



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**  
**MODALIDAD PRESENCIAL**

**“Aislamiento biodirigido (*in vitro*) de  
compuestos antioxidantes y  
antihiperoglucemiantes a partir de *Ilex  
guayusa*”**

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

Gladys Noemí Carrión Armijos  
**AUTOR**

Ing. Jorge Ramírez Robles  
**DIRECTOR**

**CENTRO UNIVERSITARIO LOJA**

2011

## CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Ing. Jorge Ramírez Robles  
**DIRECTOR DE TESIS**

### **Certifica:**

Que el trabajo de Investigación “**Aislamiento biodirigido (*in vitro*) de compuestos antioxidantes y antihiperglucemiantes a partir de *Ilex guayusa***” elaborado por la señorita Gladys Noemí Carrión Armijos 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 Ramírez Robles  
**DIRECTOR DE TESIS**

Loja, Julio 2010

## **AUTORIA**

Las ideas y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de la autora.

---

Gladys Noemi Carrión Armijos

## **DEDICATORIA**

II

Este sueño no se hubiese realizado sin en el apoyo y confianza incondicional de mi querido hermano Agustín, quien ha sido ejemplo de trabajo e inspiración de superación diaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme regalado la vida y sabiduría para culminar este trabajo.

A mis Padres, hermanos, a toda mi familia por estar en todos los momentos.

A mi director de tesis Ing. Jorge Ramírez por sus sabios conocimientos impartidos.

Al personal del Instituto de Química Aplicada quienes me acogieron y guiaron en la realización del presente trabajo, en especial a la Ing. Paola Ordoñez, Ing Ximena Jaramillo.

A la Ing. Paulina Aguirre por sus conocimientos y desinteresada colaboración en la culminación de este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos con quienes compartí mis mejores años de formación.

*GRACIAS A TODOS.....*

## **CESION DE DERECHOS**

Yo, Gladys Noemi Carrión Armijos “declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Adicionalmente 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”

.....

Gladys Carrión  
**TESISTA**

.....

Ing. Jorge Ramírez  
**DIRECTOR DE TESIS**

V

## CONTENIDOS

|   |          |
|---|----------|
| Certificación.....                      | I        |
| Autoría.....                            | II       |
| Dedicatoria.....                        | III      |
| Agradecimiento.....                     | IV       |
| Cesión de derechos.....                 | V        |
| Contenidos.....                         | IX       |
| Resumen.....                            | X        |
| Abstract.....                           | XI       |
| <br>                                    |          |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....            | <b>2</b> |
| 1.1    Objetivos.....                   | 6        |
| 1.1.1    General.....                   | 6        |
| 1.1.2    Específicos.....               | 6        |
| <br>                                    |          |
| <b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>8</b> |
| 2.1    La diabetes mellitus.....        | 8        |
| 2.2    Diabetes y stress oxidativo..... | 9        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.3   | Acción antibéctica y antioxidante de las plantas..... | 11 |
| 2.4   | Especie vegetal en estudio.....                       | 9  |
| 2.5   | Pruebas Enzimáticas.....                              | 12 |
| 2.5.1 | Inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa...                | 12 |
| 2.6   | Pruebas de antioxidantes.....                         | 13 |
| 2.6.1 | Metodo DPPH.....                                      | 13 |
| 2.6.2 | Método $\beta$ -CLAMS.....                            | 14 |
| 2.6.3 | Método FOLIN-CIOCALTE.....                            | 15 |
| 2.7   | Cromatografía de Columna .....                        | 15 |
| 3     | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                     | 18 |
| 3.1   | Obtención de los extractos.....                       | 18 |
| 3.2   | Ensayo inhibición de $\alpha$ -glucosidasa.....       | 18 |
| 3.3   | Ensayo $\beta$ -CLAMS.....                            | 20 |
| 3.4   | Ensayo DPPH.....                                      | 21 |
| 3.5   | Ensayo FOLIN-CIOCALTEU.....                           | 22 |
| 3.6   | Cromatografía de Columna .....                        | 23 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3.7 | Análisis e interpretación de datos.....   | 24 |
| 4   | <b>RESULTADOS</b> .....   | 27 |
| 4.1 | Ensayo Espectofotométrico inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa.....                  | 27 |
| 4.2 | Ensayo espectofotométrico de la capacidad antioxidante mediante $\beta$ -CLAMS..... | 28 |
| 4.3 | Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH.....                | 29 |
| 4.4 | Método FOLIN CIOCALTEU.....   | 30 |
| 4.5 | Cromatografía de columna.....   | 30 |
| 5   | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | 33 |
| 6   | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES...</b>  | 37 |
| 6.1 | Conclusiones.....   | 37 |
| 6.2 | Recomendaciones .....   | 37 |
| 7   | <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 40 |

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la actividad antioxidante y antihiper glucemiante de los extractos: hexánico, metanólico y acetato de etilo de la especie vegetal *Ilex guayusa* utilizada tradicionalmente en el tratamiento de diabetes mellitus, además se realizó el fraccionamiento del extracto activo.

Se empleó métodos que permiten determinar la capacidad antigluce mian te y antioxidante de los extractos, como inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa para antigluce mian tes y  $\beta$ -CLAMS, DPPH, Folin ciocalteu para antioxidantes utilizando diferentes concentraciones de los extractos y sus respectivos controles positivos y negativos. En todos los ensayos aplicados se obtuvo que el extracto metanólico es el que presenta mayor actividad tanto en antidiabéticos como antioxidantes. El fraccionamiento del extracto metanólico nos dio como resultado un compuesto puro perteneciente a los triterpenos.

