



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“AISLAMIENTO BODIRIGIDO (*in vitro*) DE SUSTANCIAS
ANTIOXIDANTES Y ANTIHIPERGLUCEMIANTES A PARTIR
DE *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo)”**

Tesis de grado previa a la
obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico

Mónica Haideé Alejandro Espinosa
AUTOR

Ing. Jorge Yandry Ramírez Robles
DIRECTOR

LOJA – ECUADOR

2010

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Ing. Jorge Yandry Ramírez Robles
DIRECTOR DE TESIS

Certifica:

Que el trabajo de Investigación “ **AISLAMIENTO BIODIRIGIDO (*in vitro*) DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES y ANTIHIPERGLUCEMIANTES A PARTIR DE *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo)**”, elaborado por la egresada Mónica Haidée Alejandro Espinosa ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Escuela de Bioquímica y Farmacia por lo tanto autorizo su presentación.

Ing. Jorge Yandry Ramírez Robles
DIRECTOR DE TESIS

AUTORIA

Las ideas y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación pertenecen exclusivamente a su autora.

Mónica Haidée Alejandro Espinosa

DEDICATORIA

A mis queridos padres que he recibido no solamente la vida sino además el ejemplo de cómo debe vivirse.

He recibido también el amor, el cariño y el estímulo para mi superación profesional.

A mis hermanos Carlos y Karla con mucho cariño por apoyarme en todo momento en el transcurso de mi vida

Con el fin de retribuir en algo lo mucho que me han dado, les dedico esta tesis que representa los esfuerzos que he realizado pensando en ellos.

Mónica

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a todos los colaboradores porque en ellos he encontrado a los profesores que quieren enseñar y educar por esto y por todo muchas gracias.

A mi director de tesis Ing. Jorge Yandry Ramírez Robles quien de manera acertada y generosa orientó y dirigió este trabajo, a la Ing. Ximena Jaramillo por ayudarme a estructurar el presente proyecto de tesis.

Finalmente agradezco a todas las personas que de una u otra manera colaboraron conmigo hasta la culminación de mi trabajo.

CESION DE DERECHOS

Yo, Mónica Haidée Alejandro Espinosa “declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 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 de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

.....

Mónica Alejandro
TESISTA

.....

Ing. Jorge Yandry Ramírez Robles
DIRECTOR DE TESIS

INDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACION DE APROBACION	I
AUDITORIA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
CESION DE DERECHOS	V
INDICE DE CONTENIDOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	4
FUNDAMENTO TEORICO	9
MATERIALES Y METODOS	26
RESULTADOS Y DISCUCION	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS	51

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidantes y antihiper glucemiante de *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo), que pertenece a la familia PROTEACEAE, la cual fue recolectada en el cantón Saraguro provincia de Loja.

Se realizaron diferentes ensayos, a los extractos metanolicos, hexanicos, acetato de etilo, con diferentes concentraciones; los resultados obtenidos se expresaron como concentración media inhibitoria IC₅₀.

El extracto que presento actividades antioxidantes y antihiper glucemiantes fue el metanólico, del cual se procedió al fraccionamiento de los metabolitos secundarios en cromatografía de columna con silica gel 60 (MERCK) como fase estacionaria y como fase móvil solventes de polaridad creciente hexano-acetato de etilo (100:0 hasta 0:100), acetato de etilo-metanol (100:0 hasta 0:100).

De las 200 fracciones realizadas, de la 176 a la 190 se obtuvieron cristales blancos, con punto de fusión entre 110 a 130°C, estos fueron enviados a análisis para determinar su composición.

ABSTRACT

The present investigation was to harbor anti-oxidants and antihyperglycaemic from *Oreocallis grandiflora* "Cucharillo" belonging to the Proteaceae family, was collected in Saraguro town, Loja province at the following coordinates: 17,686,765 E, 9602527N at 2916 masl and it was selected as reference from previous studies.

Different tests were employed to extract methanol, hexane, ethyl acetate to determine the antioxidant activity (DPPH, Folin and β -CLAMS) and antihyperglycemic activity (α -amylase and α -glucosidase) and the results were expressed as half inhibitory concentration IC_{50} is the concentration that inhibits 50% of the activity and total phenol content in g / ml. In each of the testing of control extracts and different concentrations were used.

The results showed that the methanolic extract of the species *Oreocallis grandiflora* has an inhibitory effect on α -amylase and α -glucosidase also presents an antiradical activity.

The methanolic extract was selected for the fractionation of secondary metabolites in column chromatography, we used silica gel 60 (Merck) as stationary phase and mobile phase solvents of increasing polarity hexane-ethyl acetate (100:0 to 0:100), ethyl acetate-methanol (100:0 to 0:100).

Keywords: extract, anti-oxidant, antihyperglycaemic, *Oreocallis grandiflo*

INTRODUCCION

La Diabetes forma parte de los desórdenes producidas por la alteración del metabolismo de los carbohidratos, que conlleva al incremento excesivo de concentración de glucosa en la sangre, lo que genera daño vascular y complicaciones que se presentan a largo plazo, tales como: insuficiencia renal, daño a la retina, entre otras (García L, *et al.*, 2002).

Actualmente la Diabetes es considerada como uno de los principales problemas de salud a nivel mundial constituyendo la tercera causa de muerte, después del cáncer y del infarto al miocardio. La OMS estima que dentro de los próximos 25 años, esta puede llegar a ser una de las principales causas de muerte en el mundo (Gabriel A., 2007, Hart & Collazo 1998, Katalinic 2006). En Ecuador, la diabetes es la tercera causa de muerte, según los datos reportados por el Ministerio de Salud Pública de Ecuador en el 2006.

En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos antidiabéticos que aumentan la posibilidad de elección en el tratamiento, no obstante, la diabetes es una enfermedad progresiva por lo que el uso aislado de fármacos se ha vuelto insuficiente, siendo necesario el apoyo de la medicina natural como una terapia alternativa. (García B., 2002, Mishara 2005, Tlacuilo 2007)

Las plantas, han tenido un papel fundamental en el hombre como: fuente de alimento, medicinas, combustible, materiales de construcción y herramientas de todo tipo; incluso han ocupado un lugar importante en las creencias y ritos (De la torre *et al.*, 2008). Además tienen propiedades medicinales, algunas actúan como: antisépticos, analgésicos, estimulantes sobre el sistema nervioso, entre otros. Los principios activos tales como: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos), carotenoides, etc., sirven para aliviar diferentes afecciones causadas por organismos patógenos como:

bacterias, virus, hongos o protozoos, también sirven para curar heridas, lesiones y desórdenes del metabolismo (Gonzales *et al.*, 2000, Ugartondo 2009, De la torre *et al.*, 2008).

En la presente investigación se ha considerado el estudio de la especie vegetal *Oreocallis grandiflora*, debido a que estudios preliminares realizados en la Planta de Productos Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja, indican actividades relevantes, tanto antihiper glucemiante como antioxidante que ameritan ser profundizadas mediante estudios fitoquímicos y de bioactividad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Realizar el fraccionamiento biodirigido (in vitro) de sustancias antioxidantes y antihiper glucemiantes a partir de la especie vegetal *Oreocallis grandiflora*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la capacidad antihiper glucemiante del extracto metanolico, hexanico y acetato de etilo de la planta *Oreocallis grandiflora* mediante ensayos de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa.
- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanolico, hexanico y acetato de etilo de la planta *Oreocallis grandiflora* mediante DPPH y β -CLAMS
- Aislar mediante el método de fraccionamiento (cromatografía de capa fina y de columna) los compuestos de la planta *Oreocallis grandiflora*.

1.1 FIN DEL PROYECTO

Determinar la capacidad antioxidante y antihiper glucemiante de cada uno de los extractos (metanòlico, hexanico y de acetato de etilo) de la especie *Oreocallis grandiflora*, realizar el fraccionamiento en cromatografía de columna para determinar los componentes del extracto y así contribuir de alguna manera en la investigación para la síntesis de nuevos agentes hipoglucemiantes.

1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO

- Determinar el efecto antioxidante y antihiper glucemiante de los extractos (metanòlico, hexanico y acetato de etilo) obtenidos de la especie *Oreocallis grandiflora* (cucharillo), y los resultados expresarlos mediante la concentración inhibitoria media (IC_{50})
- Identificar los metabolitos secundarios mediante el fraccionamiento en cromatografía de columna del extracto.

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

- Obtención de los extractos tanto en metanol, hexano y acetato de etilo de la *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo).
- Determinación de la actividad antioxidante y antihiper glucemiante de los extractos (metanòlico, hexanico y de acetato de etilo)
- Fraccionamiento del extracto de la especie *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo).

1.4 HIPÓTESIS DEL PROYECTO

H0: El extracto metanólico, hexánico y acetato de etilo de la planta *Oreocallis grandiflora* SI tiene sustancias con actividad antioxidante y antihiper glucemiante.

H1: El extracto metanólico, hexánico y acetato de etilo de la planta *Oreocallis grandiflora* No tiene sustancias con actividad antioxidantes ni antihiper glucemiante

DISEÑO EXPERIMENTAL

En la presente investigación se utilizó un diseño al azar teniendo como variable independiente la concentración del extracto (metanol, hexano y acetato de etilo) y como variable dependiente la capacidad inhibitoria de los extractos expresada en % de inhibición (INH).

