitro* la actividad inhibitoria de α -glucosidasa y la actividad antioxidante. La actividad inhibidora de α -glucosidasa con mayor potencial fue de los extractos en acetato de etilo y metanol, estos revelaron la presencia de alcaloides, carbohidratos, flavonoides, quinonas, saponinas y taninos según el tamizaje fitoquímico. La inhibición más alta sobre α -glucosidasa presentó la fracción de acetato de etilo de hojas con CI_{50} de 0.90 $\mu\text{g/ml}$, mostró ser 270 veces más eficaz que la acarbosa (control positivo). La actividad antioxidante más potente fue de las fracciones de hojas y tallos de acetato de etilo en DPPH (SC_{50} : 4.70 $\mu\text{g/ml}$ y 3.58 $\mu\text{g/ml}$) y ABTS (SC_{50} : 3.29 $\mu\text{g/ml}$ y 2.27 $\mu\text{g/ml}$).

Palabras clave: ABTS, *Clusia latipes*, diabetes mellitus tipo 2, DPPH y α -glucosidasa.

ABSTRACT

In diabetes, insulin does not control blood sugar levels; the most common is type 2 diabetes mellitus (DM2), caused by inadequate insulin secretion. One strategy to control postprandial hyperglycemia in DM2 with a low-cost and low-incidence of side effects is the consumption of natural α -glucosidase inhibitors. Extracts in hexane, ethyl acetate, and methanol from *Clusia latipes* were evaluated in vitro for α -glucosidase inhibitory and antioxidant activity. The inhibitory activity of α -glucosidase had the highest potential, and was from the extracts in ethyl acetate and methanol, which revealed the presence of alkaloids, carbohydrates, flavonoids, quinones, saponins, and tannins as seen in phytochemical screening. The highest inhibition α -glucosidase was the ethyl acetate fraction of leaves with IC_{50} of 0.90 $\mu\text{g/ml}$, which was 270 times more effective than acarbose (positive control). The most potent antioxidant activity was the fraction of leaves and stems of ethyl acetate in DPPH (SC_{50} : 4.70 $\mu\text{g/ml}$ and 3.58 $\mu\text{g/ml}$) and ABTS (SC_{50} : 3.29 $\mu\text{g/ml}$ and 2.27 $\mu\text{g/ml}$).

Keywords: ABTS, *Clusia latipes*, type 2 diabetes mellitus, DPPH and α -glucosidase

INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica que es producida cuando el páncreas no está en la capacidad de producir suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede utilizar eficazmente la insulina que produce. (World Health Organization, 1999, 2016a, 2016c).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), es la forma más común de diabetes, esta se produce por el uso ineficaz de la insulina en el cuerpo, además presenta trastornos de la acción de la insulina y su secreción, característica importante de este tipo de diabetes (World Health Organization, 1999, 2016a).

A nivel mundial se calculó en 2014 el 8.5% de adultos padecían diabetes, de los cuales el 90% presentaban DM2. En la última década, la prevalencia de la diabetes aumentó más rápidamente en los países de bajos recursos sin embargo, en países de altos ingresos causó 1.5 millones de muertes en 2012, además la glucosa superior al nivel normal causó 2.2 millones de muertes adicionales (World Health Organization, 2016a, 2016c).

Un enfoque terapéutico para tratar la diabetes mellitus tipo 2 se basa en suprimir la absorción de glucosa del intestino a través de la inhibición de enzimas hidrolizantes de carbohidratos como la α -glucosidasa (Saltos et al., 2015). La α -glucosidasa en la digestión de los carbohidratos es una enzima clave, cataliza la escisión de los monosacáridos absorbibles, a partir de los disacáridos y oligosacáridos. De esta forma, los inhibidores de la α -glucosidasa reducen la hiperglucemia postprandial ralentizando la digestión de los carbohidratos en los intestinos (Bolen, Feldman, Vassy, Wilson, & Yeh, 2007). Una estrategia de interés para controlar la hiperglucemia postprandial por su bajo costo y baja incidencia de efectos secundarios es el consumo de inhibidores de la α -glucosidasa provenientes de fuentes naturales como las plantas (Chen, Wu, Zou, & Gao, 2016).

Las plantas medicinales son parte fundamental en casi todas las culturas del mundo y se han convertido en fuentes importantes de terapias alternativas, a su vez, hacen uso de sus componentes fitoquímicos o también sirven como modelos para síntesis en elaboración de compuestos con acción farmacológica.

Dentro de la amplia diversidad de especies vegetales en el Ecuador, encontramos la especie *Clusia latipes*, cuyo género es *Clusia* y pertenece a la familia Clusiaceae, este género y familia, se caracteriza por tener una gran variabilidad de actividades biológicas y son una fuente de interés de metabolitos secundarios activos. Reportes

mencionan que poseen actividad antimicrobiana, quimiopreventiva de cáncer, antioxidante (Ferreira et al., 2014), antiinflamatoria, antihepatotóxica, actividad citotóxica de neuroblastoma (Díaz-Carballo et al., 2012) y actividad hipoglucemiante al inhibir la enzima α -glucosidasa (Akinmoladun, Farombi, & Oguntibeju, 2014; Elya, Nurrianti, & Mauldina, 2017).

El presente trabajo denominado: "Estudio fitoquímico y evaluación de las propiedades hipoglucemiantes de *Clusia latipes*", se desarrolló en el Departamento de Química y Ciencia Exactas.

Planteamos los siguientes objetivos específicos.

- Obtener extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de hojas y tallos de *Clusia latipes*.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de hojas y tallos de *Clusia latipes* frente a α -glucosidasa.
- Evaluar la actividad antioxidante mediante ensayos de barrido de radicales de DPPH y ABTS
- Fraccionar los extractos con mayor inhibición frente a α -glucosidasa mediante extracción líquido-líquido y evaluar su potencia inhibitoria frente a α -glucosidasa.
- Determinar cualitativamente los componentes fitoquímicos de los extractos más activos y sus fracciones.
- Aislar metabolitos secundarios de los extractos que presentaron mayor actividad de inhibición sobre α -glucosidasa mediante técnicas cromatográficas.

Para el desarrollo de los objetivos propuestos, el presente trabajo ha sido dividido en tres capítulos. En el primer capítulo se menciona los antecedentes científicos basados en literatura reportada. En el segundo capítulo se hace una descripción de todo el procedimiento experimental realizado en la investigación. En el tercer capítulo se presenta los resultados obtenidos con la respectiva discusión de los mismos. Finalmente se presenta una sección de conclusiones y recomendaciones.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Diabetes mellitus

Es una enfermedad crónica que se produce cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede utilizar de manera eficaz la insulina que produce. La insulina es la hormona reguladora de los niveles de azúcar en la sangre. La hiperglucemia (niveles altos de azúcar en la sangre), es una consecuencia común de la diabetes no controlada y a largo plazo provoca graves daños a muchos de los sistemas del cuerpo, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (World Health Organization, 2016a).

En el 2014, el 8.5% de personas adultas tenían diabetes. En 2012 la diabetes fue la causa directa de 1.5 millones de muertes y la glucosa alta en la sangre fue la causa de otros 2.2 millones de muertes (World Health Organization, 2016c).

Para Ecuador en el año 2014, el número de muertes atribuibles a la glucemia alta causó 1010 muertes en hombres y 1000 muertes en las mujeres entre las edades de 30-69 años, en cambio el número de muertes por diabetes fue de 630 en hombres y 650 en las mujeres entre las mismas edades. En las personas mayores de 70 años, el número de muertes fue de 1350 en los hombres y 2360 en mujeres por glucosa alta en sangre y de 810 en los hombres y 1210 en las mujeres por diabetes (World Health Organization, 2016b).

1.2. Criterios de diagnóstico para diabetes mellitus

Para diagnosticar la diabetes se mide la glucosa en una muestra de sangre la cual se toma al paciente en estado de ayuno o 2 horas después de que haya tomado 75 g de glucosa. También se puede diagnosticar la diabetes midiendo la hemoglobina glicosilada (HbA1c), incluso si no está en ayunas el paciente. La HbA1c refleja la concentración media de glucosa en la sangre en las últimas semanas, en lugar de la concentración de glucosa en sangre en ese momento (reflejada por las mediciones de ayuno y 2 horas de glucosa en sangre mencionadas anteriormente) (World Health Organization, 2011, 2016c). La tabla 1 contiene los criterios de diagnóstico para diabetes y para hiperglicemia intermedia.

Tabla 1. Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud de los criterios de diagnóstico para la diabetes y la hiperglicemia intermedia.

Diabetes	
Glucosa plasmática en ayunas	≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dl)
Glucosa plasmática (2h)*	≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dl)
HbA1c	≥ 6.5%
Intolerancia a la glucosa (IGT)	
Glucosa plasmática en ayunas	< 7.0 mmol/L (126 mg/dl)
Glucosa plasmática (2h)*	≥ 7.8 and < 11.1 mmol/L (140 mg/dl y 200 mg/dl)
Glucosa anormal en ayunas (IGF)	
Glucosa plasmática en ayunas	6.1 a 6.9 mmol/L (110 mg/dl a 125 mg/dl)
Glucosa plasmática (2h)*	< 7.8 mmol/L (140 mg/dl)
Diabetes gestacional (GDM)	
<i>Uno o más de los siguientes:</i>	
Glucosa plasmática en ayunas	5.1–6.9 mmol/L (92–125 mg/dl)
Glucosa plasmática (1h) **	≥ 10.0 mmol/L (180 mg/dl)
Glucosa plasmática (2h)	8.5–11.0 mmol/L (153–199 mg/dl)

* Glucosa plasmática venosa 2 horas después de la ingestión de 75 g de glucosa oral

** Glucosa plasmática venosa 1 hora después de la ingestión de 75 g de glucosa oral

Fuente: (World Health Organization, 2016c)

Elaborado por: Silva, R., 2017

1.3. Clasificación de la diabetes

1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

La diabetes mellitus tipo 1 (anteriormente conocida como insulino dependiente, juvenil o de inicio de la infancia) se caracteriza por la producción de insulina deficiente y requiere una dosis diaria de insulina (World Health Organization, 1999, 2016a). Es una enfermedad crónica, multifactorial y autoinmune que involucra la destrucción progresiva de las células β del páncreas, lo que ocasiona la pérdida de producción de insulina (Todd, 2010).

La polidipsia, la polifagia y la poliuria (es el trío clásico de síntomas asociados con el inicio de la enfermedad), junto con la hiperglucemia, siguen siendo características de diagnóstico en niños y adolescentes, y en menor medida en adultos. Una necesidad inmediata de insulina exógena es también distintivo de la DM1, para la cual se

necesita tratamiento vitalicio. Aún no se conoce claramente sobre la epidemiología de la DM1, la eficacia de las terapias, la comprensión de cómo se desarrolla el trastorno y la prevención o curación de la enfermedad (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014).

El objetivo ideal de la intervención clínica sería prevenir o detener la aparición y progresión de la autoinmunidad, invertir la destrucción de las células β y restaurar el control gluco-metabólico y la homeostasis inmune (Chhabra & Brayman, 2013).

1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La diabetes mellitus tipo 2 (anteriormente denominada no insulino dependiente o de inicio en el adulto) resulta del uso ineficaz de la insulina en el cuerpo (World Health Organization, 1999, 2016a). Este tipo de diabetes es la más común en todo el mundo, y en gran parte es el resultado del exceso de peso corporal, la inactividad física y se asocia a las enfermedades cardiovasculares. (Psallas, 2012; World Health Organization, 2016a). La resistencia a la insulina en el tejido periférico y un defecto secretor de insulina de las células β es característico en este tipo de diabetes (World Health Organization, 1999, 2016c).

Es más común en las mujeres, especialmente con antecedentes de diabetes gestacional (Morgan, 2012; Ramírez-García et al., 2013).

Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero con menor intensidad. La DM2 puede diagnosticarse solo cuando ya tiene varios años de evolución y cuando se presentan complicaciones. Este tipo de diabetes generalmente se presenta en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños (World Health Organization, 2016a).

1.3.3. Diabetes mellitus gestacional (DMG)

La DMG se caracteriza por hiperglucemia presente durante el embarazo y alcanza valores que pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes (World Health Organization, 2013). Sin un diagnóstico previo las mujeres presentan niveles anormales de glucosa en sangre en el embarazo (Barbour, 2003; Yamashita, Shao, & Friedman, 2000).

En un embarazo normal, la hiperplasia pancreática de células β se produce a partir de la estimulación del lactógeno placentario humano y la prolactina, dando como resultado niveles elevados de insulina. La secreción placentaria de hormonas diabéticas, como la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de

corticotropina, el lactógeno placentario y la progesterona, lleva a incrementar la resistencia a la insulina. La ineficacia para superar la resistencia a la insulina del embarazo a pesar de la hiperplasia de células β conduce a la DMG. La DMG puede producir mayores riesgos para la madre y el recién nacido como padecer preeclampsia, pesar más de 4000 gramos al nacer y distocia del hombro. La identificación y tratamiento de DMG es de vital importancia para poder mantener los niveles de glucosa normales (Handwerger & Freemerk, 2000; Mack & Tomich, 2017).