### Palabras claves:

*Ilex guayusa*, fraccionamiento, antioxidantes, antihiper glucemiante s.

**Abstract:**

In this research the anti-hyperglucemiant and antioxidant activity was evaluated from the extracts: hexanic, ethyl and methanolic acetate; of the vegetal species *Ilex guayusa* which is traditionally used in the treatment of diabetes mellitus, moreover the division of the active extract was done.

We used some methods which allow to determine the antioxidant and antiglucemiant capacity of the extracts, such as the inhibition of the enzyme  $\alpha$ -glucosidase for antiglucemiants and  $\beta$ -Clams, DPPH, Folin ciocalteu to antioxidants using different concentrations from the extracts and their respective positive and negative controls.

In all the applied tests we obtained that the methanolic extract presents a great activity in antidiabetics as in antioxidants. The division of the methanolic extract gives as a result a pure mixture belong to the triterpenos.

**Key Words:** antioxidants, antidiabetics, triterpen, *Ilex guayusa*, division.



# Capítulo I: Descripción General del Proyecto

## I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un disturbio crónico que afecta al metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Se caracteriza por un exceso anormal de azúcar en la sangre conocido como hiperglucemia. Los niveles elevados de glucosa postprandial en la sangre son ampliamente reconocidos como uno de los marcadores de la enfermedad más tempranos; las causas de la hiperglucemia son deficiencia en la secreción de insulina o resistencia de las células del cuerpo a la acción de ésta. Por sus consecuencias, la diabetes se sitúa entre las diez principales causas de morbi-mortalidad de las sociedades en vía de desarrollo, donde la mayoría de los pacientes están entre los 45 y 64 años de edad [Negri, 2005. Mccue *et al.* 2005. Ramos M, *et al.* 2006] .

En Ecuador, la diabetes es la tercera causa de muerte y la quinta de morbilidad. Datos del Ministerio de Salud Pública (2008) del Ecuador

dan cuenta que 1,3 millones de ecuatorianos padecen diabetes (67% de los casos han sido reportados en mujeres). Por su parte, la OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que la prevalencia de diabetes en el Ecuador aumentará de 341 mil casos en el 2000 a 921 mil casos para el 2030 [INEC 2007].

En la Provincia de Loja, según datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en el 2005 la diabetes se caracterizó como la primera causa de muerte femenina con una tasa de mortalidad de 25,4 por cada 100 mil habitantes de sexo femenino. En un estudio realizado por el CADES (Centro de Asesoría y Desarrollo Empresarial y Social) y el CBCM (Centro de Biología Celular y Molecular), ambos de la Universidad Técnica Particular de Loja, para determinar la incidencia de la diabetes en la zona urbana de la Ciudad de Loja sobre un grupo de personas mayores a 30 años, se determinó que aproximadamente el 12% de las personas sufría diabetes, de las cuales el mayor porcentaje (77,8%) poseía diabetes Tipo II.

Los productos naturales constituyen hoy en día la principal fuente de compuestos con actividad antioxidante y por lo tanto hipoglucemiante gracias a que contienen cantidades cuantiosas de flavonoides y taninos, brindando un amplio espectro de propiedades para la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades por lo que sus componentes activos podrían ser utilizados en la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos medicamentos. [Kaleem *et al.* 2006].

El Instituto de Química Aplicada (IQA), ha venido desarrollando un programa de evaluación de plantas medicinales de uso tradicional en la región sur del Ecuador, con el objetivo de conocer científicamente sus principios activos y justificar de esta manera el uso empírico que se les atribuye. Estudios anteriores demuestran que el extracto total de la especie *Ilex guayusa* presenta una importante actividad hipoglucemiante y antioxidante [Sarango 2009, Burneo 2009]. Por todo lo citado anteriormente es de vital importancia continuar con el estudio de esta especie vegetal. El presente trabajo tiene

como el objetivo determinar los posibles compuestos responsables de dicha actividad y a su vez obtener datos que sean útiles para la ciencia especialmente en el campo biomédico para que en un futuro se pueda desarrollar nuevos y novedosos agentes farmacológicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo General:

- Evaluar la actividad antioxidante y antihiper glucemiante de los extractos obtenidos de *Ilex guayusa* y mediante fraccionamiento aislar compuestos puros.

### 1.1.2 Específicos:

- Obtener los extractos (hexánico, acetato de etilo, metanólico) a partir de *Ilex guayusa* mediante maceración.
- Determinar en qué extracto se encuentran los compuestos antioxidantes y antiglucemiantes mediante ensayos de  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -Clams y DPPH.
- Aislar metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas a partir del extracto activo.

## Capítulo II: Revisión Bibliográfica

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de desordenes metabólicos muy común que afecta el metabolismo de carbohidratos, grasas, y proteínas, esta se caracteriza por una disminución en la producción o ineficiencia de insulina, proporcionando niveles elevados de glucosa en sangre y consecuentemente daño celular que se traduce en macro y microangiopatías, en cuyo proceso esta involucrado el estrés oxidativo [Menakshi *et al.* 2006; Mehmet *et al.* 2000; Vetrichelvan, y Jegadeesan 2002].

Estudios realizados han descrito que tanto la diabetes tipo I como la II son patologías complicadas y desventajosas con respecto a sus complicaciones tardías, ya que afectan a todos los órganos y producen un desgaste acelerado de las células. Los pacientes diabéticos en comparación a otros presentan 25 veces más posibilidades de quedarse ciegos, 20 veces más de tener problemas renales, así como mayor

riesgo de sufrir amputaciones por gangrena y de 2 a 6 veces más de desarrollar enfermedades coronarias y daños isquémicos en el cerebro. Las personas que se les diagnostica esta patología antes de los 30 años de edad no llegan a los 50, la mayoría por problemas renales [Ramos M, *et al.* 2006].