Los resultados obtenidos en los ensayos de los extractos, nos determinara, cual tiene mejor actividad antioxidante y antihiper glucemiante, para realizar el fraccionamiento.

2. FUNDAMENTO TEORICO

2.1. LA DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus (DM) llamada también diabetes sacarina, se define como una enfermedad progresiva crónica, que constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de los hidratos de carbono, que alteran también al metabolismo lipídico y proteico (Hart & Callazo 1998; Ramos *et al.*, 2006, Delgado 2007). Esta enfermedad se caracteriza por la elevada concentración de glucosa en la sangre, debido a que el organismo no produce suficiente insulina; hormona que es segregada por el páncreas y juega un papel importante en el control de los niveles plasmáticos de glucosa (Ver fig. 1) (Ramos *et al.*, 2006).

Los síntomas principales que se presentan en la diabetes son: sensación de mucha sed, producción de grandes cantidades de orina, cansancio y pérdida de peso. Otros síntomas que se pueden presentar son: picazón alrededor de la vagina o el pene y visión borrosa, sin embargo los síntomas varían dependiendo del tipo de diabetes.

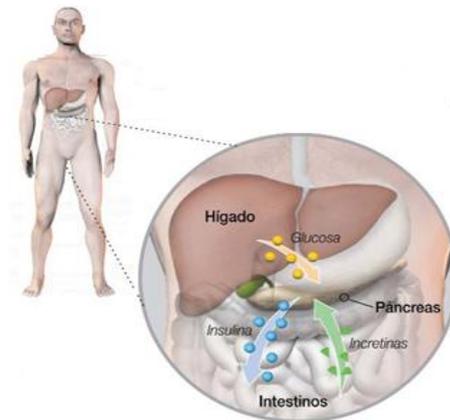


Fig. 1 Diabetes Mellitus
Fuente: Álvarez G 2007.

2.1.1 TIPOS DE DIABETES

Existen varios tipos de diabetes que se clasifican en: Diabetes tipo 1 (dependiente de insulina), diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina), diabetes gestacional y otros tipos. (Ruiz A 2004, Rosales 2006).

2.1.1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes tipo 1 se presenta sobre todo en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Esto es a consecuencia de que el organismo no produce insulina todos los días, debido a que se destruyen las células del páncreas. El problema consiste en que el organismo reconoce erróneamente como ajeno un tejido propio y lo destruye, entonces se produce una falta absoluta de insulina lo que origina que aumente la glucosa.

La diabetes tipo 1 afecta a las personas que suelen tener predisposición genética. Sin embargo, esta enfermedad puede producirse por varias causas, entre ellas están las infecciones víricas o el estrés. Además las personas que viven con esta enfermedad no tienen cura, pero se puede controlar con la administración de insulina (Ministerio de Salud Pública 2004, Arellano Martha 2005, Instituto Mexicano del Seguro Social 2008).

2.1.1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes tipo 2 es la más frecuente y es una enfermedad dependiente o no de insulina ya que las células del páncreas no producen suficiente insulina o la cantidad que es producida no es capaz de mover la glucosa de la sangre a las células. Se da principalmente en las personas con sobrepeso, se presentan complicaciones como: que afecte la cantidad de energía que procesa el organismo, daño en los ojos (ceguera), problemas cardiovasculares (ataques cardíacos y accidentes cerebro vasculares), renales, amputaciones, entre otras (Ramos *et al*, 2006; García, 2002, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2008).

En la diabetes, tanto en la tipo 1 como en la tipo 2, una vez iniciada la insulino terapia, suele continuarse toda la vida del enfermo (Joan *et al* 2004, Muñoz 2006). Asimismo, el tratamiento adecuado es la alimentación (Fig. 2) que juega un papel importante en el control de esta enfermedad, además de la dieta balanceada también es necesaria una actividad física, que se ajuste a las necesidades, horarios, gustos, estilo de vida, y de acuerdo horario de administración de la insulina. (Álvarez, 2007)

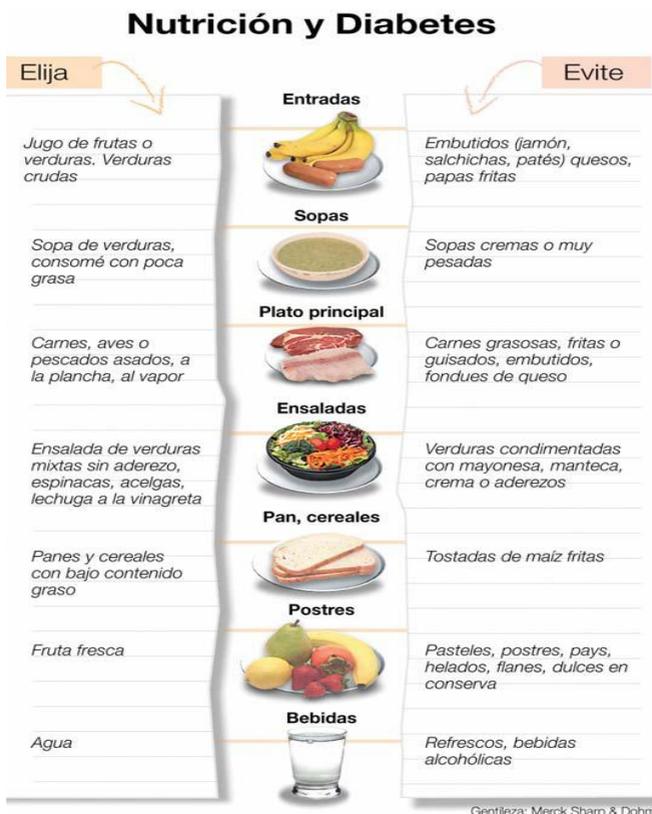


Fig. 2 Pirámide nutricional para diabéticos
Fuente: Álvarez G., 2007

DIABETES GESTACIONAL

La diabetes gestacional se diagnostica en el embarazo, generalmente durante la semana 24 y 28 (alrededor de los 6 meses), desaparece cuando nace el bebé; se debe a que la placenta produce varias hormonas que se oponen al efecto de la insulina y producen un incremento en los niveles de glucosa. La diabetes gestacional produce algunas complicaciones tanto en el bebé como en la madre. En el bebé puede tener un crecimiento acelerado en el útero y pesar más de 4 kg al momento de nacer (lo que dificulta el parto y hace necesario realizar una cesárea en algunos casos), también pueden presentar bajas de glucosa después del nacimiento, dificultad respiratoria, aumenta el riesgo de partos prematuros, muertes fetales, en la madre se asocia a hipertensión del embarazo (o preeclampsia) y diabetes mellitus después del embarazo o que esta situación se repita en los embarazos subsecuentes. El tratamiento se inicia con una dieta especial, que permite a la madre y al bebé ganar peso de manera saludable sin afectar los niveles de glucosa y se recomienda también un programa de ejercicio moderado y si siguen elevados los niveles de glucosa, se agrega un plan de insulina (Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, 2004).

DIABETES INSÍPIDA

La diabetes insípida no se relaciona ni con la diabetes tipo 1 ni con la diabetes tipo 2. Las personas con diabetes insípida tienen sed todo el tiempo y tienen que orinar con mucha frecuencia. Esta enfermedad se da cuando el hipotálamo no produce suficiente hormona antidiurética (ADH), por lo que los riñones no reabsorben el agua, además, puede ser causada por una cirugía, infección, inflamación, traumatismo craneal o tumor. En el tratamiento se utiliza un medicamento llamado desmopresina que puede ayudar y ésta es como la ADH que su cuerpo produce (Institutos Nacionales de la Salud 2007, family doctor.org, 2009)

Existen algunos síndromes o enfermedades que están relacionadas con las alteraciones en la concentración de glucosa sanguínea, entre ellos tenemos: enfermedades del páncreas exocrino (pancreatitis, neoplasias, fibrosis quísticas), endocrinopatías (Acromegalia, síndrome de cushing) y síndromes genéticos (síndrome de Down, síndrome de Turner) (Vásquez A, 2009)

Sin embargo, al ser la diabetes una enfermedad progresiva, el uso de fármacos convencionales se ha vuelto insuficiente por ello la mayoría de personas recurre al uso de plantas medicinales como una terapia alternativa, puesto que las plantas medicinales contienen sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos entre ellos: flavonoides, taninos, vitaminas, alcaloides, saponinas, ácidos grasos esenciales, glucósidos, grasas, sustancias amargas, fibra y agua (Tlacilo & Acosta 2007; García *et al.*, 2002, Mishara 2005), además son una fuente de antioxidantes que podrían utilizarse para prevenir el deterioro oxidativo gracias a su capacidad de secuestrar radicales libres (Aquino *et al.*, 2001).

2.2 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se definen como compuestos cuya acción consiste en inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones en cadenas de los RL (radicales libres). Los antioxidantes se dividen en dos categorías principales que son: antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos. (Ugartondo 2009, Gutiérrez *et al.*, 2008, Muñoz *et al.*, 1999, Vásquez *et al.*, 2007)

Los antioxidantes sintéticos, son compuestos de estructuras fenolicos con varios grados de sustitución, altamente inestables, mientras que los antioxidante naturales son producidas en el cuerpo o pueden ser suplementadas por una dieta rica en vitaminas, minerales y enzimas. (Ugartondo 2009, Gutiérrez *et al.*, 2008, Muñoz *et al.*, 1999, Vásquez *et al.*, 2007)

Los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos, aminas), carotenoides, y el ácido ascórbico. Muchos de los antioxidantes naturales, en especial los fenólicos, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores.