1.3.4. Otros tipos específicos

Los tipos de diabetes mellitus de diversas etiologías conocidas se agrupan para conformar la clasificación llamada "Otros Tipos Específicos". Incluye este grupo a las personas con anomalías genéticas de la función en las células β (este tipo de diabetes se llamaba anteriormente MODY o diabetes de madurez en la juventud) o con defectos de la función de la insulina; personas con enfermedades del páncreas exocrino, como fibrosis quística o pancreatitis; personas con disfunción asociada con otras endocrinopatías (por ejemplo, acromegalia); y las personas con disfunción pancreática causada por medicamentos, productos químicos o enfermedades infecciosas, estas comprenden menos del 10% de los casos de DM (Baynest, 2015).

1.4. Daño oxidativo y diabetes mellitus

El estrés oxidativo es una condición de desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (EOR) y especies de nitrógeno reactivo (ENR) como el óxido nítrico y los radicales peroxinitrito y el nivel de defensa antioxidante (Halliwell, 1996; Kunwar & Priyadarsini, 2011).

La formación incontrolada de EOR y su acumulación pueden causar estrés oxidativo en las células. Por lo tanto, las células utilizan mecanismos de defensa para evitar el daño oxidativo. Estos incluyen, las defensas antioxidantes para conservar el control sobre la generación de EOR. Los antioxidantes donan sus electrones a EOR y neutralizan sus efectos adversos (Cohen & Nyska, 2002).

El estrés oxidativo es un factor de importancia en la patogénesis de muchas enfermedades (Brownlee, 2001; Furukawa et al., 2004). En la condición diabética, el estrés oxidativo afecta la captación de glucosa en el músculo y disminuye la secreción de insulina de las células β del páncreas (Furukawa et al., 2004; Maddux et al., 2001).

El aumento de la acumulación intracelular de glucosa y lípidos provoca una sobreproducción de EOR principalmente a través de la cadena de transporte de

electrones mitocondriales. Estos procesos son conocidos por suspender la acción metabólica de la insulina. Además, la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) son constituyentes del estrés oxidativo en la diabetes mellitus (El-Bahr, 2013).

1.5. Tratamiento de la diabetes mellitus

Los carbohidratos en la dieta se hidrolizan en monosacáridos y luego se absorben a través del intestino por un sistema de transporte transepitelial (Baldea, Martineau, Benhaddou-Andaloussi, Arnason, Lévy, & Haddad, 2010).

La α -glucosida es una de las enzimas claves en la digestión de almidón, degrada los disacáridos en monosacáridos, produciendo aumento en la velocidad de absorción de glucosa. Se ha demostrado que el nivel sostenido de glucosa fisiológica resultante de la asimilación excesiva de glucosa es tóxico para las células β , generando deterioro del control de la insulina (Giaccari, Sorice, & Muscogiuri, 2009).

El continuo daño del control endocrino empeora los problemas metabólicos, lo que conlleva a la alteración de las funciones de las enzimas de la glucólisis y la gluconeogénesis, provocando el deterioro del uso periférico de la glucosa aumentando la producción de glucosa hepática (Pari & Srinivasan, 2010).

Se considera que la inhibición de la hidrólisis del almidón y la absorción de glucosa en el intestino delgado, la regulación de las enzimas clave responsables del metabolismo de los carbohidratos en el hígado y la restauración de las células β destruidas en el páncreas pueden ser estrategias útiles para reducir la glucemia en sangre en personas con diabetes (Li, Ji, Zhong, Lv, & Lin, 2013).

1.5.1. Fármacos antidiabéticos

La hiperglucemia persistente provocada por la resistencia de la insulina produce problemas vasculares en la DM2. Por este motivo el objetivo principal para el tratamiento de la DM2 es reducir los niveles de glucosa presentes en el plasma sanguíneo. Se conoce varias estrategias farmacológicas para conseguir reducir los niveles de glucosa; sin embargo, debido a los efectos secundarios no deseados se han convertido en una limitación importante, por lo que hay un aumento de la demanda para desarrollar nuevas clases de medicamentos para lograr disminuir la glucosa en la sangre y complementar eficazmente las terapias conocidas (Das et al.,

2014; Patil, Koli, Patil, & Phatak, 2012). En la Tabla 2 se muestra los mecanismos de acción y los efectos secundarios de algunos fármacos.

Tabla 2. Mecanismos de acción y efectos secundarios de algunos fármacos utilizados en la diabetes mellitus tipo 2.

Clase de fármaco	Sitio de acción	Mecanismo de acción y efecto	Efecto secundarios
<p>Sulfonilureas:</p> <p><i>Glibenclamida, Glipizida, Glimepirida.</i></p>	Células β - pancreáticas	<p>Incremento de la secreción de la insulina.</p> <p>Reducción de la HbA1c (1.5-2 %)</p>	<p>Generalmente bien tolerado. Efectos secundarios graves: hipoglucemia, hipersensibilidad dermatológica, molestias gastrointestinales, síntomas vasomotores (sofocos y sudores nocturnos)</p>
<p>No sulfonilureas (secretoras de insulina)</p> <p>Repaglinida, Nateglinida</p>	Células β - pancreáticas	<p>Incremento de la secreción de la insulina.</p> <p>Reducción de la HbA1c (0.7-1.3 %)</p>	Hipoglucemia
<p>Inhibidores de α-amilasa y α-glucosidasa</p> <p>Acarbosa, Miglitol</p>	Intestino delgado	<p>Disminución de la absorción de carbohidratos intestinales.</p> <p>Reducción de la HbA1c (0.8 %)</p>	Trastornos gastrointestinales, dolor abdominal, diarrea y flatulencia
<p>Tiazolidinedionas</p> <p>Rosiglitazona, Pioglitazona Troglitazona</p>	Tracto gastrointestinal	<p>Aumento de la utilización de glucosa periférica.</p> <p>Reducción de HbA1c 1,5%.</p>	<p>Generalmente bien tolerado. Efecto adverso más grave: Aumento de las enzimas hepáticas, lesión hepatocelular idiopática, ictericia reversible.</p>

Tabla 2. Mecanismos de acción y efectos secundarios de algunos fármacos utilizados en la diabetes mellitus tipo 2 (continuación)

<p>Análogos del péptido-1 (GLP-1) similar al glucagón</p> <p>Exenatida Liraglutida</p>	<p>Receptor GLP-1</p>	<p>Secreción estimulada de insulina</p>	<p>Trastornos gastrointestinales, náuseas, dolor abdominal, pérdida de peso</p>
<p>Inhibidores de la Dipeptidil peptidasa IV</p> <p>Vildagliptina Sitagliptina Saxagliptina</p>	<p>DPP-4</p>	<p>Aumento de la concentración sanguínea de la incretina GLP-1</p>	<p>Mayor riesgo de infección y dolor de cabeza.</p>

Fuente: (Derosa & Sibilla, 2007; Gerich, 1989; Kavishankar, Lakshmedevi, Murthy, Prakash, & Niranjana, 2011).

Elaborado por: Silva, R., 2017

1.6. Productos naturales

Los productos naturales se han convertido en la fuente más exitosa de posibles derivaciones de fármacos (Mishra & Tiwari, 2011; Rey-Ladino, Ross, Cripps, McManus, & Quinn, 2011). Los productos naturales proporcionan una diversidad estructural única en comparación con la química combinatoria estándar, presentan oportunidades para lograr descubrir nuevos compuestos (Dias, Urban, & Roessner, 2012). Durante los años 2005 al 2010, se aprobaron 19 fármacos relacionados con productos naturales, los cuales son usados con fines terapéuticos: contra cáncer, antidiabético, para tratar enfermedades infecciosas, cardiovasculares, inmunológicas, entre otros (Harvey, 2008; Mishra & Tiwari, 2011). Debido a que se ha evaluado menos del 10% de la biodiversidad mundial en cuanto a la actividad biológica, muchos metabolitos secundarios útiles esperan su descubrimiento, siendo un desafío la forma de acceder a esta diversidad química natural (Newman & Cragg, 2016).

1.7. Plantas medicinales

El uso de productos naturales como medicamentos ha sido descrito a lo largo de la historia en forma de medicinas tradicionales, remedios, pociones y aceites, muchos de estos productos naturales bioactivos aún no han sido identificados. La fuente dominante de conocimiento de los usos de productos naturales de las plantas medicinales es el resultado del experimento del hombre por ensayo y error durante cientos de siglos a través de pruebas de palatabilidad, buscando alimentos disponibles

para el tratamiento de enfermedades (Dias et al., 2012; Hicks, 1966; Kinghorn, Pan, Fletcher, & Chai, 2011).

Las plantas medicinales se han convertido en un recurso de importancia para el estudio de diferentes actividades biológicas, como el efecto antidiabético y antioxidante. Varios investigadores han reportado estos dos tipos de actividades biológicas para *Adansonia digitata*, *Madhuca indica*, *Crataeva nurvala*, *Polyalthia longifolia* y *Triplochiton scleroxylon* (Choudhari, Suryavanshi, Ingle, & Kaul-Ghanekar, 2011; Gayathri & Jeyanthi, 2012; Prohp & Onoagbe, 2011; Sikarwar & Patil, 2010; Tanko et al., 2008).

1.8. Metabolitos secundarios

La biosíntesis y descomposición de grasas, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos son esenciales para todos los organismos vivos, lo cual se conoce como metabolismo primario los compuestos implicados en estas vías son conocidos como "metabolitos primarios" (Dewick, 2002). El mecanismo por el cual un organismo biosintetiza compuestos llamados metabolitos secundarios a menudo es único en un organismo o es una expresión de la individualidad de una especie y se conoce como "metabolismo secundario" (Dewick, 2002; Maplestone, Stone, & Williams, 1992; Pengelly, 2004). Los metabolitos secundarios se encuentran distribuidos especialmente en plantas, pero acorde al *Phyllum* varían considerablemente su estructura (García, 2004).

Generalmente los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un organismo y se producen satisfactoriamente como resultado de que el organismo se adapte a su entorno o se produzcan para actuar como un posible mecanismo de defensa contra depredadores o para ayudar a la supervivencia del organismo (Colegate & Molyneux, 2008; Dewick, 2002).

Hasta el 50% de los medicamentos aprobados durante los últimos 30 años son, directa o indirectamente, de productos naturales, la utilidad de los metabolitos secundarios y continúan siendo una fuente invaluable de estructuras activas novedosas (Newman & Cragg, 2012).

A partir de fuentes naturales se han logrado aislar varios metabolitos secundarios con efecto antidiabético, tales como vasicinol, vasicina (*Adhatoda vasica*) (Gao et al., 2008), andrografólido (*Andrographis paniculata*), galegina (*Galega officinalis*) (Rios, Francini, & Schinella, 2015) curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina (*Curcuma longa*) (Du et al., 2006), otro compuesto de origen natural que ha sido

aislado es voglibosa (*Streptomyces hygroscopicus* variedad Limonones), el cual es comercializado como medicamento para tratar la diabetes mellitus cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la α -glucosidasa. (Dabhi, Bhatt, & Shah, 2013; Newman & Cragg, 2016).

1.9. Género *Clusia*

El género *Clusia* está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de América Central y América del Sur (Moura, Perazzo, & Maistro, 2008). Las especies de esta familia se caracterizan por presentar látex en sus tejidos (Mangas Marín, Montes de Oca Porto, Bello Alarcón, & Nival Vázquez, 2008; Moura et al., 2008) y dentro del género se encuentran árboles, arbustos y hemi-epífitas, siendo la mayoría dioicas (Vlasáková, Kalinová, Gustafsson, & Teichert, 2008).

En Ecuador se registran 18198 especies de flora, 17748 son nativas y 4500 endémicas (León et al., 2011) , dentro de las cuales se encuentra la familia Clusiaceae, cuyo género más representativo es *Clusia*, la mayoría de especies se encuentran distribuidas especialmente en el sur del Ecuador (Gustafsson, Winter, & Bittrich, 2007), donde el interés por las plantas medicinales por pueblos aborígenes está aumentando (Armijos, 2012).

En las especies de este género se ha encontrado una gran variedad de actividades biológicas, tales como: actividad antimicrobiana de amplio espectro, quimiopreventiva de cáncer, antioxidante (Ferreira et al., 2014), antiinflamatoria, antihepatotóxica, actividad inhibidora del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Camara, Shepherd, & Joaquim, 2002; Huerta-Reyes et al., 2004; Mangas Marín et al., 2008) y actividad citotóxica en el neuroblastoma (Díaz-Carballo et al., 2012),

En el género *Clusia*, se han identificado triterpenoides como α y β amirinas, α y β friedelinol, friedelina; aplotaxeno, ácido oleanólico y el (17 α , 20R)-dammara-12,24-dien-3 β -ol que fue el primer terpenoide obtenido naturalmente con un esqueleto de este tipo (Mangas Marín et al., 2008). Así mismo se ha aislado 3-O- α -L-rhamnopiranosilquercetina, 3-O- α -L-rhamnopiranosilkaempferol, 4-hidroxi-5,5-dimetildihidrofuran-2-ona, 2-dimetil-3,5-dihidroxi-7-(4-hidroxifenil), ácido betulínico, ácido protocatechúico, lironiresinol y un nuevo 2,2-dimetil-3, cromano de bifenilo 5-dihidroxi-7- (4-hidroxifenil) (Ribeiro, Ferraz, Guedes, Martins, & Cruz, 2011).