Según la Federación Internacional de Diabetes (FID) actualmente esta enfermedad afecta aproximadamente a 285 millones de personas en todo el mundo por lo que es considerada un problema de salud pública, ya que a mediados del siglo pasado existían 135 millones de diabéticos y se estima que para el año 2030 el número total excederá a los 435 millones [FID 2009, Blanco *et al.* 2004].

## **2.2 DIABETES Y STRÉSS OXIDATIVO**

En los últimos años la atención ha sido enfocada en el papel del estrés oxidativo, se ha demostrado que este es la causa fundamental y común en patogénesis de las complicaciones diabéticas secundarias, esto se debe a que altos valores de glicemia conducen a un estrés

oxidativo, ya que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de alfacealdehídos, peróxido de hidrógeno y radical superóxido entre otras especies reactivas de oxígeno (ROS) [Clapés *et al.* 2001]. Los radicales libres son producidos constantemente en el cuerpo como consecuencia de los procesos metabólicos normales e interacción con los estímulos ambientales los cuales provocan daño oxidativo en las macromoléculas que no pueden ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa [Ramos *et al.* 2006; Clapés *et al.* 2001; Kaleem *et al.* 2006; Schultz J *et al.* 2005].

### **2.3 ACCION ANTIDIABETICA Y ANTIOXIDANTE DE LAS PLANTAS**

Los mecanismos de acción por los cuales las plantas disminuyen el nivel de glucosa en la sangre pueden ser atribuidos a alguno de los siguientes factores: aumento de la liberación de insulina a través de la estimulación de las células  $\beta$ -pancreáticas, resistencia a las hormonas que aumentan el nivel de glucosa, aumento del 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 la microcirculación de sangre en el organismo [Negri 2005].

Los compuestos antioxidantes en los vegetales según su naturaleza de solubilización se han dividido en: hidrófilo (compuestos fenólicos y vitamina C) y lipófilicos (carotenoides y vitamina E). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, las cuales les permite actuar como agentes reductores donadores de hidrogeno y electrones e inhibidores de oxígeno individual. Los carotenoides son desactivadores de moléculas sensibilizadoras excitadas electronicamente, los cuales están involucradas en la generación de radicales y oxígeno individual [Peris *et al.* 1995].

#### **2.4 ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO**

***Ilex guayusa***



**Fig.1** Fotografía *Ilex guayusa* tomada en el herbario del IQA- UTPL.

**FAMILIA:** AQUIFOLIACEAE

**DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:** Árbol nativo de la Región Amazónica, especie silvestre y cultivada de 4 a 15 m de altura o más, tronco de hasta 1 m de diámetro. Hojas alternas coriáceas, oblongo-elípticas 9,5–17 cm de longitud por 3,8–7 de ancho, ápice acuminado y base aguda, margen simple o ligeramente dentado, haz y envés glabros, peciolo corto de 1 cm de largo, estipulas conspicuas. Inflorescencia en las axilas de las hojas, fasciculadas, 4,5 lobulados, corola con los pétalos obtusos, anteras oblongas, ovario supero subgloboso y estigma sésil [Zaragoza *et al.* 2004].

**USOS:** Se emplea las hojas para el tratamiento de la gastritis, fertilidad en la mujer y en el tratamiento de la Diabetes.

**MODO DE USO:** Infusión [Zaragoza *et al.* 2004].

## **2.5 PRUEBAS ENZIMATICAS**

### **2.5.1 Inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa**

Uno de los enfoques terapéuticos para reducir la hiperglicemia postprandial en pacientes diabéticos es prevenir la absorción de carbohidratos después del consumo de comidas. Solamente los monosacáridos como la glucosa y fructosa pueden ser transportados del lumen intestinal al flujo de la sangre. Almidones complejos como oligosacáridos y disacáridos deben ser descompuestos en monosacáridos antes de ser absorbidos en el duodeno y yeyuno superior, esta digestión es facilitada por enzimas glucosidasas que se encuentran situadas en el borde del cepillo de los enterocitos intestinales [Ortiz R, *et al*,2007].

Los inhibidores de las glucosidasas se unen a las glucosidasas intestinales e inhiben su 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 [Gomero 2008].

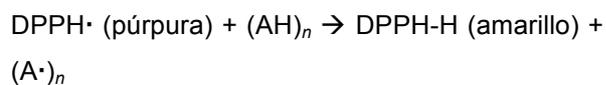
El ensayo de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa mide el porcentaje de inhibición de estas enzimas sobre los almidones no permitiendo que éstos se desdoblen en monosacáridos, evitando de esta manera que se eleven los niveles de glucosa en la sangre [Muccie *et al.* 2005].

## **2.6 PRUEBAS ANTIOXIDANTES**

### **2.6.1 Método DPPH**

La determinación de la capacidad antioxidante de una sustancia usando el método DPPH se basa en la reacción con el radical estable DPPH [Bilia *et al.*, 2004]. El DPPH es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estables y comercialmente disponibles, tiene una absorción UV-visible máxima a 515 nm. Una vez reducido, la solución se decolora y el progreso de la reacción es convenientemente monitoreado por un espectrofotómetro [Huanf *et al.*, 2004]. La capacidad de un compuesto como depurador de radicales registrada espectrofotométricamente usando el DPPH como radical estable es

monitoreada por la transformación del DPPH en su forma reducida (DPPH-H) [Soler *et al.*, 2000].