El estudio de las propiedades antioxidantes de los vegetales utilizados en la alimentación humana y animal provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, ya que se ha demostrado el efecto antioxidante en productos naturales provenientes de las plantas. (Ugartondo 2009, Gutiérrez et al., 2008, Muñoz et al., 1999, Vásquez et al., 2007)

Los antioxidantes en general, pueden clasificarse en: Antioxidantes primarios, antioxidantes secundarios y antioxidantes terciarios (Ugartondo, 2009)

2.2.1 ANTIOXIDANTES PRIMARIOS: Constituyen la primera línea de defensa aerobio y reacciona directamente con los radicales libres para evitar la formación de nuevos radicales a partir de otras moléculas:

- **Superoxido dismutasa (SOD):** Cataliza la conversión de O_2 en peróxido de hidrogeno.
- **Glutation Peroxidasa (GPx):** Convierte el peróxido de hidrogeno y los peróxidos lipídicos en moléculas antes de que formen radicales libres.

2.2.2 ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS: Constituyen la segunda línea de defensa capturando los radicales evitando las reacciones en cadena, entre ellos tenemos: Vitamina E y Vitamina C, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina. (Ugartondo, 2009)

2.2.3 ANTIOXIDANTES TERCIARIOS: Son aquellos que reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres (Ugartondo, 2009)

2.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de los radicales libres (RL) de oxígeno y la acción de los antioxidantes. Los RL son moléculas que tienen en su estructura atómica uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable, con gran capacidad de formar otros radicales libres. Una vez generados los RL se unen rápidamente a otro RL, cediendo o arrancando, un electrón a una estructura molecular, con el fin de estabilizarse (Fito M, 2003) (ver fig. 3)

En nuestro organismo se generan muchos tipos de RL, entre los más conocidos los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) (ver tabla1), como nombre común para referirse a las especies derivadas de oxígeno incluyendo los derivados de los radicales como los no radicales (agentes oxidantes). (Ugartondo, 2009)

	ROS	Símbolo
Radicales	Anión superóxido	O_2^-
	Hidroxilo	OH
	Alcóxido	RO^\cdot
	Peróxido	ROO^\cdot
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Ácido hipocloroso	$HClO$
	Ozono	O_3
	Oxígeno singulete	$^1\Delta O_2$

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)
Fuente: Carrera, 2004.

Los RL pueden generarse a partir de fuentes endógenas o de fuentes exógenas, aunque la exposición de los ROS, que proceden de las fuentes endógenas, es más importante y extensa, debido a que se da, de forma continua en las células de nuestro organismo, a lo largo de la vida. En las fuentes endógenas tenemos: respiración aerobia, células fagocíticas, peroxisomas, enzimas del citocromo p450; y en las fuentes exógenas están: el óxido de nitrógeno, sales de hierro y cobre, alimentos. El exceso de RL en cualquier estructura biológica que lo integra puede causar daño en el DNA, proteínas, lípidos y además es común relacionar el daño provocado por las especies reactivas con algunas enfermedades humanas como: cáncer, diabetes, enfermedades pulmonares, Alzheimer, etc.

Múltiples estudios se han desarrollado para identificar diversas plantas con actividad antioxidante, hipoglucemiante y que inhiben la glucosilación de las proteínas, con las cuales se pueden

proteger a los pacientes del estrés oxidativo. La científica Rosa Martha Pérez Gutiérrez, descubrió que las plantas *Roumarinus Officinales*, *Solpanthius Arenarius* y *Pipper Auritum*, entre otras, contienen propiedades que tienen acción preventiva o de tratamiento de patologías, donde el estrés oxidativo y la glucosilación de las proteínas juegan un papel importante en las complicaciones de la diabetes (Universidad de México, 2009).

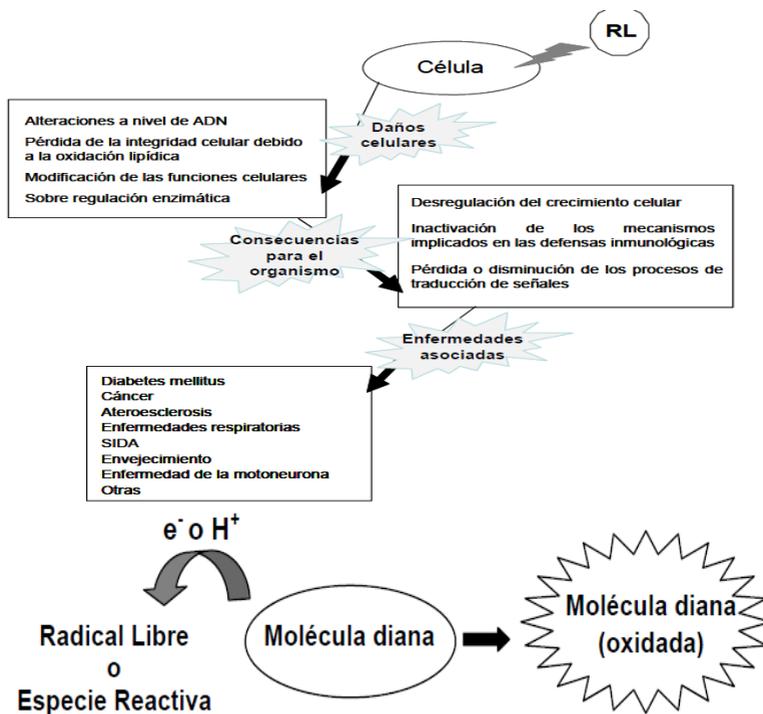


Fig. 3. Mecanismo de ataque y daño producido por RL.
Fuente: Ugartondo, 2009

Los RL no causan daño cuando están en equilibrio, si no que participan activamente en la regulación de varios procesos fisiológicos como: crecimiento celular, reacciones químicas y control de la homeostasis, asimismo gracias a ellos es posible la relajación muscular, dilatación de vasos sanguíneos, además

forma parte del mecanismo de defensa llevado a cabo por las células fagocíticas. Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño producido por los RL (desequilibrio) o especies reactivas, los organismos aerobios han desarrollado un mecanismo de defensa llamado antioxidante (Ugartondo 2009, Fito 2003).

2.4 DESCRIPCION BOTÁNICA, TAXONÓMICA Y FITOQUIMICA DE LA ESPECIE

2.4.1 BOTÁNICA

Oreocallis grandiflora, es un árbol o arbusto pruinoso mide entre 3 a 5 m de altura sus raíces son horizontales, su tallo es cilíndrico de corteza lisa en plantas jóvenes y plantas maduras es rugoso de color café oscuro y en bosques naturales pueden llegar a medir entre 10 y 15 cm de diámetro. Las hojas son coriáceas ovaladas de peciolo alargado dispuesta en espiral, su haz verde brillante y envés glauco. Forma inflorescencias que miden entre 12-14 cm y tiene entre 60 y 80 flores de color blanco rojizas o violáceas; el limbo es globoso con los segmentos separados; las anteras son ovadas; posee un ovario espeditado, con numerosos óvulos imbricados en dos series; estilo largo, oblicuo disciforme en el ápice y con un pequeño orificio estigmático. El folículo es oblongo-cilíndrico, largamente estipitado, coriáceo, pruinoso y mide entre 7- 10 cm, sus semillas son numerosas y aladas. (Sánchez, 2005)



Foto 1: *Oreocallis grandiflora*
Fuente: Autora

2.4.2 TAXONOMIA

La jerarquización taxonómica de la especie es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Proteales

Familia: Proteaceae

Género: *Oreocallis*

Especie: *grandiflora* (Lam.) R. Br.

2.4.3 NOMBRES COMUNES

El *Oreocallis grandiflora* se la conoce como: chilla, wallway (kichwa), cucharilla, cucharillo, gañil (castellano), galuay, gamial (lenguaje no especificado). (Sánchez, 2005)

2.4.4 FITOQUIMICA

No existen estudios concluyentes sobre las sustancias químicas de interés. Los géneros *Protea* y *Faurea* son peculiares en utilizar xilosa como el principal azúcar de su néctar y por presentar altas concentraciones de poligalactol, mientras que la sacarosa es el principal azúcar presente en *Grevillea*. (Sánchez, 2005).

2.4.5 DISTRIBUCION GEOGRAFICA

El género *Oreocallis* está distribuido, en el este de Australia y desde el norte de Perú hasta el centro de Ecuador.

En Ecuador crece entre los 1000 y 4000 m s.n.m., se han registrado en las provincias de Azuay, Guayas, Loja y Zamora Chinchipe. (Sánchez, 2005)

2.4.6 PROPAGACION

La propagación de esta especie es por semilla, no obstante ha mostrado poca capacidad de enraizamiento. Igualmente esta especie crece en suelos arcillosos, y en lugares con una temperatura entre los 10°C y 20°C, con precipitaciones anuales entre 600 y 2000 mm (Sánchez, 2005).