Al ser el género *Clusia* una fuente con gran variabilidad biológica se convierte en un recurso interesante de metabolitos secundarios activos, por lo que puede proveer compuestos activos para usarse en diversos fines medicinales

1.10. *Clusia latipes*

Comúnmente conocida como duco, es un árbol que se desarrolla principalmente en zonas tropicales. Es nativa de Ecuador y se la encuentra ubicada entre los cantones de Quilanga y Gonzanamá en la provincia de Loja (Jørgensen & León-Yáñez, 1999). En la figura 1 se muestra las partes aéreas de *Clusia latipes*.



Figura 1. Especie *Clusia latipes*
Fuente: Silva, R., 2017
Elaborado por: Silva, R., 2017

En la Tabla 3 se muestra la taxonomía de la especie.

Tabla 3. Taxonomía de *Clusia latipes*.

Clasificación científica	
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Theales
Familia	Clusiaceae
Género	<i>Clusia</i>
Epíteto específico	<i>latipes</i>
Nombre científico	<i>Clusia latipes</i>

Fuente: ("Tropicos | Name - *Clusia latipes* Planch. & Triana," n.d.)
Elaborado por: Silva, R., 2017

De la especie *Clusia latipes* se ha encontrado reportes previos de efecto citotóxico de los extractos de hojas en hexano, acetato de etilo y metanol sobre células humanas de cáncer de próstata (PC-3), células de cáncer de colon (RKO), células de astrocitoma (D-384) y células de cáncer de mama (MCF-7) (Bailón-Moscoso et al., 2016).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1. Métodos

En la Figura 2 se muestra el esquema de la metodología utilizada en el presente trabajo.

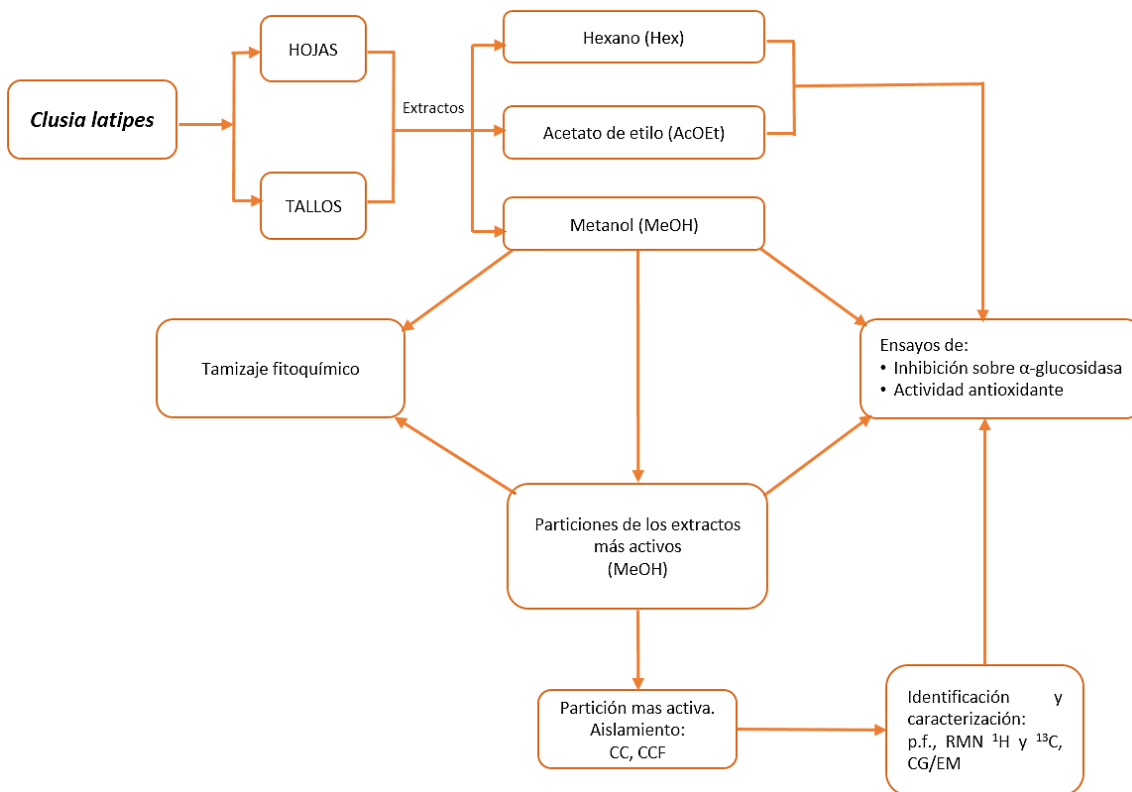


Figura 2. Esquema de la metodología desarrollada en el presente trabajo.

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

2.2. Materia vegetal

Se recolectó 10.60 kg de hojas y tallos de la especie *C. latipes*, entre la vía Gonzanamá – Quilanga (latitud 4°57'46" S, longitud 77°11'46" O, 2300 m.s.n.m.) en la provincia de Loja, Ecuador, y la especie fue identificada por la Ph.D. Fani Tinitana. Se depositó una muestra (PPN-CI 002) en el Herbario del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

El material vegetal fue secado a 30 °C durante siete días en un secadero de bandejas con flujo de aire hasta peso constante.

En la Figura 3 se muestra el lugar de recolección.



Figura 3. Mapa del sitio de recolección de la especie *Clusia latipes* entre los cantones Gonzanamá y Quilanga.

Fuente: (GAD Gonzanamá, n.d.)

Elaborado por: Silva, R., 2017

2.3. Obtención de los extractos

Se pulverizaron manualmente las hojas (1540 g) y tallos (1608 g), luego se realizó maceración estática a temperatura ambiente en hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) por tres ocasiones durante 24 horas por cada disolvente. Los extractos fueron concentrados a presión reducida y a 35 °C en rotavapor (Buchi® R-210) para obtener un total de seis extractos.

Se determinó el rendimiento de los extractos en relación del peso del extracto obtenido con el peso de la materia vegetal seca.

A los seis extractos obtenidos se les evaluó la capacidad inhibidora sobre α -glucosidasa.

2.4. Ensayo de inhibición sobre α -glucosidasa

Se determinó la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa usando una placa de 96 pocillos y *p*-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*NPG, SIGMA N1377) como sustrato, de acuerdo con el método descrito por Tao et al., (2013) con ligeras modificaciones.

De cada muestra se disolvió 10 mg en 1 ml de una mezcla de metanol:H₂O en una relación 1:1. En caso de inhibición completa, se hicieron diluciones de la solución de extracto en PBS (SIGMA-P4417).

Primero, 75 µL de PBS (SIGMA-P4417) se mezcló con 5 µL de la muestra y 20 µL de la solución de la enzima (SIGMA G5003, 0.15 U/mL en PBS pH 7.4), a continuación, se preincubó a 37 °C durante 5 minutos antes de la iniciación de la reacción mediante la adición del sustrato. Después de la preincubación, se añadió 20 µL de *p*NPG (5 mM en buffer fosfato, pH 7.4) y después se incubó a 37 °C. La cantidad de *p*-Nitrofenol (*p*-NP) liberado se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK ®) a 405 nm durante 60 minutos, registrando la absorbancia cada 5 minutos. El desarrollo del método y sus respectivos controles se puede visualizar en el Anexo 1.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición por medio de la fórmula descrita por Choi et al. (2015):

$$\text{inhibición (\%)} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100$$

Donde, A_o es la absorbancia registrada por la actividad enzimática sin inhibidor (control) y A_s es la absorbancia registrada para la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra). El valor de CI_{50} se calculó mediante el modelo de ajuste de la curva en el programa estadístico IBM-SPSS (ESTADÍSTICA 20). La acarbosa se utilizó como control positivo a una concentración de 5 mg/mL.

A los extractos con mayor actividad de inhibición sobre la α -glucosidasa se les hizo particiones (fracciones) mediante extracción líquido-líquido, a las mismas, también se evaluó su capacidad de inhibición de la α -glucosidasa.

2.5. Actividad antioxidante

De todos los extractos y fracciones obtenidas se evaluó su capacidad antioxidante mediante ensayos colorimétricos con radicales de 2,2-difeneil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS).

2.5.1. Curva de calibración

Se estableció la curva de calibración para cada uno de los métodos, se preparó una solución madre de 1000 µM de Trolox (Sigma, 238813-5G, St Louis, MO) en metanol (Merk, 64271, Billerica, MA.), y se preparó siete soluciones de trabajo (Tabla 4).

Tabla 4. Estándares para el análisis de actividad antioxidante (DPPH y ABTS).

Estándar	Alícuota de sol. Madre (µl)	Aforo (MeOH-µl)	Concentración Final (µM)	Concentración en el ensayo (µM)
1	25	975	25	2,5
2	50	950	50	5
3	100	900	100	10
4	200	800	200	20
5	300	700	300	30
6	400	600	400	40
7	500	500	500	50

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Con los datos de obtenidos se construyó una gráfica de concentración de Trolox vs absorbancia obteniéndose la recta de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), cuyo valor fue mayor a 0,995. Los ensayos de barrido de radicales de DPPH Y ABTS se describen a continuación.

2.5.2. Ensayo de barrido de radicales de DPPH

Este método se caracteriza por medir los compuestos de naturaleza lipófila. La metodología aplicada fue la descrita por Cheng, Moore, & Yu, (2006); Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, (2006), con ligeras modificaciones.

Se preparó una solución madre de DPPH en metanol (0.625 mM), de la cual se elaboró la solución de trabajo. Una alícuota de la solución madre se tomó y se diluyó en metanol (vol. aprox. 2 ml solución madre más 10 ml de MeOH) hasta ajustar a una absorbancia de 1.1 ± 0.02 . Si el valor de la absorbancia es inferior se añade más volumen de la solución madre de DPPH, en caso contrario, si el valor de absorbancia es superior se añade MeOH hasta alcanzar el valor de la absorbancia requerido.

Para el ensayo se colocó 270 µL de la solución de trabajo más 30 µL de la muestra a analizar. Se hizo un control del máximo de absorbancia de la solución de trabajo (DPPH), para ello se empleó 270 µl de DPPH y se añadió 30 µl de MeOH. Para el estándar se añadió 270 µl de solución de trabajo más 30 µL de estándar de µM de Trolox (Tabla 4). Como blanco se utilizó 300 µl de MeOH. En cuanto a la curva de calibración, se añadió 30 µl de cada uno de los estándares (Tabla 4).

El ensayo se realizó por triplicado en microplaca de 96 pocillos (TrueLine TR5003) y se incubó a 20 °C durante 60 min, la absorbancia de cada solución se determinó a 515 nm usando un lector de microplacas (BioTek, EPOCH 2).

2.5.3. Cálculo de resultados

A partir de la ecuación $y=mx + b$ de la recta de regresión de la curva de calibración de Trolox, las absorbancias obtenidas de los tres ensayos se interpolan para hallar los correspondientes valores de:

- μmol equivalente de Trolox por gramo de muestra

Se calculó SC_{50} (actividad de barrido de radicales), que indica la cantidad necesaria de la muestra (antioxidante) para reducir el 50% de los radicales de DPPH y ABTS; para ello, se calcula el porcentaje de reducción (%R) con la fórmula descrita por Cheng et al. (2006)

$$\%R = [1 - (M)(BLK)/(CTRL)(BLK)] \times 100$$

Donde:

M= Absorbancia de la muestra

BLK= Absorbancia del blanco

CTRL= Absorbancia de la solución de trabajo

2.5.4. Ensayo de barrido de radicales de ABTS

La metodología seguida para este método fue la descrita por Thaipong et al. (2006), con algunas modificaciones.

Se preparó una solución madre (1:1) de ABTS (7.4 mM) y persulfato de potasio (2.6 mM) en agua destilada, la cual se dejó reaccionar durante 16 horas y protegida de la luz en agitación constante (200 r.p.m.) para obtener el radical $ABTS^{\bullet+}$. Se preparó la solución de trabajo tomando una alícuota de solución madre y se diluyó en metanol (vol. aprox. 0,7 ml solución madre más 17 ml de MeOH) hasta ajustar a una absorbancia de 1.1 ± 0.02 . Si al valor de absorbancia se encuentra por debajo de valor indicado se añade más volumen de la solución madre ($ABTS^{\bullet+}$); en caso contrario, si el valor de absorbancia es más alto del mencionado anteriormente se añade MeOH hasta alcanzar la absorbancia deseada.

Para realizar el ensayo se inició preparando 270 μl de solución de trabajo más 30 μl de la muestra a ensayar. Para obtener el estándar se usó 270 μl de solución de trabajo y se añadió a 30 μl de estándar de μM de Trolox (Tabla 4). El blanco consiste en 300 μl

de MeOH. La curva de calibración se realizó añadiendo 30 μ L de cada uno de los estándares.

El ensayo se realizó por triplicado en microplaca de 96 pocillos (TrueLine TR5003 96 Well) y se monitoreó por 1 hora a una longitud de onda de 734 nm en un lector de microplaca (BioTech, EPOCH 2) a una temperatura de 20 °C. Los resultados obtenidos se reportan en μ mol equivalente de Trolox por gramo de muestra.