### 2.6.2 Método $\beta$ -CLAMS

La capacidad antioxidante de una sustancia puede ser determinada usando el método  $\beta$ -CLAMS, donde la mencionada actividad es expresada como factor de protección. Este método se basa principalmente en la oxidación del ácido linoleico, que es un ácido graso insaturado, gracias a los ROS (Reactive oxygen species) producidos 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 [Kwon *et al.* 2007].

### **2.6.3 Método FOLIN-CIOCALTEU**

Este ensayo ha sido utilizado durante muchos años para medir el contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales. El mecanismo básico de este método es una reacción redox por lo que puede considerarse como un método de medida de la actividad antioxidante total y la oxidación de fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorbancia de 765nm y se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico [Rojas, 1996, Vidal, 2001].

### **2.7 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA**

Una columna de cromatografía es un tubo de vidrio relleno con una sustancia sólida de propiedades *adsorbentes* constituida por pequeñas partículas: gel de sílice y alúmina son las más usadas. Este relleno es lo que se conoce en cromatografía como la fase estacionaria. A través de la columna se hará pasar una corriente de un disolvente o mezcla de disolventes denominada eluyente y/o fase móvil. Es un método simple de operación que nos permite

fraccionar los componentes de una mezcla, basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por la fase móvil, a través del lecho cromatográfico o fase estacionaria [Bandoni, 2002].

## Capítulo III: Materiales y Métodos

### **III. MATERIALES Y METODOS**

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el IQA de la Universidad Técnica Particular de Loja el cual presenta la siguiente metodología:

#### **3.1 Obtención de los extractos**

La planta fue recolectada en la parroquia de Yangana en las siguientes coordenadas 705081 Este y 95155412 Norte. Posteriormente las hojas secas fueron sometidas a maceración dinámica a temperatura ambiente por 5 horas, con una relación solvente:planta de 10:1. Primero se lo realizó con hexano posteriormente con acetato de etilo y por último con metanol. El solvente fue eliminado por rotaevaporación a una temperatura de 30°C y a presión reducida.

#### **3.2 Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa**

La solución enzimática fue preparada con 5,7 U (1 mg) por ensayo en un volumen de 3,22 ml de agua desionizada fría. En cada tubo de reacción, 35  $\mu$ l de solución enzimática fueron adicionados a 35  $\mu$ l del inhibidor preparado a

varias concentraciones (10, 50, 100, 500 y 1000 ug/ml) y se mantuvo a 37 °C por 5 minutos para alcanzar el equilibrio. La reacción se inició al agregar 930 µl de p-Nitrophenyl-α-D-Glucoside (PNP-G) (0,914 mM en PBS 67 mM) y toda la mezcla fue incubada a 37°C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada tubo 1 ml de solución TRIS (0,5 M) para detener completamente la reacción. Se mezcló por inversión y se transfirió a una celda espectrofotométrica para iniciar la lectura de absorbancias a 400 nm. Como control positivo se utilizó ascarbosa ya que se conoce que es un inhibidor importante de las enzimas glucosidas.

**Tabla 1.** Esquema para la determinación de la actividad inhibitoria de α-glucosidasa.

| ENSAYO DE INHIBICIÓN DE α-GLUCOSIDASA                     |             |            |             |             |
|---|-------------|------------|-------------|-------------|
| SOLUCIONES  | MUESTRA (B) | BLANCO (D) | CONTROL (A) | CONTROL (C) |
| <b>INHIBIDOR</b>  | 35 µl       | 35 µl      | -           | -           |
| <b>ENZIMA</b>   | 35 µl       | -          | 35 µl       | -           |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                                     | -           | 35 µl      | 35 µl       | 70 µl       |
| <b>Mezclar por inversión e incubar a 37 °C por 5 min</b>  |             |            |             |             |
| <b>SUSTRATO</b>   | 930 µl      | 930 µl     | 930 µl      | 930 µl      |
| <b>Mezclar por inversión e incubar a 37 °C por 15 min</b> |             |            |             |             |

|  |              |              |              |              |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRIS   | 1000 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l |
| Mezclar por inversión y leer en espectrofotómetro a 400 nm |              |              |              |              |

### 3.3 Ensayo $\beta$ -CLAMS

Se colocó 500  $\mu$ l de solución de  $\beta$ -caroteno con cloroformo en un vial cubierto con papel aluminio el cual contiene 500 mg de Tween 40. A esto se añadió 50  $\mu$ l de ácido linoleico. La emulsión así preparada se transfirió a un balón de destilación también cubierto con papel aluminio para luego ser llevado al rotaevaporador por 5 minutos a 45-50 °C. A esta emulsión libre de cloroformo se le añadió 60 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (de 20 volúmenes) y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. De esta solución se transfirió 1960  $\mu$ l a tubos que contienen 40  $\mu$ l el extracto o del control positivo ( $\alpha$ -TCF). Las muestras se incubaron en un baño maría a 50 °C por 120 minutos. Seguidamente las absorbancias son determinadas a 470 nm y comparadas con las del control negativo (40  $\mu$ l metanol en lugar del extracto). Se usó  $\alpha$ -tocoferol como control positivo por su poder antioxidante.