2.4.7 ESPECIES ASOCIADAS

Generalmente se encuentra en las partes altas de la zona de influencia asociado con *Pteridium arachnoideum* (llashipa), *Arcytophyllum rivetii* (romerillo), *Kypericum decandrum*, *Gaultheria erecta*, *Brachyotum campanuloare*, *Gaultheria tomentosa* (manzano), *Orthrosanthus chimboracensis*, *Gaultheria reticulata* y *Cacosmia rugosa*. Igualmente entre las herbáceas más comunes asociadas están *Calamagrostis intermedia* (paja),

Shyzachyrium condensatum, *Paspalum bonplandianum*, *Stevia bertholdii* y *Eryngium humile*.

También encontramos algunos insectos y aves que se encuentran asociadas con esta especie entre ellas tenemos: *Apis melífera* (abeja), Avispa. *Coeligena iris* (quinde), *Ensifera ensifera* (quinde), *Coeligena torquata* (quinde), *Tardus fuscater* (mirlo). (Sánchez, 2005)

2.4.8 USOS

Empíricamente se emplean las hojas, los frutos y las flores de la planta para tratar: hernias, dolencias hepáticas, afecciones del tracto intestinal, colesterol, nefritis, diabetes, ulcera gástrica, inflamaciones, problemas de los ojos, y la gripe (De la torre *et al.*, 2008, Sánchez, 2005)

Modo de uso: emplasto, infusión, astringente, macerados. (De la torre *et al.*, 2008, Sánchez, 2005)

2.4.9 MECANISMOS DE ACCION ANTIHIPERGLUCEMIANTE

El mecanismo de acción por los cuales las plantas disminuyen el nivel de glucosa en la sangre puede ser atribuido a alguno de los siguientes factores: Aumento en la liberación de insulina a través de la estimulación de las células β -pancreáticas, resistencia a las hormonas que aumentan el nivel de glucosa, el número y sensibilidad de sitios receptores de insulina, disminución de la pérdida de glucógeno, aumento del consumo de glucosa en los tejidos y órganos, eliminación de radicales libres, resistencia a la peroxidación de lípidos, estimulación o aumento de micro circulación de sangre en el organismo (Negri G, 2005)

2.5 METODOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERGLUCEMIANTE

2.5.1 ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCEMIANTE

Las enzimas α -amilasa (1,4- α -D-glucano-glucanohidrolasa; glucogenasa) y α -glucosidasa (α -D-glucoside glucohydrolase), se encuentran dentro del grupo de las hidrolasas. La α -amilasa fragmenta los almidones complejos en oligosacáridos, mientras que en la superficie intestinal la α -glucosidasa fragmenta oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos en glucosa y otros monosacáridos para su absorción. Los inhibidores de las glucosidasas se unen a las glucosidasas intestinales e inhiben la acción, su administración junto con los alimentos produce una interferencia de la hidrólisis de los oligosacáridos y de los disacáridos, disminuyendo y retardando su absorción (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2007)



El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática fue calculado por:

$$\%INH = 100 \{1 - [(B - D) / (A - C)]\}$$

Donde:

B = absorbancia de la muestra

D = absorbancia del blanco (sin enzima)

A = absorbancia del control 1 (sin inhibidor)

C = absorbancia del control 2 (sin inhibidor y sin enzima)

INH= inhibición

Los datos pueden ser evaluados mediante un análisis de regresión logística-modelo Logit (Takahiro y Takeshi, 2006), con un intervalo de confianza del 95%, para ello se utilizó el programa XLSTAT (ANOVA)

2.5.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.5.2.1 TECNICA DPPH

La técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se basa en la reducción del radical (DPPH• a la forma DPPH-H) por acción de una sustancia antioxidante. El progreso de la reacción es medida a 515 nm y luego por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre.

DPPH• (púrpura) + (AH)_n DPPH-H (amarillo) + (A•)_n

El porcentaje de inhibición de DPPH• fue calculado por:

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

Donde:

A_o = absorbancia obtenida con el control negativo

A_c = absorbancia producida por una concentración dada de estándar o de extracto.

INH= inhibición

Los datos pueden ser evaluados mediante un análisis de regresión logística-modelo Logit. (Martínez J 2007, Pestchanker *et al*, 1990, Roberta *et al*, 1998) con un intervalo de confianza del 95%, para ello se utilizó el programa XLSTAT (ANOVA)

2.5.2.2 TECNICA β -CLAMS

El ensayo de β -CLAMS (β -carotene linoleate model system) se basa principalmente en la oxidación del ácido linoleico, que es un ácido graso insaturado, gracias a las ROS producidas por el agua oxigenada. Los productos formados inician la oxidación del caroteno, el cual se decolora. Esta decoloración se previene por la acción de sustancias antioxidantes las cuales disminuyen la decoloración según sea su capacidad antioxidante, de tal manera que a mayor decoloración producida, menor será la capacidad antioxidante y viceversa. (Murthy *et al.*, 2005)

La actividad antioxidante del β -CLAMS se expresa como factor de protección (APF) y se calcula con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Antioxidant protection factor (APF)} = \{(A_c - A_e)/A_c\} \times 100$$

Donde:

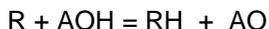
A_c =Absorbancia del control negativo ($A_{ct=0} - A_{ct=120}$)

A_e =Absorbancia del extracto a diferentes concentraciones ($A_{et=0} - A_{et=120}$).

Los datos de la absorbancia se toman al inicio y después de 2 horas.

2.5.2.3 TECNICA FOLIN

El método de FOLIN determina la concentración de fenoles totales en los extractos, mediante la espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción (Gracia M., 2005, Rodríguez M., 2009), donde la intensidad del color es proporcional a la concentración de polifenoles. Es un método simple, preciso y sensible pero que sin embargo sufre numerosas variaciones cuando es aplicado por diferentes grupos de investigación, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de muestra, concentraciones de reactivos, tiempos y temperaturas de incubación (Rodríguez M., 2009)



El mecanismo de protección de los polifenoles ocurre en el estado inicial y más efectivamente durante el estado de propagación de la oxidación, por captura de radicales libres (R), inhibiendo la reacción en cadena. La transferencia de electrones desde el (R) determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes. La técnica de FOLIN se expresa en mg de equivalentes de ácido gálico por gramos de peso seco del extracto (Kim, 2003).

2.6 METODOS DE FRACCIONAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

2.6.1 CROMATOGRAFIA DE COLUMNA

La cromatografía de columna es una técnica utilizada para separar los componentes basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas (Espino 2009). La polaridad es la clave para obtener una buena separación, donde los disolventes más polares arrastran más fácilmente a los compuestos es decir corren más, mientras que de los de poca polaridad desplazan los compuestos a través de la columna con mayor lentitud.

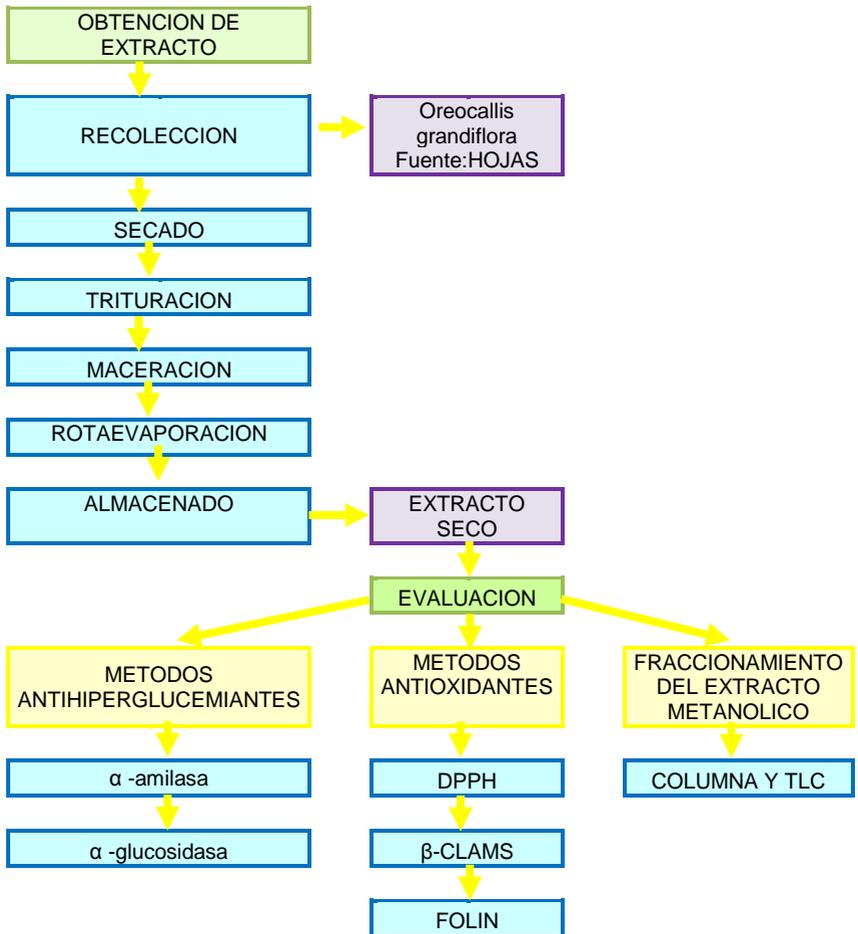
2.6.2 CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

Es una técnica muy utilizada en laboratorios para análisis, debido a que sirve para separar e identificar iones mediante manchas las cuales son reveladas con lámparas fluorescentes (Gutiérrez M.C., 2002). El método para medir el desplazamiento entre la distancia recorrida por el compuesto se denomina RF, dato que es propio para cada principio activo.

$$RF = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

3. MATERIALES Y METODOS

Diagrama de Flujo del trabajo de Investigación.