2.6. Extracción líquido-líquido

A los extractos más activos se realizó particiones mediante extracción líquido-líquido (Figura 4) con disolventes inmiscibles entre ellos y se siguió protocolos reportados en literatura (Kupchan & Tsou, 1973; Muhit, Tareq, Apu, Basak, & Islam, 2010; Vanwagenen et al., 1993), con ligeras modificaciones.

Los extractos metanólicos de hojas y tallos se los disolvieron por separado en metanol:agua (MeOH:H₂O). La solución obtenida fue fraccionada sucesivamente utilizando disolventes en polaridad creciente, iniciando con hexano (Hex), diclorometano (DCM) y acetato de etilo (AcOEt). Todas las ocho fracciones fueron evaporadas hasta sequedad mediante rotavapor (Buchi® R-210) a presión reducida y fue evaluada la actividad de inhibición sobre α -glucosidasa.

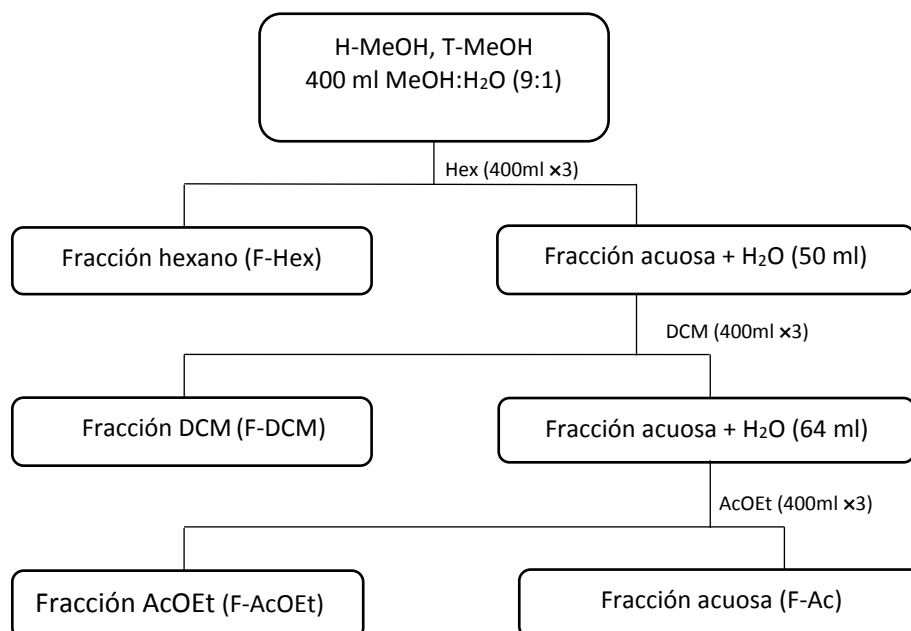


Figura 4. Esquema de fraccionamiento de los extracto metanólicos de hojas y tallos.

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

2.7. Tamizaje fitoquímico

A los extractos más activos y sus particiones se les realizó diferentes ensayos fitoquímicos.

Se realizaron pruebas fitoquímicas para detectar de forma cualitativa la presencia de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides y xantonas, quinonas, saponinas, taninos, terpenoides y esteroides) e hidratos de carbono y grasas en los extractos y fracciones usando procedimientos estándar. El resultado de las pruebas del tamizaje fitoquímico en extractos y fracciones reveló la presencia o ausencia de metabolitos secundarios principales y otros fitoquímicos basados en la presencia (+) o ausencia (-) de cambios de color o precipitados esperados según corresponda el ensayo. Las pruebas realizadas se basaron en la literatura reportada (Mandal, Mandal, & Das, 2015; Miranda & Cuellar, 2001).

2.8. Cromatografía en columna

La fracción más activa fue eluida mediante cromatografía en columna (CC).

Para el empaquetado de la columna se hizo relación muestra-silica gel (1:20, 1:100 y 1:200), cuyas proporciones se usaron en función a la cantidad de muestra a eluir y a su perfil cromatográfico de fraccionamiento.

La fracción de acetato de etilo del extracto de metanol hojas primero se eluyó de forma isocrática en silica gel fase inversa C-18 (40-63 μm) utilizando la mezcla de disolventes metanol-agua (1:1), luego las fracciones con mejor perfil cromatográfico fueron eluidas en silica gel fase normal (63-200 μm) donde se utilizó como fase móvil disolventes en polaridad creciente, Hex, DCM, AcOEt, MeOH, H₂O y sus mezclas.

2.9. Cromatografía en capa fina

A todas las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna se evaluaron el perfil cromatográfico con cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de aluminio cubiertas de silica gel fase normal (60 F₂₅₄, Merck) empleando como eluyente disolventes como Hex, AcOEt, MeOH, H₂O y sus mezclas, también se utilizó cromatografía en capa fina en placas de aluminio cubiertas de silica gel fase inversa (60 RP-18 F₂₅₄S, Merck), luego se observó en luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) y se reveló con solución de ácido sulfúrico y vainillina. Todas las separaciones con perfil cromatográfico similar se unieron y se eliminó el disolvente en el rotavapor.

2.10. Purificación e identificación

Las fracciones con mejor perfil cromatográfico obtenidas de la fracción más activa (H-MeOH-F-AcOEt) en inhibición de α -glucosidasa se purificaron con cromatografía en columna, por polaridad y cromatografía en capa fina preparativa fase normal (Merck).

A los compuestos aislados se les determinó punto de fusión en el equipo de Fisher Johns, sin corrección de temperaturas. Se identificaron mediante RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 MHz-Premium Schelded, se usó tetrametilsilano como referencia interna y los desplazamientos químicos fueron expresados en partes por millón (ppm), y las constantes de acoplamiento (J) se informaron en (Hz). Los espectros de masas fueron determinados en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) y con las columnas cromatográficas DB-5MS (no polar) y HP-INNOWAX (polar) para detectar, identificar y cuantificar compuestos como semi-volátiles, alcaloides, ésteres metílicos de ácidos grasos, compuestos halogenados, etc. y alcoholes, ácidos orgánicos libres, aceites esenciales, fragancias, etc., respectivamente (Agilent Technologies, n.d.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Rendimiento de los extractos obtenidos de *Clusia latipes*

En la Tabla 5 se presenta los pesos de los extractos obtenidos y sus rendimientos.

Tabla 5. Pesos y rendimiento de extractos.

Materia vegetal	Extractos	Peso (g)	Rendimiento (%)
HOJAS (1540 g)	Hexano	71.00	4.61
	Acetato de etilo	28.52	1.85
	Metanol	283.87	18.43
TALLOS (1608 g)	Hexano	39.44	2.56
	Acetato de etilo	44.23	2.87
	Metanol	117.23	7.61

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Los extractos de metanol de hojas y tallos presentaron mayor rendimiento con 18.43% y 7.61 %, respectivamente.

3.2. Ensayo de inhibición de α -glucosidasa

Se utilizó como control positivo la acarbosa, la cual presento una CI_{50} de 377 μ M (243,39 μ g/ml), misma que mostró un valor similar a lo reportado por Feng et al. (2011).

3.2.1. Inhibición de α -glucosidasa de los extractos obtenidos de *Clusia latipes*

Los valores de CI_{50} de α -glucosidasa de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de hojas y tallos de *C. latipes* se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Inhibición de α -glucosidasa de los extractos de hojas y tallos de *Clusia latipes*.

Estructura morfológica	Extractos	CI_{50} (μ g/ml)
HOJAS	Hexano	231.00 \pm 0.75
	Acetato de etilo	33.96 \pm 1.15
	Metanol	5.01 \pm 0.75
TALLOS	Hexano	177.40 \pm 0.48
	Acetato de etilo	5.80 \pm 0.02
	Metanol	2.30 \pm 0.15

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

La actividad inhibitoria más baja se observó en los extractos de hexano de hojas con CI_{50} de 231.00 $\mu\text{g/ml}$ y el extracto de hexano de tallos con CI_{50} de 177.40 $\mu\text{g/ml}$. La actividad inhibidora de α -glucosidasa (CI_{50}) aumentó en extractos extraídos con disolvente polar (MeOH) y medianamente polar (AcOEt); estos extractos se pueden considerar que tienen un efecto inhibitor significativo al presentar una CI_{50} por debajo de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Trinh, Staerk, & Jäger, 2016).

Los muestras que presentaron resultados bastante interesantes y que mostraron la más alta actividad, fueron los extractos metanólicos de hojas y tallos, con valores de CI_{50} de 5.80 $\mu\text{g/ml}$ y 2.30 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A partir de estos extractos se obtuvo fracciones mediante extracción líquido-líquido a las cuales también se les evaluó la actividad inhibidora de la α -glucosidasa.

3.3. Extracción líquido-líquido

A partir de los extractos más activos (metanólico de hojas y tallos), se obtuvo ocho particiones (fracciones). En la Tabla 7 se muestra los pesos y rendimientos obtenidos de las fracciones de los extractos metanólicos de hojas y tallos.

Tabla 7. Pesos y rendimientos de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos.

Estructura morfológica	Particiones de los extractos metanólicos	Peso (g)	Rendimiento (%)
HOJAS	Hexano	0.59	2.95
	Diclorometano	5.21	26.05
	Acetato de etilo	1.82	9.10
	Acuoso	11.15	55.75
TALLOS	Hexano	0.19	0.95
	Diclorometano	10.28	51.40
	Acetato de etilo	2.02	10.10
	Acuoso	6.37	31.85

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Se logró obtener satisfactoriamente las fracciones de cada uno de los extractos metanólicos, obteniendo el menor rendimiento las fracciones hexánicas tanto de hojas (2.95 %) y tallos (0.95 %), las que presentaron un mayor rendimiento fue la fracción acuosa de hojas y la fracción de diclorometano de tallos con un porcentaje de 55.75% y 51.40%, respectivamente.

3.3.1. Inhibición de α -glucosidasa de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos

La Tabla 8 contiene la actividad inhibidora de las fracciones (particiones) obtenidas de los extractos metanólicos.

Tabla 8. Inhibición de α -glucosidasa de las fracciones (particiones) obtenidas de los extractos de metanólicos de hojas y tallos.

Estructura morfológica	Particiones de los extractos metanólicos	CI ₅₀ (µg/ml)
HOJAS	Hexano	102.80 ± 0.43
	Diclorometano	174.96 ± 1.02
	Acetato de etilo	0.90 ± 0.12
	Acuosa	3.04 ± 0.27
TALLOS	Hexano	128.98 ± 0.71
	Diclorometano	110.85 ± 0.10
	Acetato de etilo	3.88 ± 0.81
	Acuosa	2.98 ± 0.13

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Todas las fracciones obtenidas a partir de los extractos más activos (MeOH hojas y MeOH tallos) también fueron activas (CI₅₀), presentando una mejor actividad que el conocido inhibidor comercial de α -glucosidasa (CI₅₀ acarbosa: 243,39 µg/ml).

Los valores de CI₅₀ de las fracciones de hexano y diclorometano de hojas y tallos fueron los más altos (CI₅₀: 102,80 µg/ml a 174,96 µg/ml). Las fracciones de acetato de etilo y acuosa de hojas y tallos mostraron mayor potencia como inhibidor de α -glucosidasa con un valor de IC₅₀ de 0,90 µg/ml a 3,88 µg/ml.

La actividad inhibitoria más alta se obtuvo a partir de la fracción de hojas de acetato de etilo con un valor de CI₅₀ de 0,90 µg/ml, esta fracción resultó ser 270 veces más eficaz que la acarbosa (control positivo), siendo sin embargo menos eficiente que el extracto de acetato de etilo de la corteza de *Garcinia xanthochymus* (CI₅₀: 0,3 µg/ml), especie del género Clusiaceae (Nguyen et al., 2017).

La fracción de acetato de etilo de las hojas evidenció una actividad mucho más fuerte que la descrita en la literatura para extractos de acetato de etilo de hojas de las especies *Garcinia hombroniana* (CI₅₀: 16.37 µg/ml) y *Garcinia fruticosa* (CI₅₀: 25.31 µg/ml) (Elya et al., 2017; Triadisti & Rani Sauriasari, 2017), esta actividad

también fue mayor que la de los extractos metanólicos de fruto (CI₅₀: 19.26 µg/ml) y de semilla (CI₅₀: 24.87 µg/ml) de la especie *Garcinia pedunculata* (Sarma, Kumari, Elancheran, Deori, & Devi, 2016) y la de los extractos etanólicos de hojas de las especies *Garcinia bancana*, *Garcinia kydia*, *Garcinia rigida*, *Calophyllum tomentosum* y *Garcinia daedalanthera* con valores de CI₅₀ de 22.41 µg/ml, 3.88 µg/ml, 24.48 µg/ml, 15.83 µg/ml y 2.33 µg/ml, respectivamente (Akinmoladun et al., 2014; Elya et al., 2012).

3.4. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos y las fracciones (particiones) se evaluó mediante ensayos de barrido de radicales de DPPH y ABTS.

Las absorbancias obtenidas por cada muestra se interpolan y se reportan como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) por gramo de muestra, los valores calculados están expresados como µmol ET/g.

3.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de barrido de radicales de DPPH y ABTS de los extractos de *Clusia latipes*

Los datos de la capacidad antioxidante de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de *Clusia latipes* se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Barrido de radicales de DPPH y ABTS de extractos de hojas y tallos de *Clusia latipes*.