**Tabla 2.** Esquema para la determinación de antioxidantes mediante el ensayo de  $\beta$ -clams.

| <b>Método <math>\beta</math>-CLAMS</b> |              |            |              |              |
|--|--------------|------------|--------------|--------------|
| SOLUCIONES                             | MUESTRA      | BLANCO     | CONTROL (+)  | CONTROL (-)  |
| <b>EMULSIÓN</b>                        | 1960 $\mu$ l | -          | 1960 $\mu$ l | 1960 $\mu$ l |
| <b>EXTRACTO</b>                        | 40 $\mu$ l   | 40 $\mu$ l | -            | -            |
| <b>TROLOX</b>                          | -            | -          | 40 $\mu$ l   | -            |
| <b>METANOL</b>                         | -            | -          |              | 40 $\mu$ l   |

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)

### 3.4 Ensayo DPPH

Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil,2-picrilhidrazilo) a una concentración de 80 mM en metanol, esta debe ser establecida de tal manera que produzca un absorbancia menor a 115 nm. Las muestras fueron pesadas y solubilizadas en metanol para tener concentraciones finales de 10, 50, 100 y 1000  $\mu$ g/ml. De la solución de DPPH se transfirió 1960 $\mu$ l a tubos de ensayo que contienen 40 $\mu$ l de muestra preparada.

**Tabla 3.** Esquema para la determinación de antioxidantes mediante ensayo de DPPH.

| <b>Método DPPH</b>                   |              |              |              |              |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| SOLUCIONES                           | MUESTRA      | BLANCO       | CONTROL (+)  | CONTROL (-)  |
| <b>METANOL</b>                       | -            | 1960 $\mu$ l | -            | 40 $\mu$ l   |
| <b><math>\alpha</math>-TOCOFEROL</b> | -            | -            | 40 $\mu$ l   | -            |
| <b>DPPH</b>                          | 1960 $\mu$ l | -            | 1960 $\mu$ l | 1960 $\mu$ l |

|   |       |       |   |   |
|---|-------|-------|---|---|
| <b>EXTRACTO</b>   | 40 µl | 40 µl | - | - |
| Dejar reaccionar a T ambiente por 15min<br>Leer en espectrofotómetro a 515 nm |       |       |   |   |

### 3.5 Ensayo FOLIN-CIOCALTEU

Preparamos el Folin-Ciocalteu a una concentración de 1N en agua destilada, a este reactivo se lo protegió de la luz y se lo coloco en refrigeración hasta su uso. También se preparó una solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20% en agua destilada y se la mantuvo en el equipo de ultrasonido hasta su completa disolución. Las muestras fueron preparadas colocando 250 µl del extracto (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 µg/ml) en tubos de ensayo, a esto se le adicionó 1500 µl de agua destilada y 125 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, se mezclo en un vórtex y se dejo reposar durante 5 minutos, luego de lo cual se añadieron 250 µl de la solución de carbonato de sodio. Se dejó reposar por un periodo de 120 minutos y finalmente se procedió a leer en espectrofotómetrto a 760 nm. Al mismo tiempo se evaluaron los respectivos controles. Para el control positivo se uso trolox, muy conocido por su poder antioxidante.

**Tabla 4.** Esquema para la determinación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

| <b>Método FOLIN-CIOCALTEU</b>  |         |        |             |             |
|--|---------|--------|-------------|-------------|
| SOLUCIONES   | MUESTRA | BLANCO | CONTROL (+) | CONTROL (-) |
| EXTRACTO   | 1 ml    | 1 ml   | -           | -           |
| TROLOX   | -       | -      | 1 ml        | -           |
| ETANOL 95%   | 1 ml    | 1.5 ml | 1 ml        | 2 ml        |
| H <sub>2</sub> O destilada   | 5 ml    | 5 ml   | 5 ml        | 5 ml        |
| FOLIN  | 0.5 ml  | -      | 0.5 ml      | 0.5 ml      |
| <b>Mezclar y dejar reposar 5 minutos</b>   |         |        |             |             |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  | 1 ml    | 1 ml   | 1 ml        | 1 ml        |
| <b>Mezclar y dejar reposar 60 minutos<br/>Leer en espectrofotómetro a 725 nm</b> |         |        |             |             |

Los valores obtenidos de la absorbancia fueron convertidos a fenoles totales y expresados en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramos de peso seco del extracto.

### 3.6 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Del extracto metanólico se pesó 14.58 gr y se lo disolvió con 50 mL de metanol y agua, se lo eluyó usando una columna pequeña con 4 cm de silica fase inversa para eliminar clorofilas. Del extracto obtenido se eliminó el metanol usando el rotaevaporador, los residuos de agua se los secó con una cantidad pequeña de acetonitrilo así mismo con el rotaevaporador hasta que nos queda el extracto completamente seco, luego se

lo mezcló nuevamente con metanol y se le agregó sílica, se rotaevapora hasta que queda la papilla (extracto sílica) libre de solventes y agua.

La columna cromatográfica se armó con una relación 1:40 extracto/fase estacionaria, utilizando sílica gel empaquetada en húmedo con hexano, a ésta se le agregó la papilla iniciando la elución con hexano como solvente inicial siguiendo un gradiente creciente de polaridad (hexano:acetato de etilo, acetato de etilo, acetato de etilo:metanol, metanol). Las fracciones recogidas fueron controladas mediante cromatografía de capa fina, usando ácido sulfúrico y vainilina como reactivos para revelar, con el propósito de reunir fracciones similares evaluando su coloración.

### **3.7 ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS**

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron evaluados estadísticamente por el método de regresión logística Logit, con un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa XLSTAT para calcular los valores de

IC<sub>50</sub>. Se debe tener presente que un valor menor de IC<sub>50</sub> significa mayor inhibición enzimática y viceversa.

Además estos resultados fueron comparados con el IC<sub>50</sub> del control positivo que para este estudio fueron: acarbosa, α-tocoferol, trolox.