3.1 RECOLECCIÓN

La especie vegetal *Oreocallis grandiflora* (cucharillo) fue recolectada en el cantón Saraguro en las coordenadas: 17686765 E, 9602527N a una altura de 2916m.s.n.m. La misma que fue identificada y depositada en el herbario de Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja.

3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se empleó las hojas, las mismas que fueron sometidas a 3 extracciones sucesivas: hexano, acetato de etilo y metanol; cada una de las extracciones fueron maceradas por un tiempo de 5 horas, a una relación solvente: planta (10:1). Luego se filtró y rota evaporó, hasta obtener el extracto seco. Finalmente se almacenó a 4°C, hasta su posterior empleo.

3.3 PRUEBAS ANTIHIPERGLUCEMIANTE

3.3.1 INHIBICIÓN DE α -AMILASA

Para este ensayo se prepararon 5 concentraciones (1000, 500, 100, 50 y 10 ug/ml), de los extractos metanólico, hexánico, acetato de etilo y del control positivo glucobay 50 (2000, 1000, 500, 100, y 50 ug/ml). Procedemos a hacer el ensayo de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 2., finalmente, procedemos a la lectura de la absorbancia a 540 nm.

Tabla 2. Determinación de la actividad inhibitoria de α -amilasa

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE α-AMILASA				
SOLUCIONES	MUESTRA	BLANCO	CONTROL 1	CONTROL 2
INHIBIDOR (Glucobay o extracto)	125 ul (extracto)	125 ul (Glucobay)	-	-
H₂O	-	-	125 ul	125 ul
SUSTRATO	125 ul	125 ul	125 ul	125 ul
Mezclar por inversión e incubar a 20-25 °C por 5 min				
ENZIMA	125 ul	-	125 ul	-
H₂O	-	125 ul	-	125 ul
Mezclar por inversión e incubar a 20-25 °C por 3 min				
DNS	125 ul	125 ul	125 ul	125 ul
Llevar a ebullición por 15 min y luego enfriar en baño de hielo				
H₂O	2000 ul	2000 ul	2000 ul	2000 ul
Mezclar por inversión y leer en espectrofotómetro a 540 nm				

Fuente: Autora

Sustrato: almidón

Enzima: α -amilasa pancreática

DNS: Solución Disulfato monobásico

Inhibidor: glucobay o extracto

3.3.2 INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

Para este ensayo se prepararon 5 concentraciones (1000, 500, 100, 50 y 10 ug/ml), el los extractos metanòlico, hexanico, acetato de etilo y del control positivo glucobay 50 (2000, 1000, 500, 100 y 50 ug/ml). Inmediatamente procedemos hacer el ensayo de acuerdo a las condiciones establecidas en la Tabla 3., finalmente, procedemos a la lectura de la absorbancia a 400 nm.

Tabla 3. Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE α-GLUCOSIDASA				
SOLUCIONES	MUESTRA	BLANCO	CONTROL 1	CONTROL 2
INHIBIDOR (glucobay o extracto)	35 ul extracto	35 ul glucobay	-	-
ENZIMA	35 ul	-	35 ul	-
H₂O	-	35 ul	35 ul	70 ul
Mezclar por inversión e incubar a 37 °C por 5 min				
SUSTRATO	930 ul	930 ul	930 ul	930 ul
Mezclar por inversión e incubar a 37 °C por 15 min				
TRIS	1000 ul	1000 ul	1000 ul	1000 ul
Mezclar por inversión y leer en espectrofotómetro a 400 nm				

Fuente: Autora

Sustrato: PNP-G

Enzima: α -glucosidasa

DNS: Solución Disulfato monobásico

Inhibidor: glucobay o extracto

3.4 PRUEBAS ANTIOXIDANTES

3.4.1 ENSAYO DE DPPH

Para este ensayo se prepararon 5 concentraciones (500, 100, 50, 10, 5 ug/ml), de los extractos metanòlico, hexanico, acetato de etilo y del control positivo α -Tocoferol (10, 5, 1, 0.5 y 0.1 ug/ml) . Inmediatamente procedemos hacer el ensayo de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 4, finalmente, procedemos a la lectura de la absorbancia a 515 nm.

Tabla 4. Determinación de la actividad antioxidante DPPH

Método DPPH				
SOLUCIONES	MUESTRA	BLANCO	CONTROL (+)	CONTROL (-)
METANOL	-	1960 ul	-	40 ul
α -TOCOFEROL	-	-	40 ul	-
DPPH	1960 ul	-	1960 ul	1960 ul
EXTRACTO	40 ul	40 ul	-	-
Dejar reaccionar a T ambiente por 15min Leer en espectrofotómetro a 515 nm				

Fuente: Autora

3.4.2 ENSAYO DE β -CLAMS

Para este ensayo se prepararon 5 concentraciones (100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ug/ml), de los extractos metanòlico, hexanico, acetato de etilo y del control positivo (α -Tocoferol). Inmediatamente procedemos hacer el ensayo de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 5, finalmente, procedemos a la lectura de la absorbancia a 470 nm.

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante β -CLAM

Método β -CLAMS				
SOLUCIONES	MUESTRA	BLANCO	CONTROL (+)	CONTROL (-)
EMULSIÓN	1960 ul	-	1960 ul	1960 ul
EXTRACTO	40 ul	40 ul	-	-
α -TOCOFEROL	-	-	40 ul	-
METANOL	-	-		40 ul
Leer en espectrofotómetro a 470 nm (t = 0 min) Incubar a 50 °C por 120 min y volver a leer en espectro a 470 nm (t = 120 min)				

Fuente: Autora**Emulsión:** β -caroteno, ácido linoleico, tween y H₂O₂

3.4.3 ENSAYO DE FOLIN

Para este ensayo se prepararon 5 concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 μ g/ml), de los extractos metanólico, hexánico, acetato de etilo y del control positivo (trolox). Inmediatamente procedemos hacer el ensayo de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 6, finalmente, procedemos a la lectura de la absorbancia a 760 nm.

Tabla 6. Determinación de la actividad antioxidante FOLIN

Método FOLIN				
SOLUCIONES	MUESTRA	BLANCO	CONTROL (+)	CONTROL (-)
EXTRACTO	250 ul	250 ul	-	-
TROLOX	-	-	250 ul	-
H ₂ O DESTILADA	1500 ul	1625 ul	1500 ul	1750 ul
FOLIN 1N	125 ul	-	125 ul	125 ul
Mezclar y dejar reposar 5min				
Na ₂ CO ₃	250 ul	250 ul	250 ul	250ul
Mezclar y dejar reposar 2 horas Leer en espectrofotómetro a 760 nm				

Fuente: Autora

3.5 FRACCIONAMIENTO DE DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA ESPECIE *Oreocallis grandiflora*

Se monto una columna con silica gel 60 en una proporción 50/50 de silica: extracto; como fase móvil se uso solventes de polaridad creciente hexano-acetato de etilo (100:0 hasta 0:100) y acetato de etilo-metanol (100:0 hasta 0:100).

Luego se procedió a realizar a cada una de las fracciones una TLC (una placa de silica gel 60 F₂₅₄), de fase directa, usando como fase móvil de proporción 1:1 (hexano: acetato de etilo) y finalmente 1:1 (acetato de etilo: metanol), visualizar con luz UV de 254 y 366 nm, se reveló la placa de silica gel (acido sulfúrico y vainillina)

4. RESULTADOS

4.1 PRUEBAS ANTIHIPERGLUCEMIANTE

4.1.1 INHIBICIÓN DE α -AMILASA

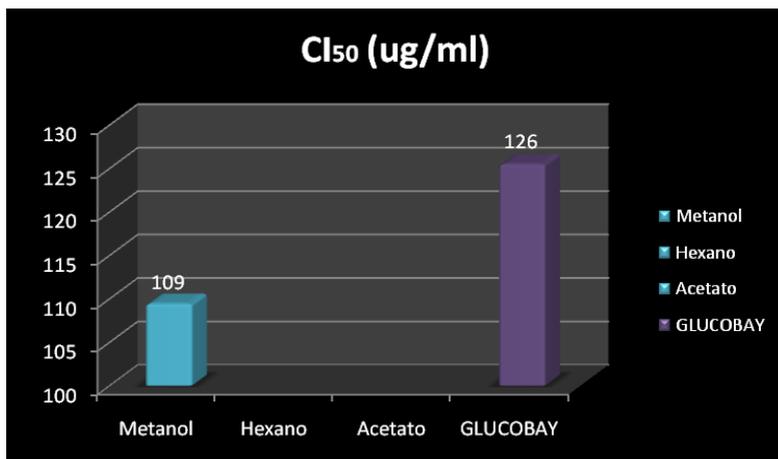
A continuación se muestra el resumen de los porcentajes observados de inhibición de la enzima α -amilasa del extracto metanólico y del control positivo.