Estructura morfológica	Extractos	DPPH	ABTS
		TEAC ^a µmol ET/g	TEAC ^a µmol ET/g
HOJAS	Hexano	10.03 ± 0.34	14.63 ± 1.49
	Acetato de etilo	5.77 ± 0.08	13.18 ± 0.91
	Metanol	846.63 ± 0.6	1172.39 ± 16.37
TALLOS	Hexano	6.97 ± 0.26	13.70 ± 0.57
	Acetato de etilo	10.22 ± 0.24	24.07 ± 1.19
	Metanol	338.27 ± 7.81	475.83 ± 8.28

^aTEAC = capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

A los seis extractos de tallos y hojas de *C. latipes* se evaluó su capacidad antioxidante de DPPH y ABTS en $\mu\text{mol ET/g}$ (micromol equivalente a Trolox por gramo de muestra). Los extractos de hexano y acetato de etilo de hojas y tallos mostraron la menor actividad antioxidante para los dos ensayos, sin embargo los extractos metanólicos presentaron una mejor actividad antioxidante para DPPH (846.63 y 338.27 $\mu\text{mol ET/g}$) y ABTS (1172.39 y 475.83 $\mu\text{mol ET/g}$) para hojas y tallos.

3.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de barrido de radicales de DPPH y ABTS de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos

En la Tabla 10 se presentan los valores en $\mu\text{mol ET/g}$ de las fracciones (particiones) obtenidas de los extractos metanólicos.

Tabla 10. Barrido de radicales de DPPH y ABTS de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *Clusia latipes*.

Estructura morfológica	Particiones de los extractos metanólicos	DPPH	ABTS
		TEAC ^a $\mu\text{mol ET/g}$	TEAC ^a $\mu\text{mol ET/g}$
HOJAS	Hexano	6.43 \pm 0.05	10.82 \pm 0.28
	Diclorometano	632.15 \pm 5.07	2136.38 \pm 16.63
	Acetato de etilo	566.77 \pm 6.01	1385.22 \pm 0.86
	Acuosa	2911.76 \pm 27.63	2864.93 \pm 7.89
TALLOS	Hexano	2.31 \pm 0.03	3.54 \pm 0.10
	Diclorometano	1537.21 \pm 22.93	4533.15 \pm 43.67
	Acetato de etilo	791.12 \pm 5.78	1711.91 \pm 17.50
	Acuosa	2188.12 \pm 22.55	1938.89 \pm 4.51

^aTEAC = capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Las fracciones (particiones) de hexano de hojas y tallos presentaron una baja actividad antioxidante para DPPH, pero para las particiones obtenidas con disolventes de mayor polaridad su actividad antioxidante aumentó; las particiones de diclorometano y acetato de etilo de hojas y tallos mostraron su actividad antioxidante entre 566.77 a 1537.21 $\mu\text{mol ET/g}$ y las particiones acuosas de hojas y tallos fueron aún más

efectivas que las de diclorometano y acetato de etilo con valores de TEAC de 2911.76 $\mu\text{mol ET/g}$ y 2188.12 $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente, estas fracciones exhibieron una mayor actividad antioxidante que otra especie del mismo género *Clusia alata* 961.8 $\mu\text{mol ET/g}$ (Clusiaceae) (Guaman, Suarez, Armijos, & Meneses, 2015).

En cuanto a los resultados de ABTS las particiones con mayor actividad fueron las de diclorometano, acetato de etilo y metanol tanto para hojas y tallos, pero las que predominaron fueron la partición acuosa de hojas (2864.93 $\mu\text{mol ET/g}$) y la partición de diclorometano de tallos (4533.15 $\mu\text{mol ET/g}$), en comparación con otra especie de la familia Clusiaceae la partición de diclorometano de tallos fue más activa que el extracto hidrófilo de fruto de *Garcinia mangostana* (3591 $\mu\text{mol ET/g}$) (Arráez-Roman, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2010).

3.4.3. SC_{50} de los extractos de *Clusia latipes*

En la Tabla 11 se presenta la SC_{50} (actividad de barrido de radicales) que indica la cantidad necesaria de extracto de *Clusia latipes* para reducir el 50% de los radicales de DPPH y ABTS.

Tabla 11. SC_{50} de los extractos obtenidos de hojas y tallos de *Clusia latipes*.

Estructura morfológica	Extractos	DPPH	ABTS
		SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
HOJAS	Hexano	>100	64.80 \pm 0.21
	Acetato de etilo	85.53 \pm 0.88	42.45 \pm 0.52
	Metanol	6.44 \pm 0.52	5.43 \pm 0.30
TALLOS	Hexano	>100	52.06 \pm 0.44
	Acetato de etilo	46.93 \pm 0.69	25.81 \pm 0.45
	Metanol	6.77 \pm 0.59	4.59 \pm 0.34

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Los resultados de DPPH indican, que los extractos de hexano son los menos activos con valores de SC_{50} sobre los 100 $\mu\text{g/ml}$, los extractos de acetato de etilo de hojas y tallos mejoraron la actividad antioxidante siendo más eficaz tallos (SC_{50} : 46.93 $\mu\text{g/ml}$) que hojas (85.53 $\mu\text{g/ml}$). Los extractos que exhibieron mayor actividad y con valores similares de SC_{50} fueron metanol de hojas (SC_{50} : 6.44) y tallos (SC_{50} : 6.77).

En el ensayo de ABTS se obtuvo SC_{50} de todos los extractos, con valores de 25.81 $\mu\text{g/ml}$ a 64.80 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos de hexano y acetato de etilo de hojas y tallos. Los extractos que mostraron mayor actividad antioxidante fueron los metanólicos con valores de SC_{50} de 6.44 $\mu\text{g/ml}$ para hojas y 6.77 $\mu\text{g/ml}$ para tallos.

Se utilizó como control positivo Trolox, presentó SC_{50} de 7.65 $\mu\text{g/ml}$ para DPPH y 5.93 $\mu\text{g/ml}$ para ABTS.

3.4.4. SC_{50} de las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos.

La SC_{50} de las fracciones (particiones) obtenidas mediante extracción líquido-líquido de los extractos metanólicos se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. SC_{50} de la fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *Clusia latipes*.

Estructura morfológica	Particiones de los extractos metanólicos	DPPH	ABTS
		SC_{50} $\mu\text{g/ml}$	SC_{50} $\mu\text{g/ml}$
HOJAS	Hexano	>100	63.68 \pm 0.77
	Diclorometano	7.27 \pm 0.70	5.74 \pm 0.38
	Acetato de etilo	4.70 \pm 0.80	3.29 \pm 0.35
	Acuosa	6.52 \pm 0.53	5.03 \pm 0.68
TALLOS	Hexano	>100	70.16 \pm 0.57
	Diclorometano	6,86 \pm 0.48	3.97 \pm 0.51
	Acetato de etilo	3.58 \pm 0.50	2.27 \pm 0.51
	Acuosa	4.20 \pm 0.43	2.75 \pm 0.33

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

En los dos ensayos DPPH y ABTS las fracciones (particiones) de hexano de hojas y tallos fueron las que presentaron menor actividad antioxidante, la SC_{50} fue superior a 63 $\mu\text{g/ml}$. Las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y acuosa de hojas y tallos aumentaron la actividad antioxidante notablemente con respecto a la fracciones de hexano, los valores de SC_{50} mostrados son de 3.58 $\mu\text{g/ml}$ a 7.27 $\mu\text{g/ml}$ en DPPH y de 2.27 $\mu\text{g/ml}$ a 5.74 $\mu\text{g/ml}$ en ABTS, para los extractos de acetato de etilo y diclorometano respectivamente; también se pudo notar que los valores de SC_{50} entre

de DPPH y ABTS de las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y acuosa de hojas y tallos fueron similares mostrando diferencias de 1 a 3 entre ellos, pero siempre exhibiendo una mayor actividad antioxidante sobre ABTS.

Las fracciones de acetato de etilo de hojas y tallos fueron las más activas en la actividad antioxidante sobre DPPH (SC_{50} : 4.70 $\mu\text{g/ml}$ y 3.58 $\mu\text{g/ml}$) y ABTS (SC_{50} : 3.29 $\mu\text{g/ml}$ y 2.27 $\mu\text{g/ml}$), incluso fueron más activas que el control positivo Trolox (SC_{50} : 7.65 $\mu\text{g/ml}$ DPPH y 5.93 $\mu\text{g/ml}$ ABTS), pero fueron menos efectivas en DPPH que el extracto de metanol de frutos (SC_{50} : 1.83 $\mu\text{g/ml}$) y corteza (SC_{50} : 2.35 $\mu\text{g/ml}$) de *Garcinia lucida* (Sylvie, Anatole, Cabral, & Veronique, 2014), sucediendo lo mismo para ABTS, fueron menos efectivas que el extracto de metanol de frutos de *Garcinia pedunculata* (SC_{50} : 0.82 $\mu\text{g/ml}$) (Sarma et al., 2016).

En comparación con otras especies de la familia Clusiaceae, las fracciones de acetato de etilo de hojas y tallos fueron más activas en DPPH que el extracto de acetato de etilo de hojas de *Garcinia fruticosa* (SC_{50} : 12.36 $\mu\text{g/ml}$) (Elya et al., 2017), y también de los extractos de metanol de hojas de *Clusia lanceolata* (SC_{50} : 57 $\mu\text{g/ml}$) y *Garcinia fruticosa* (SC_{50} : 18.62 $\mu\text{g/ml}$) (Elya et al., 2017; Ferreira et al., 2014); en cuanto a ABTS fueron también las fracciones de acetato de etilo más activas que el extracto de diclorometano de *Clusia multiflora* (SC_{50} : 374.5 $\mu\text{g/ml}$) (Tovar-Del Río, Mosquera-Martínez, Martínez-García, & Niño-Osorio, 2014) y a su vez de los extractos de acetato de etilo de ramas de *Garcinia gummigutta* (SC_{50} : 102 $\mu\text{g/ml}$), *Garcinia morella* (SC_{50} : 45 $\mu\text{g/ml}$) y corteza de *Garcinia xanthochymus* (SC_{50} : 100 $\mu\text{g/ml}$), *Garcinia gummigutta* (SC_{50} : 16 $\mu\text{g/ml}$) y *Garcinia indica* (SC_{50} : 44 $\mu\text{g/ml}$) (Ruma, Sunil, & Prakash, 2013).

3.5. Tamizaje fitoquímico de los extractos más activos y sus fracciones

De los extractos metanólicos de hojas y tallos con sus respectivas fracciones se pudo detectar la presencia de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, quinonas, saponinas, taninos, fenoles, terpenoides y esteroides) y metabolitos primarios (carbohidratos y grasas). En la Tabla 13 se encuentran los compuestos presentes.

Tabla 13. Tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de hojas y tallos y sus fracciones.

Compuestos	Extractos metanólicos y fracciones									
	HOJAS					TALLOS				
	H-MeOH	F-Hex-H	F-DCM-H	F-AcOEt-H	F-Ac-H	T-MeOH	F-Hex-T	F-DCM-T	F-AcOEt-T	F-Ac-T
Alcaloides	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Carbohidratos	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Grasas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides y xantonas	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Quinonas	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Saponinas	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Taninos y fenoles	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Terpenoides y esteroides	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

+ = presencia; - = ausencia

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *Clusia latipes* revelaron la presencia de alcaloides, carbohidratos, flavonoides, quinonas, saponinas y taninos. En cuanto a las fracciones obtenidas por extracción líquido-líquido, presentaron perfiles similares de compuestos para algunas fracciones. La fracción de acetato de etilo de hojas que fue la que presentó la mayor inhibición de α -glucosidasa mostró presencia de alcaloides, flavonoides, quinonas y saponinas.

3.6. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de *Clusia latipes*

3.6.1. Cromatografía en columna con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt

La fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de hojas de *C. latipes* (H-MeOH-F-AcOEt) se trabajó debido a que presentó la más alta actividad inhibitoria de α -glucosidasa. Se eluyó 1.82 g de la fracción H-MeOH-F-AcOEt en cromatografía en columna.

Para el empaquetado de la columna se utilizó como fase estacionaria silica gel fase inversa C-18 (40-63 μ m), en una proporción extracto:silica (1:20). En la Tabla 14 se

muestra el sistema de disolventes utilizado y las separaciones obtenidas. En la Figura 5 se puede ver la elución en cromatografía en capa fina en silica gel fase inversa sobre placas de aluminio en MeOH-H₂O (1:1).de la fracción H-MeOH-F-AcOEt.

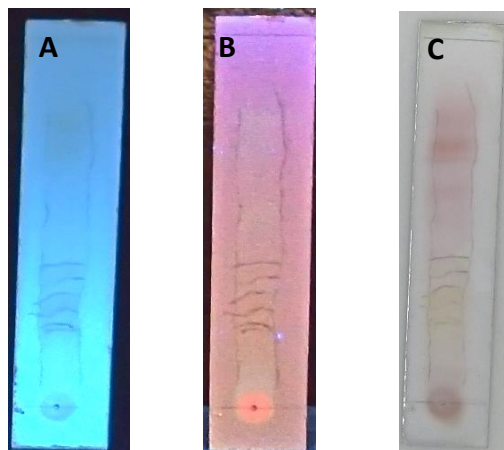


Figura 5. Fracción H-MeOH-F-AcOEt eluida en cromatografía en capa fina fase inversa. **A.** UV 365 nm. **B.** UV 254. **C.** Luego de aplicar la solución de revelado.