La identificación del compuesto se la realizó mediante cromatografía de gases, la cual fue llevada a cabo en los laboratorios de la Universidad de Arkansas, Estados Unidos.

## Capítulo IV: Resultados

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Ensayo Espectofotométrico de inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa (AGH)

En este ensayo el extracto metanólico presentó mayor efecto dosis respuesta con un valor de IC<sub>50</sub> de 437,48  $\mu$ g/mL, siendo este dato similar al valor del control positivo que para esta prueba se utilizó Acarbosa (Glucobay).

Tabla5. Porcentaje de inhibición para AGH

| AGH                |                  |                |                |                |
|--------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| CONC.( $\mu$ g/ml) | ACETATO DE ETILO | HEXANO         | METANOL        | GLUCOBAY       |
| 10                 | 0 $\pm$ 0        | 0,8 $\pm$ 0,1  | 0,2 $\pm$ 0,1  | 0,9 $\pm$ 0,1  |
| 50                 | 7,1 $\pm$ 0,1    | 3,8 $\pm$ 0,2  | 9,9 $\pm$ 0,3  | 11,2 $\pm$ 0,3 |
| 100                | 9,5 $\pm$ 0,3    | 6,2 $\pm$ 0,2  | 24,1 $\pm$ 0,4 | 21,7 $\pm$ 0,3 |
| 500                | 24,4 $\pm$ 0,4   | 11,7 $\pm$ 0,3 | 68,8 $\pm$ 0,6 | 50,2 $\pm$ 0,7 |
| 1000               | 35,2 $\pm$ 0,5   | 19,3 $\pm$ 0,5 | 94,8 $\pm$ 0,9 | 70,8 $\pm$ 0,9 |
| IC50 ( $\mu$ g/ml) | 1323,47          | 2655,54        | 437,48         | 602,01         |

### 4.2 Ensayo espectofotométrico de la

**capacidad antioxidante mediante  $\beta$ -CLAMS**

Para el ensayo  $\beta$ -clams se puede observar que el extracto hexánico presenta un valor de  $IC_{50}$  superior al control, mientras que los extractos metanólico y acetato de etilo poseen una mayor actividad con valores de  $IC_{50}$  similares al control positivo que en este caso es el  $\alpha$ -TCF ( $\alpha$ -Tocoferol) lo que los hace buenos protectores contra los ROS (Reactive oxygen species).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición para  $\beta$ -clams

| <b><math>\beta</math>-CLAMS</b> |                         |                |                |                                |
|---------------------------------|-------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| <b>CONC.(ug/ml)</b>             | <b>ACETATO DE ETILO</b> | <b>HEXANO</b>  | <b>METANOL</b> | <b><math>\alpha</math>-TCF</b> |
| 0,01                            | 0 $\pm$ 0,3             | 4,3 $\pm$ 0,1  | 9,5 $\pm$ 0,1  | 8,8 $\pm$ 0,4                  |
| 0,1                             | 21,8 $\pm$ 0,4          | 16,4 $\pm$ 0,1 | 23,9 $\pm$ 0,5 | 34,0 $\pm$ 0,8                 |
| 1                               | 31,2 $\pm$ 0,5          | 33,8 $\pm$ 0,2 | 31,1 $\pm$ 0,7 | 47,9 $\pm$ 0,8                 |
| 10                              | 38,8 $\pm$ 0,7          | 35,1 $\pm$ 0,5 | 43,3 $\pm$ 0,8 | 74,9 $\pm$ 1,0                 |
| 100                             | 59,6 $\pm$ 0,5          | 39,6 $\pm$ 0,7 | 61,1 $\pm$ 0,7 | 85,4 $\pm$ 0,8                 |
| <b>IC50 (ug/ml)</b>             | <b>4,335</b>            | <b>129,29</b>  | <b>4,337</b>   | <b>2,872</b>                   |

### 4.3 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH

El IC<sub>50</sub> más significativo en este ensayo es el metanólico, indicando una posible actividad inhibitoria contra los radicales libres, al actuar como antioxidante primario, es decir que interrumpe la cadena oxidativa y previene la formación de nuevos radicales libres.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición para DPPH

| DPPH                     |                     |            |            |            |
|--------------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| CONCENTRACION<br>(ug/ml) | ACETATO<br>DE ETILO | HEXANO     | METANOL    | α-TCF      |
| 0,1                      | 1,2 ± 1,2           | 1,2 ± 0,6  | 0,0 ± 1,8  | 1,9 ± 0,1  |
| 0,5                      | 1,1 ± 1,4           | 3,4 ± 1,2  | 27,5 ± 1,1 | 5,2 ± 0,8  |
| 1                        | 8,4 ± 4,0           | 5,3 ± 2,5  | 92,5 ± 0,8 | 10,9 ± 0,8 |
| 5                        | 18,4 ± 4,7          | 11,5 ± 3,6 | 94,5 ± 0,6 | 44,0 ± 5,1 |
| 10                       | 80,0 ± 2,8          | 67,8 ± 1,4 | 94,6 ± 1,4 | 81,0 ± 2,2 |
| <b>IC50 (ug/ml)</b>      | <b>226</b>          | <b>330</b> | <b>20</b>  | <b>5</b>   |

#### 4.4 Método FOLIN-CIOCALTEU

En el extracto obtuvimos 17,34 gramos de ácido gálico por gramo de extracto, resultado que es superior al control positivo indicando que el extracto presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos lo que se ratifica una vez mas su capacidad antioxidante.