EXTRACTO METANOLICO		GLUCOBAY	
CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN	CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN
10	0,0 \pm 0,0	50	16,4 \pm 4,9
50	42,7 \pm 3,7	100	57,6 \pm 4,6
100	55,8 \pm 4,0	500	77,0 \pm 1,2
500	75,6 \pm 3,1	1000	92,4 \pm 4,0
1000	85,2 \pm 3,5	2000	96,6 \pm 1,7

Los datos de los extractos hexanico y acetato de etilo no se presentan ya que no presentaron actividad importante.

El Grafico 1 muestra el efecto antihiperglucemiante (IC_{50}) de los extractos (metanólico, hexanico y acetato de etilo) y el control glucobay, luego de realizar el análisis estadístico XLSTAT (ANOVA)

Grafico 1. Capacidad de inhibición de los extractos metanólico, hexanico y acetato de etilo frente al control Glucobay.



Fuente: Autora

4.1.2 INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

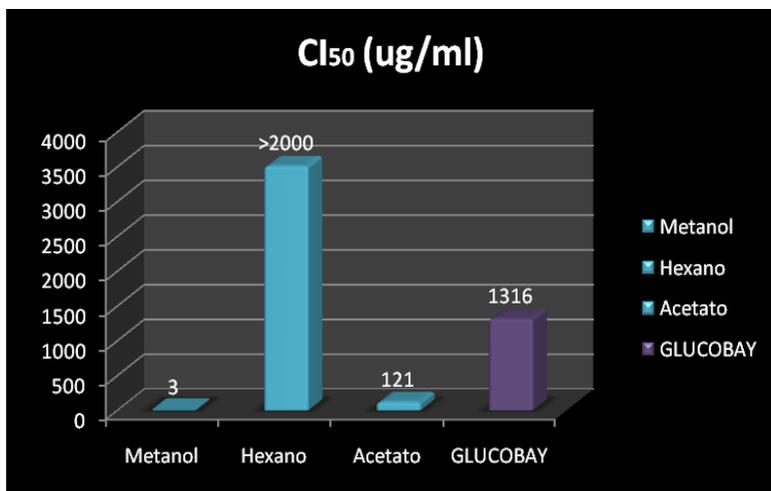
A continuación se muestra el resumen de los porcentajes observados de inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico, hexanico, acetato de etilo y del control positivo.

EXTRACTO ACETATO DE ETILO		EXTRACTO HEXANICO	
CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN	CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN
10	16,6±3,9	10	0,3±0,3
50	34,3±4,0	50	0,3±0,3
100	52,1±4,9	100	12,4±,9
500	70,3±2,0	500	19,0±1,1
1000	77,2±3,1	1000	25,6±3,9

EXTRACTO METANOLICO		GLUCOBAY	
CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN	CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN
1	1,1±1,8	50	0,5±0,3
5	79,5±3,0	100	8,6±3,4
10	90,0±2,4	500	20,5±6,7
50	97,1±1,8	1000	36,2±1,9
100	99,6±0,6	2000	61,6±1,6

El Grafico 2 muestra el efecto antihiper glucemiante (IC_{50}) de los extractos (metanólico, hexanico y acetato de etilo) y el control glucobay, luego de realizar el análisis estadístico XLSTAT (ANOVA)

Grafico 2. Inhibición de la α -glucosidasa con los extractos metanólico, hexanico y acetato de etilo frente al control Glucobay



Fuente: Autora

4.2 PRUEBAS ANTIOXIDANTES

4.2.1 ENSAYO DE DPPH

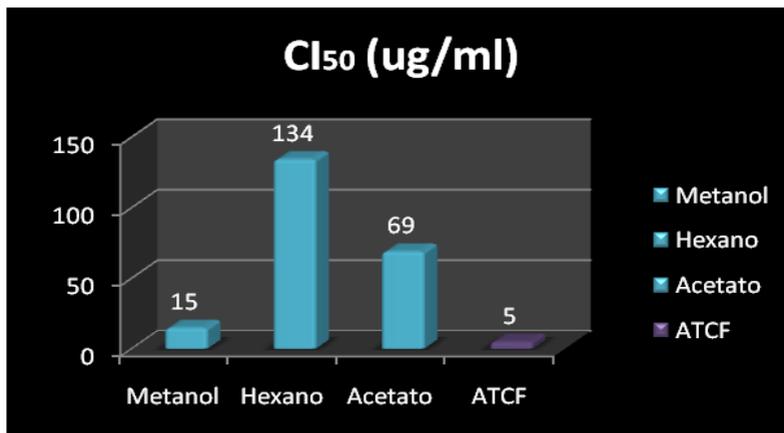
A continuación se muestra el resumen de los porcentajes observados de inhibición de la oxidación del extracto metanólico, hexánico, acetato de etilo y del control positivo.

EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO		EXTRACTO DE HEXANO	
CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN	CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN
5	8,2 ± 1,8	5	0,7 ± 0,2
10	12,7 ± 2,8	10	4,4 ± 0,4
50	33,7 ± 3,1	50	17,4 ± 0,9
100	55,0 ± 4,3	100	38,2 ± 2,6
500	97,2 ± 2,1	500	88,5 ± 4,6

EXTRACTO METANOLICO		α-TOCOFEROL	
CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN	CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN
5	18,1 ± 1,7	0,1	0,9 ± 0,5
10	31,3 ± 3,4	0,5	4,5 ± 0,5
50	90,1 ± 3,6	1	9,4 ± 1,8
100	96,0 ± 0,2	5	41,6 ± 1,0
500	96,6 ± 0,3	10	81,7 ± 2,0

El Grafico 3 muestra el efecto antioxidante (IC_{50}) de los extractos (metanólico, hexánico y acetato de etilo) y el control α -Tocoferol, luego de realizar el análisis estadístico XLSTAT (ANOVA)

Grafico 3. Valores IC₅₀ (ug/ml) de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH con los extractos metanólico, hexanico y acetato de etilo frente al control ATCF.



Fuente: Autora

4.2.2 ENSAYO DE β -CLAMS

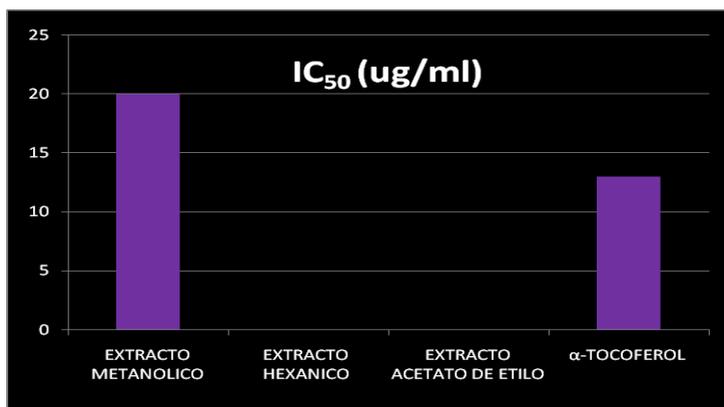
A continuación se muestra el resumen de los porcentajes observados de inhibición de la oxidación del extracto metanólico y del control positivo.

EXTRACTO METANOLICO		α -TOCOFEROL	
CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN	CONC.(ug/ml)	% INHIBICIÓN
0,01	20	0,01	13
0,1	34	0,1	44
1	29	1	51
10	23	10	71
100	32	100	63

Los datos de los extractos hexanico y acetato de etilo no se presentan ya que no presentaron actividad importante.

El Grafico 4 muestra el efecto antioxidante (IC_{50}) de los extractos metanòlico y el control α -Tocoferol, luego de realizar el análisis estadístico XLSTAT (ANOVA)

Grafico 4. Valores IC_{50} (ug/ml) de la actividad antioxidante mediante el método de β -CLAMS con los extractos metanòlico, hexanico y acetato de etilo frente al control α -tocoferol.



Fuente: Autora

4.2.3 ENSAYO DE FOLIN

Mediante el ensayo de FOLIN se determinó la presencia de compuestos fenòlicos, basado en la coloración obtenida. En la tabla 7 se muestra la cantidad de fenoles totales expresada como equivalentes en mg de acido gálico/g de muestras seca (mg AG/g M) (Bover L, 2000).

Tabla 7. Valores de la concentración de fenoles totales mediante el método de FOLIN

TESIS	Promedio	Desviación	ug AG	mg AG/g M
MUESTRA				
TROLOX	1,45933	0,00	13,58	136
H2O	0,00458	0,00	0,00	0
OREOCALLIS METANOL	1,86558	0,04	17,44	174

Fuente: Autora

4.3 FRACCIONAMIENTO DE LA COLUMNA

En las 200 fracciones recogidas, se encontró que desde la fracción 176 a la 190 se obtuvo un compuesto blanco y cristalino, con punto de fusión entre 110 a 130°C, el mismo que sigue en estudio para su identificación.

5. DISCUSIÓN

Actualmente los extractos de plantas y las diferentes clases de fitoquímicos han demostrado ser una fuente importante de compuestos con una marcada actividad antioxidante, ayudando en el control de enfermedades que implican un daño oxidativo, permitiendo así la búsqueda de nuevos antioxidantes naturales a través de investigaciones para la prevención de enfermedades como la diabetes (Ugartondo 2009, Álvarez E. *et al.*, 2008, Rivero R. & Betancourt R. 2006).