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Tabla 14. Separaciones obtenidas en cromatografía en columna con silica gel inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt.

Número de separaciones	Sistema de disolventes	
	MeOH	H ₂ O
1-96	50	50
97- 130	60	40
131-156	70	30
157-175	80	20
176-191	90	10
192-200	100	

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

A las separaciones obtenidas se les evaluó su perfil cromatográfico mediante cromatografía en capa fina, utilizando placas de aluminio cubiertas de silica gel fase

normal, y se unieron de acuerdo a su similitud. Se obtuvieron 20 fracciones (ver Tabla 15).

Tabla 15. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución cromatográfica con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt.

Código de fracciones	Unión de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F1	1-7	135	Sólido café
F2	8-14	823.5	Sólido café
F3	15-17	132.18	Sólido café
F4	18-21	101.5	Sólido café
F5	22-26	99.2	Sólido café
F6	27-30	67.4	Sólido café
F7	31-46	121.1	Sólido café
F8	47-54	34.5	Sólido café
F9	55-62	19.8	Sólido café
F10	63-82	15.9	Sólido café
F11	83-90	5.9	Sólido café
F12	91-101	7.1	Sólido café
F13	102-112	105.6	Sólido café
F14	113-122	9.9	Sólido café
F15	123-140	8.6	Sólido café
F16	141-145	8.1	Sólido café
F17	146-161	8.2	Sólido café
F18	162-173	16.2	Sólido café
F19	174-183	12.9	Sólido café
F20	184-200	17.9	Sólido café

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

De todas las fracciones obtenidas, las fracciones F4 a F10 presentaron el mejor perfil cromatográfico razón por la cual se continuó con la purificación mediante técnicas cromatográficas. La fracción F4 se trabajó sola y las fracciones F5 a F10 se unieron (F5) ya que presentaron los mismos compuestos mayoritarios de acuerdo a cromatografía en capa fina con silica gel fase normal.

3.6.2. Cromatografía en columna de la fracción F4 obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt

De la fracción F4 (101.5 mg) se realizó cromatografía en columna, como fase estacionaria se utilizó silica gel fase normal (63-200 μm). La relación de la fracción F4 con respecto a la silica fue de 1:100. En la Tabla 16 podemos observar el sistema de disolventes utilizado y las separaciones obtenidas.

Tabla 16. Separaciones obtenidas en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4.

Número de separaciones	Sistema de disolventes		
	AcOEt	MeOH	H ₂ O
1-7	81	11	10
8-26	77	13	10
27-32	74	16	10
33		100	

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

En cromatografía en capa fina fase normal se evaluó el perfil cromatográfico de todas las separaciones para luego unir las según corresponda de acuerdo a su similitud cromatográfica. En la Tabla 17 encontramos las separaciones unidas y sus pesos.

Tabla 17. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4.

Código de fracciones	Unión de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F4a	1-7	2	Sólido café
F4b	3-7	20.5	Sólido café
F4c	8	6.7	Sólido café
F4d	9-12	26.8	Sólido café
F4e	13	7	Sólido café
F4f	14-18	12.7	Sólido café
F4g	19-25	5.5	Sólido café

Tabla 17. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4 (continuación).

F4h	26-32	6.1	Sólido café
F4i	33	13.5	Sólido café

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Las fracciones F4b y F4d en comparación con las otras fracciones obtenidas en cromatografía en columna presentaron un mejor perfil cromatográfico por lo que se eluyeron en cromatografía en columna para seguir con su purificación.

3.6.2.1. Cromatografía en columna de la fracción F4b obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4

Se eluyó en cromatografía en columna la fracción F4b (20.5 mg), para ello se utilizó como fase estacionaria silica gel fase normal (63-200 μm) y la fase móvil fue isocrática (DCM-MeOH-HCOOH, 90:10:1). La relación F4b:silica utilizada fue 1:200. Todas las separaciones obtenidas se evaluaron su perfil cromatográfico en cromatografía en capa fina con placas de aluminio cubiertas de silica gel fase normal para posteriormente unir de acuerdo a su perfil similar (Tabla 18).

Tabla 18. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4b.

Código de fracciones	Unión de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F4b(I)	1	1	Sólido amarillo
F4b(II)	2-4	1	Sólido amarillo
F4b(III)	5-8	1	Sólido café
F4b(IV)	9-11	1	Sólido café
F4b(V)	12-16	1	Sólido café
F4b(VI)	17-20	1	Sólido café
F4b(VII)	21	1	Sólido café
F4b(VIII)	22-28	0.4	Sólido café
F4b(IX)	29-40	2.2	Sólido café
F4b(X)	41-43	0.3	Sólido café
F4b(XI)	46-58	1	Sólido café

Tabla 18. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4b (continuación).

F4b(XII)	59-69	0.4	Sólido café
F4b(XIII)	70-87	1.3	Sólido café
F4b(XIV)	88-92	0.4	Sólido café
F4b(XV)	93-95	0.4	Sólido café
F4b(XVI)	96-107	2.5	Sólido café
F4b(XVII)	108	3.2	Sólido café

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

3.6.2.2. Cromatografía en columna de la fracción F4d obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4

Con un peso de 26.8 mg de la F4d se trabajó en cromatografía en columna, utilizando silica gel fase normal (63-200 μm) como fase estacionaria y la fase móvil fue isocrática (AcOEt-MeOH-H₂O, 81:11:8). La proporción F4d:silica fué de 1:200. Se obtuvo 42 separaciones, las cuales se las eluyó en cromatografía en capa fina fase normal para unir las que tuvieron perfil cromatográfico similar. En la Tabla 19 se indica la unión de separaciones.

Tabla 19. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F4d.

Código de fracciones	Unión de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F4d(I)	1-5	1	Sólido café
F4d(II)	6-7	1	Sólido café
F4d(III)	8-11	5.2	Sólido café
F4d(IV)	12-18	1.4	Sólido café
F4d(V)	19-29	2.5	Sólido café
F4d(VI)	30-41	0.9	Sólido café
F4d(VII)	42	3.4	Sólido café

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Cromatografía en columna de la fracción F5 (F5-F10) obtenida de cromatografía en columna con silica gel fase inversa C-18 de la fracción H-MeOH-F-AcOEt.

La fracción F5 (357.9 mg) se trabajó en cromatografía en columna empacada con silica gel fase normal (63-200 μm) como fase estacionaria en proporción muestra-

silica, 1:100. La Tabla 20 contiene las separaciones obtenidas y el sistema de disolventes utilizado.

Tabla 20. Separaciones obtenidas en cromatografía en columna con silica fase normal de la fracción F5.

Número de separaciones	Sistema de disolventes		
	AcOEt	MeOH	H ₂ O
1-16	90	6	4
17-60	85	10	5
61-79	81	11	8
80-94	77	13	10
95		100	

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Las separaciones obtenidas se eluyeron en cromatografía en capa fina utilizando placas de aluminio cubiertas de silica gel fase normal y se unieron según su perfil cromatográfico similar. La Tabla 21 se muestra la unión de las fracciones.

Tabla 21. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F5.

Código de fracciones	Unión de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F5a	1-5	6.9	Sólido café
F5b	6-9	13.5	Sólido café
F5c	10-11	7.9	Sólido café
F5d	12-32	124.1	Sólido café
F5e	33-35	24.1	Sólido café
F5f	36-39	23.9	Sólido café
F5g	40-48	34.8	Sólido café
F5h	49-62	20.6	Sólido café
F5i	63-94	22.4	Sólido café
F5j	95	32.7	Sólido café

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

3.6.2.3. Cromatografía en columna de la fracción F5d obtenida de la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F5

La fracción F5d (124.1 mg) fue eluída en cromatografía en columna. La columna se empaquetó con fase estacionaria de silica gel fase normal (63-200 μm) y como fase móvil se usó un sistema isocrático de DCM-MeOH-HCOOH (87:13:1). En la Tabla 22 se indica la unión de las separaciones.

Tabla 22. Fracciones obtenidas de la unión de las separaciones recolectadas en la elución en cromatografía en columna con silica gel fase normal de la fracción F5d.

Código de fracciones	Unión de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F5d(I)	1-9	3.2	Sólido café
F5d(II)	10-26	0.7	Sólido café
F5d(III)	27-37	2.1	Sólido café
F5d(IV)	38-62	10.9	Sólido café
F5d(V)	63-71	4.7	Sólido café
F5d(VI)	72-77	4	Sólido café
F5d(VII)	78-95	8.6	Sólido café
F5d(VIII)	96-103	22.9	Sólido café
F5d(IX)	104-109	3.3	Sólido café
F5d(X)	110-111	1.1	Sólido café
F5d(XI)	112-114	2.1	Sólido café
F5d(XII)	115	0.4	Sólido café
F5d(XIII)	116-122	3.2	Sólido café
F5d(XIV)	123-136	7.7	Sólido café
F5d(XV)	137-153	13.6	Sólido café
F5d(XVI)	154-170	9.3	Sólido café
F5d(XVII)	171-173	1.8	Sólido amarillo
F5d(XVIII)	174	21.4	Sólido café

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

3.6.3. Cromatografía en capa fina preparativa en placas de aluminio cubiertas de sílica gel fase normal de las fracciones F4e, F4f, F4d(III), F4d(IV), F5a, F5b y F5c

Luego de ser eluidas diferentes fracciones en cromatografía en columna no se logró la purificación de ningún compuesto, por lo que se seleccionó las fracciones que presentaron mejor fraccionamiento en cromatografía en capa fina fase normal para posteriormente aislar los compuestos mayoritarios.

Se seleccionó las fracciones: F4e, F4f, F4d(III), F4d(IV), F5a, F5b y F5c, cada una no superó el peso de 14 mg, al no tener un peso significativo se decidió realizar cromatografía en capa fina preparativa. Para esta técnica se utilizó placas de cromatografía en capa fina fase normal de 20 × 20 cm (Merck), cada placa se cortó en cuatro partes de 10 × 8 cm y en cada una se aplicó aproximadamente 10 mg de la muestra, luego se eluyó en DCM-MeOH-HCOOH (80:20:1) por tres ocasiones y se observó en luz ultravioleta de onda corta (254 nm) para señalar el compuesto de interés y recuperarlo de la placa.

Se logró aislar dos sustancias que se las denominaron compuesto 1 (5.9 mg) y compuesto 2 (10.2 mg), se observó una sola mancha en cromatografía en capa fina fase normal en luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), al revelar con solución de ácido sulfúrico y vainillina también se logró observar una sola mancha de color amarillo. A continuación se muestra placa de cromatografía en capa fina fase normal de los compuestos aislados, eluidos en AcOEt-MeOH-H₂O (81:11:8), en luz ultravioleta 254 nm (Figura 6A) y luego de aplicar la solución de revelado (Figura 6B).

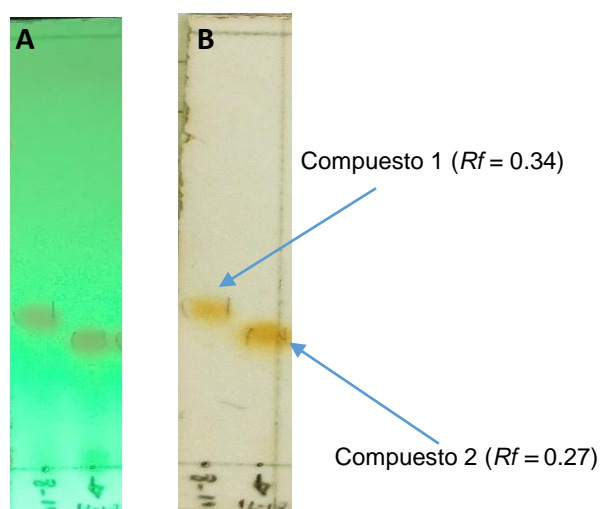


Figura 6. Cromatografía en capa fina fase normal de los compuestos 1 y 2

Fuente: Silva, R., 2017

Elaborado por: Silva, R., 2017

Debido a que las propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes más significativas se asocian con las fracciones (particiones) de acetato de etilo de hojas y tallos de *Clusia latipes* se puede inferir que los compuestos responsables de estas actividades son de polaridad media o de naturaleza polar. Dado que a partir de varias especies de la familia Clusiaceae se ha reportado actividad inhibitoria de la α -glucosidasa y actividad antioxidante y a su vez se aislado compuestos como flavonoides y xantonas con la misma actividad (Elya, He, Kosela, Hanafi, & Hao, 2008; Gontijo et al., 2012; Jamila et al., 2017; Karunanayake, Sotheeswaran, Uvais, Sultanbawa, & Balasubramaniam, 1981; Martha, Elya, & Hanafi, 2017).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por la presencia de al menos un grupo hidroxilo (OH) en un anillo aromático. Debido a su estructura química, puede favorecer la formación del ion fenóxido y la deslocalización de sus electrones. De acuerdo con esta propiedad, los compuestos fenólicos muestran la actividad antioxidante por barrido de radicales libres (Choi et al., 2015; Waterman & Mole, 1994). También se considera que entre más grupos hidroxilo libres en los anillos aromáticos estén presentes en los compuestos fenólicos, mejor es la inhibición de la α -glucosidasa (Ryu et al., 2011). De este tipo de compuestos según literatura han presentado actividad antioxidante e hipoglucemiante el compuesto apigenina-8-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido obtenido de *Garcinia gracilis* (Supasuteekul et al., 2016) y el extracto de acetato de etilo de hojas de *Garcinia fruticosa*, especies pertenecientes a la familia Clusiaceae (Elya et al., 2017).