Tabla 8. Valores de acido galico /gramos de extracto

|                  | <b>ug AG</b> |
|------------------|--------------|
| TROLOX           | 13,58        |
| ILEX METANOL     | 17,34        |
| H <sub>2</sub> O | 0,0          |

#### 4.5 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

En base a la respuesta obtenida con el extracto metanólico se procedió a realizar fraccionamiento mediante cromatografía de

columna, obteniéndose varias fracciones, de las cuales se aisló un compuesto puro al que se le realizó un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas determinando que es un tipo de triterpeno presuntamente UVAOL.

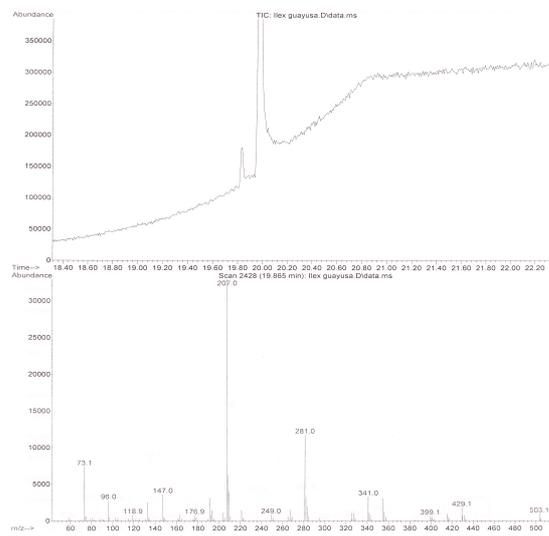
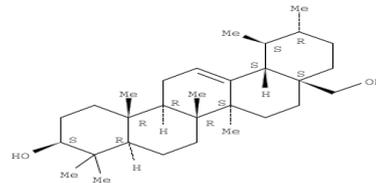


Fig 1. Estructura química del uvaol: 3 $\beta$ ,28-Dihydroxyurs-12.ene

## Capítulo V: Discusión

## **v. DISCUSIÓN**

Actualmente se ha incrementado el interés de investigar plantas como fuentes de antioxidantes naturales, [Bengmark 1998]. Esta realidad no es ajena a la nuestra, ya que siendo Ecuador un país megadiverso con una gran variedad de especies vegetales de las que en su mayoría solo se conoce su uso empírico [Valencia *et al.* 2000, Estrella *et al.* 2005], los resultados presentados en este trabajo demuestran la realidad y la importancia de conocer científicamente las propiedades biológicas y componentes activos que sostienen el uso siendo una guía para futuras investigaciones y aplicaciones.

Según la literatura, los ensayos aplicados en esta investigación son los mas utilizados debido a que originan resultados reproducibles y coherentes, siendo aplicables como un screening inicial en la búsqueda de determinados compuestos [Conforti *et al.* 2005; Hodzic *et al.* 2009; Castañeda *et al.* 2008].

Todas las pruebas realizadas demuestran que el extracto metanólico es el que presenta mayor actividad tanto en antidiabéticos como antioxidantes, para la especie vegetal en estudio, la literatura no reporta datos y resultados similares al presente estudio, ya que no se ha hecho investigaciones anteriores de la *Illex guayusa* para estas dos actividades. Sin embargo otros estudios revelan en países como Paraguay, Colombia y Perú en plantas de la misma familia importantes actividades colerética, estimulante y antipiréticas [Castañeda *et al.* 2008; Rosero 2006-2007].

El fraccionamiento del extracto por medio de cromatografía en columna nos dio como resultado un compuesto puro posiblemente Uvaol, ya que los análisis realizados como punto de fusión y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas coincide con los reportados en la base de datos de SCIFINDER [<https://SciFinder.cas.org>].

Uvaol, es un triperteno aislado principalmente del aceite de olivo virgen, sin

embargo, estudios realizados por Alexandre, *et.al* 2004, demuestra la presencia de esta misma molécula en la *Illex buxifolia* con diferente actividad biológica, así mismo otros trabajos de investigación demuestran importante actividad efectiva contra la proliferación celular especialmente en estados cancerígenos [Martin *et al.* 2009]. Demostrando de esta manera que la molécula presenta una amplia actividad biológica posiblemente basada en sus propiedades antioxidantes.

Es importante mencionar, que esta molécula no se encuentra presente como principio activo en algún fármaco, siendo importante continuar con más estudios que puedan llegar a confirmar totalmente actividad antioxidante o antidiabética.

## Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

- Bajo condiciones de ensayos, el extracto metanólico presentó una importante actividad tanto para  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -CLAMS y DPPH, debido a que los valores de IC50 comparados con sus respectivos controles fueron similares, por tal motivo se procedió a realizar el fraccionamiento.
- Con el fraccionamiento se obtuvo un Triterpeno, que por sus características químicas y físicas posiblemente sea Uvaol.
- Los resultados obtenidos en el presente estudio sirven para ampliar los conocimientos científicos tanto *Ilex guayusa* como de la molécula encontrada.

### 6.2 Recomendaciones

- Es importante continuar con el estudio del compuesto obtenido mediante

técnicas de identificación molecular más específicas como RMN (resonancia magnética nuclear) para poder establecer con precisión la estructura química.

- Realizar pruebas antioxidantes y antiglucecientes al compuesto obtenido con el fin de ratificar sus propiedades.
- Realizar un estudio de bioactividad al compuesto obtenido para determinar la potencialidad biológica del mismo.
- Estudiar nuevas especies vegetales que desde la perspectiva etnomédica han demostrado tener propiedades antidiabéticas con el fin de potenciar el aprovechamiento de los recursos naturales en beneficio de la salud.