De acuerdo a los ensayos de inhibición enzimática el extracto metanólico de la especie *Oreocallis grandiflora* tiene actividad antihiper glucemiante relevante ya que tiene la capacidad de inhibir a las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa.

Cabe recalcar que la capacidad inhibitoria frente a la α -glucosidasa y α -amilasa es mayor a la que presenta el control (Glucobay), ya que la concentración de extracto requerida para inhibir el 50% de las enzimas es considerablemente menor que la requerida por el control. Esta actividad puede deberse a la presencia de enzimas hidrolasas en el extracto; a pesar de no haberse reportado estas enzimas en la especie *Oreocallis grandiflora*, se ha reportado la presencia hidrolasas en especies pertenecientes a la familia *Proteaceae*, la cual pertenece el género *Oreocallis* (De la Torre, 2008).

Con los resultados obtenidos en los métodos de: DPPH, β -CLAMS y FOLIN, se verifica la actividad antioxidante del extracto metanólico, que podría deberse a la presencia de proantocianidinas (delfinidina y cianidina), flavonoles (kaempferol, quercetina y miricetina) y arbutina, que se han reportado en la familia *Proteaceae* (Gutiérrez D., *et al* 2008).

De acuerdo a los ensayos realizados el extracto metanólico de la especie *Oreocallis grandiflora* presento actividad antihiper glucemiante, lo que podría convertirse en una fuente de nuevos productos farmacéuticos utilizados en el tratamiento de la diabetes para disminuir la secreción de los polipéptidos intestinales (Ávila Lachica, 2010)

Además presenta actividad antioxidante por lo que se puede utilizar para la creación de nuevos fármacos (jarabes, pastillas, etc.) para tratar diferentes enfermedades como: enfermedades cardiovasculares, cáncer e incluso otras que están directamente asociadas con el proceso de envejecimiento y alteraciones del sistema nervioso, así disminuir el riesgo de estas (Vacio *et al*, 2009).

También permite investigar en diferentes ramas de la ciencia (botánica, biología, química, etc.) en donde se puede encontrar o desarrollar nuevos compuestos químicos, los cuales podrían beneficiar a la sociedad para tratar diversas enfermedades presentes en la actualidad.

6. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSION

Oreocallis grandiflora conocida en nuestro medio como cucharillo, es una especie rica en compuestos fitoquímicos que pueden ser de gran uso en la medicina.

De las pruebas realizadas y resultados obtenidos, podemos concluir que el extracto metanólico presento una actividad antioxidante importante, mientras que los extractos de hexano y acetato de etilo no muestran actividad considerable.

El extracto metanólico presenta actividad antioxidante por la presencia de compuestos fenólicos, debido a la intensidad de color en la técnica de FOLIN (Coloración debido a los compuestos fenólicos). En las pruebas de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa por el extracto metanólico, los resultados indican que tiene actividad antidiabéticas.

6.2 RECOMENDACIONES

1. Utilizar celdas de cuarzo en las lecturas espectrofotométricas ya que las celdas de polietileno se rayan con facilidad, por lo que se podrían tener resultados erróneos al utilizarlas varias veces.
2. Realizar estudios en cultivos celulares para determinar los efectos de estrés oxidativo de los extractos evaluados.
3. Se recomienda seguir con el estudio del compuesto obtenido en la cromatografía para determinar la estructura química y molecular.
4. Continuar con el estudio de esta especie vegetal, mediante técnica más avanzadas y sensibles con el fin de confirmar su actividad biológica (antihiperoglucemiante y antioxidante).

BIBLIOGRAFIA

1. Álvarez Gabriel, 2007. Nuevos horizontes en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Nuestra Farmacia. No. 50
2. Aquino R., Morelli S., Lauro M.R., Abdo S., Saija A., Tomaino A. 2001. Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. *J. Nat. Prod.* 64, 1019-1023.
3. Arellano Salazar Martha Paola, 2005. La Diabetes (Mellitus) Teoría y Recomendaciones. Pág. internet: <http://www.deperu.com/diabetes/>; <http://www.deperu.com/abc/articulo.php?con=352>
4. Ávila Lachica Luis, 2010. Inhibidores alfa-glucosidasas. SAMFyC
5. BAFNA AR & MISHRA SH, 2005. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigoorchioides Gaertn.* *Ars Pharm*; 46 (2): 125-138.
6. Dastmalchi Keyvan, Dorman Damien, Koşar Müberra and Hiltunen Raimo (2007). Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. Volume 40. Pages 239-248
7. Delgado Cristian 2000. Diabetes mellitus: Aspectos fisiopatologicos, terapeuticos y clinicos. Pag internet: www.apuntesdeanatomia.com. Consultado el 28 de marzo del 2010.
8. De la torre Lucia, Navarrete Hugo, Maurie Priscilla, Macias Manuel, Balsley Henrik, 2008. Enciclopedia de las

plantas utiles del Ecuador. Herbario QCA de la escuela de Ciencias. Biologicas de la Pontificia Universidad Catolica del Ecuador & Herbario AAU del departamento de Ciencias Biologicas de la Universidad de Aarchus Quito & Aarchus. Pàg. 528

9. Fito Calomer Montserrat (2003). Efectos antioxidantes del aceite de olive y de sus compuestos fenòlicos
10. García Bacallao Lourdes, Rojo Domínguez Delia Mercedes, García Gómez Luis Vicente y. Maureen Hernández Ángel, 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. Rev Cubana Invest Biomed: 21(3):214-218
11. Gutierrez Avella Dora, Ortiz Garcia Christopher Alberto y Mendoza Cisneros Arturo, 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de metrología. Pág.:1-4
12. *Gutiérrez M.C,2002. La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes. Boletín No.122.*
13. Gutiérrez Avella Dora Marina, Ortiz García Christopher Alberto, Mendoza Cisneros Arturo., 2008. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Pág. 1 al 5
14. Gracia Nava Manuel Alejandro., 2005. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad autónoma de Queretaro.
15. Gonzalez Elizondo Martha, Lopez Enriquez Lorena, Gonzalez Elizondo Socorro, Tena Flores Jorge, 2000. Plantas medicinal y zonas aledañas. Instituto politécnico nacional de mexicoles del estado de Durango.

16. KATALINIC, V. *et al*, Screening of 70 medicinal plant extracts for capacity and total phenols. Food Chemistry, 2006. 94: p. 550–557.
17. Kwon, Y.I., et al., 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Phenolic Phytochemicals of Selected Clonal Herbs Species of Lamiaceae Family and Likely Mode Action through Proline Oxidation. Food Biotechnology, 21: p. 71-89.
18. Kwon Young-in, Apostolidis Emmanouil and Shetty Kalidas, 2006. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. Journal of food Biochemistry 3. Page 370 – 385.
19. Hart Warren y Collazo Manuel, 1998. Costos del diagnostico y tratamiento de la diabetes mellitas en diferentes países del mundo 9(3); 212 – 220.
20. Heredia Fausto, Bejaña Wilson, Moncayo Cesar, Villacreses Luisa, 2007. Definicion de red para un centro de Diagnostico y tratamiento de diabetes y prediabeticos en el IESS, Ecuador. Año 3, No.6. Pagina de internet: www.cegisutalca.cl/docs/publicaciones/FACE_ESGS_3_6.pdf
21. JoAn C. Todd, MS, RD y Karen Chapman-Novakofski, RD, LD, PhD, 2004. Diabetes tipo 2. Extensión de la Universidad de Illinois.
22. Martínez Vásquez Jesica Belina, 2007. “Evaluación de la actividad antioxidante de extractos organicos de semillas de *Helicarpus terebinthinaceus*.”
23. Muñoz Juárez M.A., Gutiérrez D.M., 2009. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana glauca*. Facultad Química, Universidad Autónoma de Queretaro.

24. Murthy, K. and C.N. Murthy, 2005. Process for preparation of extract of *Decalepis hamiltonii* having antioxidant activity, in World Intellectual Property Organization.
25. Mccue Patrick, Kwon Young-in y Shetty Kalidas, 2004. Anti-amilase anti-glucosidase and anti-angiotensin in converting enzyme potential of selected foods. *Journal of food Biochemistry* 29. Page. 278 - 294.
26. Matsui Toshiro, Ebuchi Sumi, Fujise Tomoko, Kanthi J.M., Abesundara, Doi Shima, Yamada Hideo and Matsumoto Kiyoshi, 2004. Strong antihyperglycemic Effects of Water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-triO-caffeoyquinic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 27(11) 1797 – 1803.
27. Murthy, K. and C.N. Murthy, 2005. *Process for preparation of extract of Decalepis hamiltonii having antioxidant activity*, in *World Intellectual Property Organization*.
28. Negri, G., Diabetes melito: plantas e principios activos naturales hipoglicemiantes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005. 41(2): p. 121-142.
29. PESTCHANKER, L. J. *et al*, 1990. *The sesquiterpene lactone hihidroleucodin in tissue culture from Artemisia douglasiana*. *Phytochemistry*. 29(6): p. 1853-1854.
30. Ramos Ibarra María Luisa, Batista Gonzales Cecilia Margarita, Gómez Meda Belinda Claudia, ZAMORA Pérez Ana Lourdes, 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud: VIII, No. 1: 7-15.*