En varios reportes se ha demostrado una estrecha relación entre los compuestos fenólicos y la inhibición de la α -glucosidasa a partir de fuentes naturales (Apostolidis & Lee, 2010; Ferreres et al., 2012; Lordan, Smyth, Soler-Vila, Stanton, & Paul Ross, 2013; Yilmazer-Musa, Griffith, Michels, Schneider, & Frei, 2012). La estructura de los compuestos fenólicos (flavonoides y xantonas), sus estructuras son semejantes y también sus comportamientos cromatográficos. Los flavonoides se encuentran con frecuencia en la naturaleza, mientras que las xantonas se encuentran en un número limitado de familias. Las xantonas siempre aparecen en las familias Gentianaceae, Guttiferae, Moraceae, Clusiaceae y Polygalaceae, pero se asocian principalmente con las familias Clusiaceae y Gentianaceae (Negi, Bisht, Singh, Rawat, & Joshi, 2013). Se ha reportado flavonoides y xantonas con propiedades antidiabéticas, antihiperlipidémicas, hipolipidémicas y antioxidantes. (Dineshkumar, Mitra, & Manjunatha, 2010; Jung, Su, Keller, Mehta, & Kinghorn, 2006; Pinto, Sousa, & Nascimento, 2005; Salib, Michael, & Eskande, 2013; Vinayagam & Xu, 2015), y es también conocido que tienen actividad inhibitoria de α -glucosidasa con valores de CI_{50}

inferiores a 15 μM (Genovese, Fiorito, Taddeo, & Epifano, 2016; Ghani, 2015; Kumar, Prakash, Kumar, & Narwal, 2011). Algunos compuestos aislados de especies de la familia Clusiaceae con actividad hipoglucemiante mediante inhibición de la α -glucosidasa son de tipo xantona como el subelliptenona (CI_{50} : 4.1 μM) (Nguyen et al., 2017), α -mangostina (CI_{50} : 5.0 μM), γ -mangostina (CI_{50} : 1.5 μM) y smeathxanthona A (CI_{50} : 6.9 μM) (Ryu et al., 2011), y también se ha aislado el flavonoide apigenina-8-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (CI_{50} : 0.56 mM) obtenido de la especie *Garcinia gracilis* (Supasuteekul et al., 2016).

Se puede considerar que la potente actividad hipoglucemiante y antioxidante de la especie *Clusia latipes* es debido a la presencia de compuestos fenólicos pero con estructuras diferentes, se conoce que las disposición de los grupos hidroxilos en posición orto o para pueden mejorar la actividad antioxidante y en posición orto la actividad hipoglucemiante (Nguyen et al., 2017; Zhong, Chen, & Yang, 2008).

CONCLUSIONES

Los extractos hexano, acetato de etilo y metanol de hojas y tallos de *Clusia latipes* presentaron inhibición frente a α -glucosidasa con valores de CI_{50} menores al del control positivo demostrando una potente inhibición, pero los que presentaron mayor inhibición de la α -glucosida fueron los extractos metanólicos con valores de CI_{50} de 5.01 $\mu\text{g/ml}$ para hojas y 2.30 $\mu\text{g/ml}$ para tallos.

Las fracciones obtenidas de los extractos más activos (hojas MeOH y tallos MeOH) mediante extracción líquido-líquido también fueron activas. Los valores de CI_{50} de las fracciones de hexano y diclorometano de hojas y tallos fueron de 102.80 $\mu\text{g/ml}$ a 174.96 $\mu\text{g/ml}$ siendo estas menos activas que las fracciones de acetato de etilo y metanol de hojas y tallos, las cuales presentaron una CI_{50} de 0.90 $\mu\text{g/ml}$ a 3.88 $\mu\text{g/ml}$.

La fracción de acetato de etilo de hojas demostró ser un potente inhibidor de la α -glucosidasa con un valor de CI_{50} de 0.90 $\mu\text{g/ml}$ y demostró ser 270 veces más eficaz que la acarbosa (control positivo). Esta fracción reveló en el tamizaje fitoquímico la presencia de alcaloides, flavonoides, quinonas y saponinas.

Las fracciones de acetato de etilo de hojas y tallos provenientes de los extractos metanólicos fueron las que presentaron mayor actividad antioxidante tanto para DPPH (SC_{50} : 4.70 $\mu\text{g/ml}$ y 3.29 $\mu\text{g/ml}$) y ABTS (SC_{50} : 3.58 $\mu\text{g/ml}$ y 2.27 $\mu\text{g/ml}$).

RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de *Clusia latipes* y además estudiar los mecanismos de acción en la inhibición de la α -glucosidasa.

Evaluar la toxicidad de los extractos y metabolitos secundarios para determinar posibles efectos adversos.

Realizar ensayos hipoglucemiantes *in vivo* de los extractos y metabolitos secundarios a diferentes concentraciones.

Continuar con el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos y fracciones con mayor potencial de inhibición de α -glucosidasa.

BIBLIOGRFÍA

- Agilent Technologies. (n.d.). Agilent Capillary GC Columns. *Gas Chromatography*, 292.
- Akinmoladun, A. C., Farombi, E. O., & Oguntibeju, O. O. (2014). Antidiabetic botanicals and their potential benefits in the management of diabetes mellitus. *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*, 139–164. <http://doi.org/10.5772/57029>
- Apostolidis, E., & Lee, C. M. (2010). *In vitro* potential of *Ascophyllum nodosum* phenolic antioxidant-mediated α -glucosidase and α -amylase inhibition. *Journal of Food Science*, 75(3). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01544.x>
- Armijos, C. (2012). Medicina tradicional en Loja y Zamora Chinchipe. *Perspectivas Desde La Ciencia.*, 11(julio), 1–8.
- Arráez-Roman, P. G.-S. D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, B. G.-V. E. G.-H. A. (2010). Garcinia mangostana Fruit: Determination of the Total antioxidant activity in extracts and phenolic compound characterization using CE-MS (TOF). *Funct Plant Sci Biotechnol*, 11–16.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69–82. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7).
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Sordo, M., Villacís, J., Silva, R., Celi, L., ... Ostrosky-Wegman, P. (2016). Phytochemical study and evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia latipes* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(1), 44–49. <http://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.014>
- Baldea, L. A. N., Martineau, L. C., Benhaddou-Andaloussi, A., Arnason, J. T., Lévy, É., & Haddad, P. S. (2010). Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(2), 473–482. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.055>
- Barbour, L. a. (2003). New concepts in insulin resistance of pregnancy and gestational diabetes: long-term implications for mother and offspring. *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 23(5), 545–9. <http://doi.org/10.1080/0144361031000156500>
- Baynest, H. W. (2015). Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 6(5). <http://doi.org/10.4172/2155-6156.1000541>

- Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., & Yeh, H. (2007). Review annals of internal medicine systematic review : comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, *147*, 386–399.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, *414*(December), 813–820. <http://doi.org/10.1038/414813a>
- Camara, C. A. G. Da, Shepherd, S. L. K., & Joaquim, D. R. G. (2002). Análise química da cultura de tecidos do híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia Weddelliana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *12*(Tabela 1), 1–3. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300013>
- Chen, J., Wu, Y., Zou, J., & Gao, K. (2016). α -glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *24*(7), 1488–1494. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.018>
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7429–7436. <http://doi.org/10.1021/jf0611668>
- Chhabra, P., & Brayman, K. L. (2013). Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: From hype to hope. *Stem Cells Translational Medicine*, *2*(5), 328–336. <http://doi.org/10.5966/sctm.2012-0116>
- Choi, C. I., Lee, S. R., & Kim, K. H. (2015). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of constituents from *Euonymus alatus* twigs. *Industrial Crops and Products*, *76*, 1055–1060. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.031>
- Choudhari, A. S., Suryavanshi, S., Ingle, H., & Kaul-Ghanekar, R. (2011). Evaluating the antioxidant potential of aqueous and alcoholic extracts of *Ficus religiosa* using ORAC assay and assessing their cytotoxic activity in cervical cancer cell lines, *1*(4), 443–450.
- Cohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathology*, *30*(6), 620.
- Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. (2008). *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. Boca Raton, FL, USA: CRC press.
- Dabhi, A. S., Bhatt, N. R., & Shah, M. J. (2013). Voglibose: An alpha glucosidase

- inhibitor. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(12), 3023–3027.
<http://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6373.3838>
- Das, S., Roy, P., Pal, R., Auddy, R. G., Chakraborti, A. S., & Mukherjee, A. (2014). Engineered silybin nanoparticles educe efficient control in experimental diabetes. *PLoS ONE*, 9(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101818>
- Derosa, G., & Sibilla, S. (2007). Optimizing combination treatment in the management of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 3(5), 665–671.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. (J. W. and Son, Ed.) (2nd ed.). West Sussex, UK.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(4), 303–336.
<http://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Díaz-Carballo, D., Gustmann, S., Acikelli, A. H., Bardenheuer, W., Buehler, H., Jastrow, H., ... Strumberg, D. (2012). 7-epi-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells. *Phytomedicine*, 19(14), 1298–306.
<http://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.08.004>
- Dineshkumar, B., Mitra, A., & Manjunatha, M. (2010). Studies on the anti-diabetic and hypolipidemic potentials of mangiferin (xanthone glucoside) in streptozotocin-induced Type 1 and Type 2 diabetic model rats. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(1).
- Du, Z. Y., Liu, R. R., Shao, W. Y., Mao, X. P., Ma, L., Gu, L. Q., ... Chan, A. S. C. (2006). α -glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(2), 213–218.
<http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.10.012>
- El-Bahr, S. M. (2013). Curcumin regulates gene expression of insulin like growth factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 368.
<http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-368>
- Elya, B., Basah, K., Mun'Im, A., Yulastuti, W., Bangun, A., & Septiana, E. K. (2012). Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1155/2012/281078>

- Elya, B., He, H. P., Kosela, S., Hanafi, M., & Hao, X. J. (2008). A new cytotoxic xanthone from *Garcinia rigida*. *Fitoterapia*, 79(3), 182–184. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.022>
- Elya, B., Nurrianti, J., & Mauldina, M. G. (2017). Inhibition of Alpha-glucosidase and antioxidant test using DPPH method of leaf extracts of *Garcinia fruticosa* Lauterb., and phytochemical screening on the most active extract, 10(2), 207–215.
- Feng, J., Yang, X. W., & Wang, R. F. (2011). Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry*, 72(2), 242–247. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.025>
- Ferreira, R. O., de Carvalho Junior, A. R., da Silva, T. M. G., Castro, R. N., da Silva, T. M. S., & de Carvalho, M. G. (2014). Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24(6), 617–625. <http://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.005>
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Silva, S. T., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2012). *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chemistry*, 134(2), 894–904. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.201>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shumabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Makajima, Y., ... Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761. <http://doi.org/10.1172/JCI200421625.1752>
- GAD Gonzanamá. (n.d.). GAD Gonzanamá. Retrieved June 27, 2017, from <http://www.gonzanama.gob.ec/>
- Gao, H., Huang, Y. N., Gao, B., Li, P., Inagaki, C., & Kawabata, J. (2008). Inhibitory effect on α -glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees. *Food Chemistry*, 108(3), 965–972. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.002>
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos Y Forrajes*, 27(1).
- Gayathri, P., & Jeyanthi, G. P. (2012). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory property and antioxidant potential of *Polyalthia longifolia* bark extracts. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 43–52.
- Genovese, S., Fiorito, S., Taddeo, V. A., & Epifano, F. (2016). Recent developments in the pharmacology of prenylated xanthones. *Drug Discovery Today*, 21(11), 1814–

1819. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.033>
- Gerich, J. E. (1989). Oral hypoglycemic agents. *New England Journal of Medicine*, 321(18), 1231–1245. <http://doi.org/10.1056/NEJM198603273141302>
- Ghani, U. (2015). Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 133–162. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.043>
- Giaccari, A., Sorice, G., & Muscogiuri, G. (2009). Glucose toxicity: The leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes - mechanisms and potentials for treatment. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(5), 365–377. <http://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.03.018>
- Gontijo, V. S., De Souza, T. C., Rosa, I. A., Soares, M. G., Da Silva, M. A., Vilegas, W., ... Dos Santos, M. H. (2012). Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. *Food Chemistry*, 132(3), 1230–1235. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.110>
- Guaman, M. D. C., Suarez, A. I., Armijos, C. P., & Meneses, M. A. (2015). Antioxidant properties of medicinal plants used in the southern of Ecuador. *Pharmacognosy Research*. Retrieved from <https://sica.utpl.edu.ec/articles/ART4447>
- Gustafsson, M., Winter, K., & Bittrich, V. (2007). Diversity , phylogeny and classification of *Clusia*. *Springer Berlin Heidelberg*, 194, 95–116.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16(1), 33–50.
- Handwerger, S., & Freemark, M. (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13(4), 343–356.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19–20), 894–901. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>
- Hicks, S. (1966). *Desert plants and people*. 1st. Naylor Co. San Antonio.USA.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M. D. C., Lozada, L., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., & Reyes-Chilpa, R. (2004). HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from México. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(6), 916–20.
- Jamila, N., Khan, N., Khan, A. A., Khan, I., Khan, S. N., Zakaria, Z. A., ... Kim, K. S.

- (2017). *In vivo* carbon tetrachloride-induced hepatoprotective and *in vitro* cytotoxic activities of *Garcinia Hombroniana* (Seashore Mangosteen). *African Journal of Traditional, Complementary & Alternative Medicines*, 14(2), 374–382. <http://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i2.38>
- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Quito-Ecuador: Missouri Botanical Garden.
- Jung, H. A., Su, B. N., Keller, W. J., Mehta, R. G., & Kinghorn, A. D. (2006). Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2077–2082. <http://doi.org/10.1021/jf052649z>
- Karunanayake, S., Sotheeswaran, S., Uvais, M., Sultanbawa, S., & Balasubramaniam, S. (1981). Xanthenes and triterpenes of *Calophyllum tomentosum*. *Phytochemistry*, 20(6), 1303–1304. [http://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)80026-X](http://doi.org/10.1016/0031-9422(81)80026-X)
- Kavishankar, G., Lakshmedevi, N., Murthy, S. M., Prakash, H., & Niranjana, S. (2011). Diabetes and Medicinal plants – A review. *Int J Pharm Biomed Sci*, 2(3), 65–80.
- Kinghorn, A. D., Pan, L., Fletcher, J. N., & Chai, H. (2011). The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of Natural Products*, 74(6), 1539–1555. <http://doi.org/10.1021/np200391c>
- Kumar, V., Prakash, O., Kumar, S., & Narwal, S. (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 19. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.79096>
- Kunwar, A., & Priyadarsini, K. . (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1(2), 53–60. <http://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>
- Kupchan, S. M., & Tsou, G. (1973). Tumor inhibitors. A new antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. *J. Org. Chem*, 38, 178–179.
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Quito: Publicaciones del Herbario QCA.
- Li, Y.-G., Ji, D., Zhong, S., Lv, Z.-Q., & Lin, T.-B. (2013). Cooperative anti-diabetic effects of deoxynojirimycin-polysaccharide by inhibiting glucose absorption and modulating glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS ONE*, 8(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0065892>

- Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Paul Ross, R. (2013). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, *141*(3), 2170–2176. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123>
- Mack, L. R., & Tomich, P. G. (2017). Gestational Diabetes. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, *44*(2), 207–217. <http://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.02.002>
- Maddux, B. A., See, W., Lawrence, J. C. J., Goldfine, A. L., Goldfine, I. D., & Evans, J. L. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, *50*(February), 404–410.
- Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Qualitative phytochemical screening. In Academic Press (Ed.), *Phytochemical screening and extraction*. (pp. 173–185). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802325-9.00009-4>
- Mangas Marín, R., Montes de Oca Porto, R., Bello Alarcón, A., & Nival Vázquez, A. (2008). Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, *27*(5), 747–751.
- Maplestone, R. A., Stone, M. J., & Williams, D. H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites—a review. *Gene*, *115*(1), 151–157.
- Martha, S., Elya, B., & Hanafi, M. (2017). Comparison of inhibitory activity against the α -glucosidase enzymes in the extracts and fractions from leaves of the *Garcinia kydia* roxburgh, *10*(7).
- Miranda, M., & Cuellar, A. (2001). *Farmacognosia y productos naturales. La Habana: Editorial Félix Varela* (Vol. 141).
- Mishra, B. B., & Tiwari, V. K. (2011). Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(10), 4769–4807. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>
- Morgan, A. R. (2012). Determining genetic risk factors for pediatric type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*, *12*(1), 88–92. <http://doi.org/10.1007/s11892-011-0245-4>
- Moura, A. C., Perazzo, F. F., & Maistro, E. L. (2008). The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term *in vivo* assays. *Genetics and Molecular Research: GMR*, *7*(4), 1360–1368. <http://doi.org/10.4238/vol7-4gmr523>

- Muhit, M. a, Tareq, S. M., Apu, a S., Basak, D., & Islam, M. S. (2010). Isolation and identification of compounds from the leaf extract of *Dillenia indica* Linn. *Bangladesh Pharm J*, 13(1), 49–53.
- Negi, J. S., Bisht, V. K., Singh, P., Rawat, M. S. M., & Joshi, G. P. (2013). Naturally occurring xanthenes: Chemistry and biology. *Journal of Applied Chemistry*, 2013(1), 1–9. <http://doi.org/10.1155/2013/621459>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335. <http://doi.org/10.1021/np200906s.Natural>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629–661. <http://doi.org/10.1021/np200906s>
- Nguyen, C. N., Trinh, B. T. D., Tran, T. B., Nguyen, L.-T. T., Jäger, A. K., & Nguyen, L.-H. D. (2017). Anti-diabetic xanthenes from the bark of *Garcinia xanthochymus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(15), 3301–3304. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.021>
- Pari, L., & Srinivasan, S. (2010). Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 64(7), 477–481. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.02.001>
- Patil, A. G., Koli, S. P., Patil, D. A., & Phatak, A. V. (2012). Evaluation of extraction techniques with various solvents to determine extraction efficiency of selected medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(8), 2607–2612.
- Pengelly, A. (2004). *The Constituents of Medicinal Plants*. (CSIRO, Ed.). Australia.
- Pinto, M. M., Sousa, M. E., & Nascimento, M. S. (2005). Xanthone derivatives: New insights in biological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 12(21), 2517–2538. <http://doi.org/10.2174/092986705774370691>
- Prohp, T. P., & Onoagbe, I. O. (2011). Anti – diabetic studies of aqueous extract of *Triplochiton scleroxylon* on platelets and associated parameters in alloxan-induced diabetic rabbits. *African Journal of Plant Science*, 5(12), 697–701.
- Psallas, M. (2012). Incretins in type 2 diabetes mellitus: Cardiovascular and anti-atherogenic effects beyond glucose lowering. *Hippokratia*, 16(2), 100–105.

- Ramírez-García, S. A., Cabrera-Pivaral, C. E., Huacuja-Ruiz, L., Flores-Alvarado, L. J., Pérez-García, G., González-Rico, J. L., ... Candelario-Mejía, G. (2013). Implications in primary health care of medical genetics and genomic in type 2 diabetes mellitus. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 51(3), e6-26.
- Rey-Ladino, J., Ross, A. G., Cripps, A. W., McManus, D. P., & Quinn, R. (2011). Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. *Vaccine*, 29(38), 6464–6471. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.041>
- Ribeiro, P. R., Ferraz, C. G., Guedes, M. L. S., Martins, D., & Cruz, F. G. (2011). A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. *Fitoterapia*, 82(8), 1237–40. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.08.012>
- Rios, J. L., Francini, F., & Schinella, G. R. (2015). Natural products for the treatment of type 2 Diabetes mellitus. *Planta Medica*, 81(12–13), 975–994. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>
- Ruma, K., Sunil, K., & Prakash, H. S. (2013). Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(SUPPL 3), 889–897.
- Ryu, H. W., Cho, J. K., Curtis-Long, M. J., Yuk, H. J., Kim, Y. S., Jung, S., ... Park, K. H. (2011). α -glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*, 72(17), 2148–2154. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.007>
- Salib, J., Michael, H., & Eskande, E. (2013). Anti-diabetic properties of flavonoid compounds isolated from *Hyphaene thebaica* epicarp on alloxan induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*, 5(1), 22. <http://doi.org/10.4103/0974-8490.105644>
- Saltos, M. B. V., Puente, B. F. N., Faraone, I., Milella, L., Tommasi, N. De, & Braca, A. (2015). Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase from *Andromachia igniaria* Humb. & Bonpl. *Phytochemistry Letters*, 14, 45–50. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.018>
- Sarma, R., Kumari, S., Elancheran, R., Deori, M., & Devi, R. (2016). Polyphenol rich extract of *Garcinia pedunculata* fruit attenuates the hyperlipidemia induced by high fat diet. *Frontiers in Pharmacology*, 7(AUG), 1–11.

<http://doi.org/10.3389/fphar.2016.00294>

- Sikarwar, M. S., & Patil, M. B. (2010). Antidiabetic activity of *Crateva nurvala* stem bark extracts in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2, 18–21. <http://doi.org/10.4103/0975-7406.62700>
- Supasuteekul, C., Nonhitipong, W., Tadtong, S., Likhitwitayawuid, K., Tengamnuay, P., & Sritularak, B. (2016). Antioxidant, DNA damage protective, neuroprotective, and α -glucosidase inhibitory activities of a flavonoid glycoside from leaves of *Garcinia gracilis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(3), 312–320. <http://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.007>
- Sylvie, D. D., Anatole, P. C., Cabral, B. P., & Veronique, P. B. (2014). Comparison of *in vitro* antioxidant properties of extracts from three plants used for medical purpose in Cameroon: *Acalypha racemosa*, *Garcinia lucida* and *Hymenocardia lyrata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 2), S625–S632. <http://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B168>
- Tanko, Y., Yerima, M., Mahdi, M. A., Yaro, A. H., Musa, K. Y., & Mohammed, A. (2008). Hypoglycemic activity of methanolic stem bark of *Adansonia digitata* extract on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1(2), 32–36.
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., & Wang, Y. (2013). Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*, 27(2), 148–155. <http://doi.org/10.1002/bmc.2761>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Todd, J. A. (2010). Etiology of Type 1 Diabetes. *Immunity*, 32(4), 457–467. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.001>
- Tovar-Del Río, J., Mosquera-Martínez, O. M., Martínez-García, C. A., & Niño-Osorio, J. (2014). Tamizado de plantas de zonas de reserva Risaralda-Colombia con capacidad antioxidante. *Revista Tumbaga*, 2(10), 21–34.
- Triadisti, N., & Rani Sauriasari, B. E. (2017). Fractionation and α -glucosidase Inhibitory Activity of Fractions from *Garcinia hombroniana* Pierre Leaves Extracts.

- Pharmacognosy Journal*, 9(4), 488–492. <http://doi.org/10.5530/pj.2017.4.79>
- Trinh, B. T. D., Staerk, D., & Jäger, A. K. (2016). Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 189–195. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.060>
- Tropicos | Name - *Clusia latipes* Planch. & Triana. (n.d.). Retrieved June 26, 2017, from <http://www.tropicos.org/Name/7800165>
- Vanwagenen, B. C., Larsen, R., Cardellina, J. H., Randazzo, D., Lidert, Z. C., & Swithenbank, C. (1993). Ulosantoin, a Potent insecticide from the sponge *Ulosa ruetzleri*. *J. Org. Chem*, 58(3), 335–337. <http://doi.org/10.1021/jo00054a013>
- Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*, 12(1), 60. <http://doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>
- Vlasáková, B., Kalinová, B., Gustafsson, M. H. G., & Teichert, H. (2008). Cockroaches as pollinators of *Clusia* aff. *sellowiana* (Clusiaceae) on inselbergs in French Guiana. *Annals of Botany*, 102(3), 295–304. <http://doi.org/10.1093/aob/mcn092>
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites* (1st ed). Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- World Health Organization. (1999). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*.
- World Health Organization. (2011). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93(3), 299–309. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.03.012>
- World Health Organization. (2013). Diagnostic Criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. *World Health Organization*, 1–63. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.012>
- World Health Organization. (2016a). Diabetes. Retrieved January 25, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
- World Health Organization. (2016b). Diabetes country profiles-Ecuador.
- World Health Organization. (2016c). Global Report on Diabetes, 978, 88. <http://doi.org/ISBN 978 92 4 156525 7>

- Yamashita, H., Shao, J., & Friedman, J. E. (2000). Physiologic and molecular alterations in carbohydrate metabolism during pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 43(1), 87–98.
- Yilmazer-Musa, M., Griffith, A. M., Michels, A. J., Schneider, E., & Frei, B. (2012). Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8924–8929. <http://doi.org/10.1021/jf301147n>
- Zhong, F. F., Chen, Y., & Yang, G. Z. (2008). Chemical constituents from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activities. *Helvetica Chimica Acta*, 91(9), 1695–1703. <http://doi.org/10.1002/hlca.200890185>

ANEXOS

Anexo1. Desarrollo del de método de inhibición de α -glucosidasa.

REACTIVOS	BLANCO	PRUEBA (As)	ACT_ENZ (Ao)	CNT_POSITIV*
Inhibidor*	-	-	-	20*
MeOH:H ₂ O [†] /Extracto [‡]	5 [†]	5 [‡]	5 [†]	-
PBS. 7.4 pH	95	75	75	60
Enzima 15 μ g/ml (150 mU/ml)	20	20	20	20
Preincubación (5 min - 37°C)				
p-NPG (5 mM)	-	20	20	20
cinética 60 min/37C				
Lectura 405 nm x 60min a 35 °C				

‡

Concentración del extracto: 10mg/mL (MeOH:H₂O, 1:1).

* Como control positivo (Inhibidor) se emplea acarbosa a una concentración de 5 mg/ml.

Las cantidades de los reactivos y soluciones están expresados en microlitros (μ l).

Fuente: Departamento de Química - Sección de Bioensayos.

Elaborado por: Silva, R., 2017