31. RE, Roberta *et al*, 1998. *ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY*. Free Radical Biology & Medicine. 26(9/10): p. 1231–1237.
32. Rosales Duno Ramón (2006). Tipos de diabetes mellitus. Universidad de los Andes dirección general de cultura y extensión universitaria centro ambulatorio medico oncológico. Universidad programa educación para la salud.
33. Rodríguez Luna María (2009). Determinación de la actividad antioxidante de pétalos comestibles. Departamento de Ingeniería Química (DEQ) y Universidad Politécnica de Catalunya (UPC). Pág. 1-66
34. Ruiz López Carmen Adriana (2004). Diabetes Mellitus: Introducción y Tratamiento Farmacológico Parte II: Diabetes Mellitus II. Departamento de Química y Biología, Universidad de las Américas-Puebla
35. Sánchez O., Merino B. y Aguirre Z. 2005. Estudio ecológico formas de aprovechamiento e impactos en el cucharillo (*Oreocallis grandiflora*), en la zona de influencia de la Asociación Agro artesanal de Productores de plantas Secas medicinales del Ecuador (AAPPSME). Ecociencia/BioComercio Sostenible. Loja, Ec. 80 p.
36. Takahiro, T. and T. Takeshi, 2006. *CARBOHYDRASE INHIBITORS DERIVED FROM FAGACEOUS PLANTS AND USE THEREOF*, W.I.P. Organization, Editor.
37. Tlacuilo Morales Alejandra y Acosta Lomas Antonio, 2007. Aislamiento de nuevos principios activos a partir de plantas terrestres. infármate, año 3, número 16.

38. Ugartondo Casadevall Vanessa (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en modelos moleculares.
39. Vásquez Cárdeno Ángela, Cara Molina Mónica, Miranda Ingrid, Tafurt García Geovanna, Martínez Morales Jairo, Stashenko Ekna, 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoavolifolia*. Scientia et Technica. Año XIII, No. 33.
40. Yacio Martha Patricia, Valdez Maribel, Paredes Octavio 2009. Análisis del potencial antioxidante de huitlacoche cosechado en diferentes etapas de desarrollo. Universidad autónoma de zacateca, centro de investigación y de estudios avanzados.
41. Vásquez Mejía Antero 2009. Diabetes Mellitus. Pág. Internet:
www.slideshare.net/AnteroMD/diabetes-presentation
42. Organización Mundial de la Salud (OMS). Pág. Internet:
www.mintra.gob.pe/contenidos/discapacidad/estudio_diabetes_mellitus.pdf
43. Instituto Mexicano del Seguro Social, 2008. Pág. Internet:
www.imss.gob.mx/salud/Diabetes/Diabetes_tipo_2.htm
44. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, 2004. Pág. Internet:
www.endocrinologia.org.mx/imagenes/archivos/diabetes%20gestacional%20smne.pdf

45. Familydoctor.org, 2009. Pág. Internet:

<http://familydoctor.org/online/famdoces/home/articles/048.html>

46. Universidad de México, 2009 Pág. internet:

<http://noticias.universia.net.mx/ciencianntt/noticia/2009/08/21/13955/descubre-cientifica-ipn-principio-activo-plantas.html>

47. Institutos Nacionales de la Salud 2007. Pág. Internet:

www.cc.nih.gov/ccc/patient_education/pepubs_sp/dis.pdf

48. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2007.
Inhibidores de la α -glucosidasa. Departamento de Farmacología.

<http://medicina.unmsm.edu.pe/farmacologia/diabetes1/paginas/Page3905.htm>.

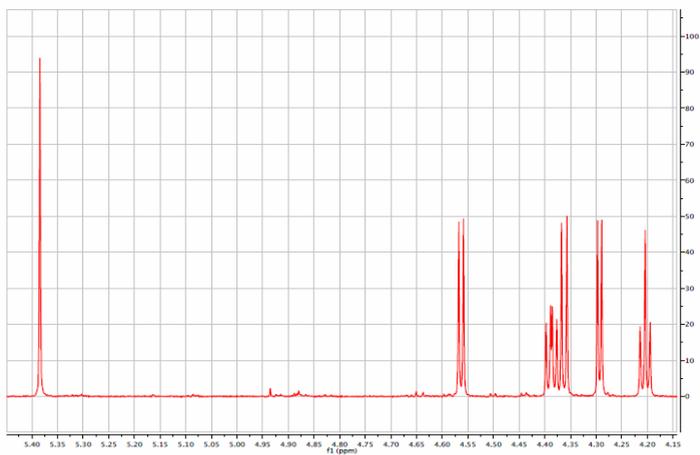
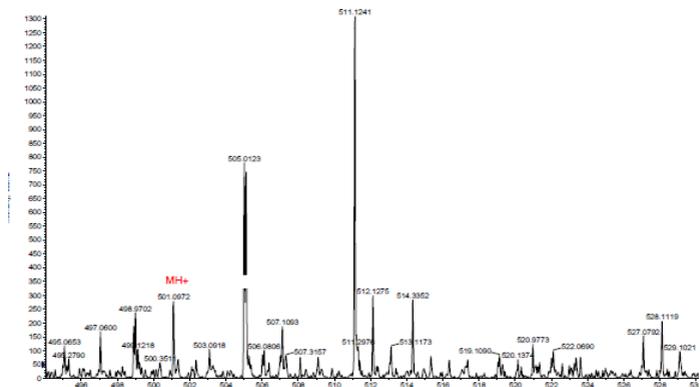
ANEXOS.

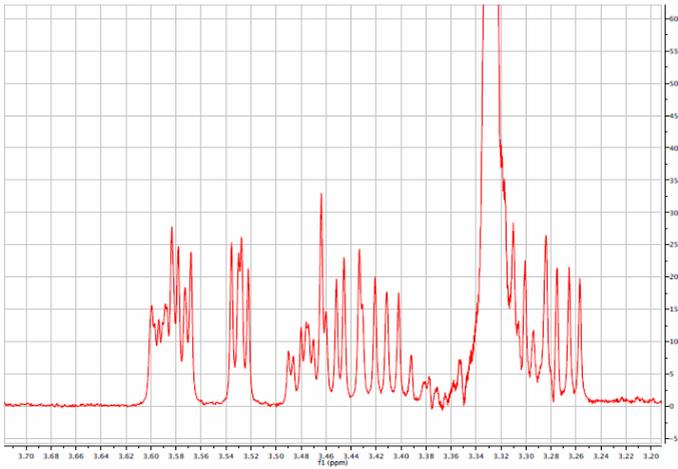
Anexo 1.

Análisis químico del compuesto.

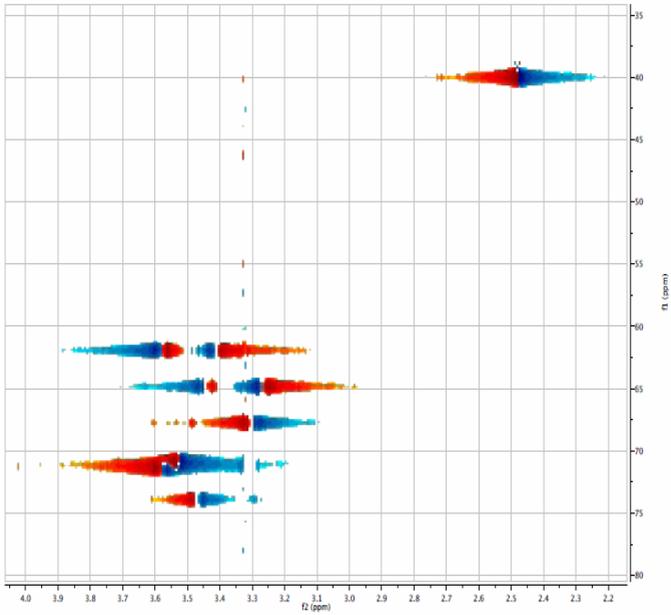
Sample Name: u6/mc180
Acq. File: 062410003.v
Acq. Date: Monday, May 24, 20
Max: 4.294 count

1-1YOF 03: 0.186 to 0.267 min from 062410003.v.wf Agilent

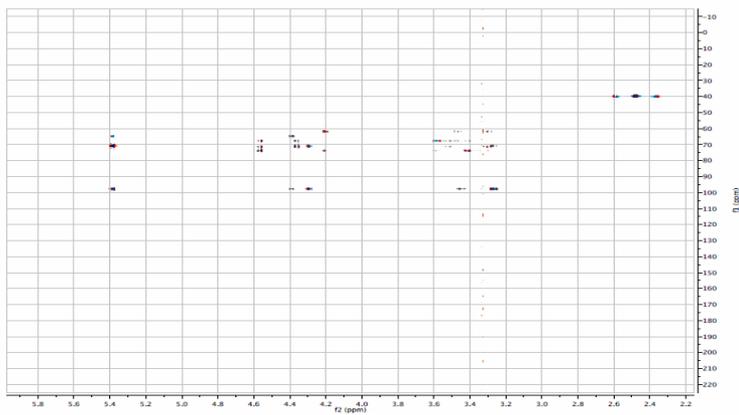




Análisis del compuesto por HSQC



Análisis del compuesto por HMBC



Análisis del compuesto por COSY