## Capítulo VII: Referencias Bibliográficas

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alexandre T, Taketa S, Gnoatto G, Pires V, Schenkel P, Dominique Guillaume 2004. Triterpenoids from Brazilian Ilex Species and Their in Vitro Antitrypanosomal Activity. Bilia A, Scalise L, Bergonzi M, Vinciere F, 2004. Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). Journal of Chromatography B 812, 203-214
2. Bandoni A. 2002. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Editorial de la Universidad de la Plata. Segunda Edición.
3. Bengmark S. Ecoimmunonutrition: A challenge for the third millennium 1998 *Nutrition*, Paris, v.14, 563-572.
4. Blanco R, Ruiz M, Sánchez M, Mendoza V, 2004. Lipoperóxidos, actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2. *Bioquímica* 29, 118-125

5. Burneo Z. 2009. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de cinco especies vegetales nativas del Sur del Ecuador: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuma eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa) y *Croton wagneri* (Mosquera). Tesis de grado previa la obtención del título de Ingeniero Químico.
6. Castañeda C, Ramos LL, Ibáñez V. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas Revista Horizonte Médico Vol 8, 1, 56-72
7. Chakrabarti R, Vikramadithyan K, Mullangi R, Sharma V, Jagadheshan H, Rao Y, Sairam P, Rajagopalan R. 2002. Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Helicteres isora* in animal models, Journal of Ethnopharmacology 81 343-349
8. Clapés S, Torres O, Companioni M, Villariño U, Broche F, Céspedes E, 2001. Peroxidación

lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. Revista cubana Investigación Biomédica 20, 93-98

9. Conforti F, Statti G , Loizzo R, Saccetti G, Poli F. Menichini F. 2005. *In Vitro Antioxidant Effect and Inhibition of  $\alpha$ -Amylase of Two Varieties of Amaranthus caudatus Seeds. Biol. Pharm. Bull. 28(6) 1098-1102*
10. Determinación de la influencia de la diabetes en la ciudad de Loja. 2006.
11. Estrella, J.; R. Manosalvas; J. Mariaca y M. Ribadeneira. 2005. Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador. Fundación Ecuatoriana de Estudios Ecológicos (EcoCiencia), INIAP, MAE y Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador. 116 pp.
12. Federación Internacional de Diabetes, 2009
13. Gomero LI, 2008. Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en Atención Primaria. Medicina de Familia (And) Vol. 8, Nº. 2, 42-55

14. Hodzic Z, Pasalic H, Memisevic A, Srabovic M, Saletovic M, Poljakovic M, 2009. The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. *European Journal of Scientific Research*. Vol.28 No.3, 471-477
15. Huang D, 2005. The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856
16. INEC 2007. Nacimientos y Defunciones
17. International Diabetes federation, 2009, Las últimas cifras sobre diabetes muestran un panorama desalentador.
18. Kaleem M, Asif M, Ahmed Q, Bano B, 2006. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med* 47, 670-675
19. Kameswara Rao B, Kesavulu M, Apparao Ch. 2001. Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan diabetic

rats. Journal of Ethnopharmacology 78 67–71

20. Kwon Y, Apostolidis R, Labbe R, Shetty K, 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by phenolic Phytochemicals of selected clonal herbs species of Laminaceae family and likely mode of action through proline oxidation. Food Biotechnology, 21, 71-89
21. Martín R, Ibeas E, Carvalho-Tavares J, Hernández M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto M 2009 Natural Triterpenic Diols Promote Apoptosis in Astrocytoma Cells through ROS-Mediated Mitochondrial Depolarization and JNK Activation. PLoS ONE , Vol 4 1-14
22. Mccue P, Kwon Y, Shetty K, 2005. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. Journal of Food Biochemistry 29, 278-294
23. Mehmet R, Ekeroglu H, Haluk D, Ekrem A. 2000. The Effect of Dietary Treatment on Erythrocyte Lipid Peroxidation, Superoxide

Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Serum Lipid Peroxidation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. ELSEVIER: Clinical Biochemistry Vol 33 669-674

24. Menakshi B, Smita S, Zinjarde S, Bhargava<sup>2</sup>, Ravi Kumar A, Joshi B. 2008, Antidiabetic Indian Plants: a Good Source of Potent Amylase Inhibitors. eCAM, 1 of 6
25. Ministerio de Salud Pública . 2008, Salud del Adulto-Enfermedades crónicas no Transmisibles.
26. Negri G, 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Journal of Pharmaceutical Sciences 41, 121-142.
27. Ortiz R, García S, Castillo P, Ramirez G, Villalobos R, Estrada S. 2007.  $\alpha$ -Glucosidasa inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hiperglycemic agent. Journal of Ethnopharmacology, 109, 48-53

28. Ortiz-Andrade R, García-Jiménez S, Castillo-España P, Ramirez-Avila G, R Villalobos-Molina, Estrada-Soto S. 2007.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tornefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. Journal of Ethnopharmacology 109, 48-53
29. Ospina L, Pinzón R. 1995. Plantas usadas como antidiabéticas en la medicina popular colombiana. Rev. Col Quimico Farmacéuticas. Vol 23 Pág 81-94
30. Peris JB, Studing G, Vnaglosa B. 1995, Heterosidos en fitoterapia aplicada. M.I.C.O.F 61-73
31. Petlevski R, M. Hadzija M, M. Slijepcevic M, D. Juretic D. 2001. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. Journal of Ethnopharmacology 75 181–184
32. Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A, 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Investigación en salud. Vol.III,

33. Rosero G, 2006-2007. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de cafeína de un extracto hidro-alcohólico de *Ilex guayusa*. Plan de tesis. Laboratorio CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
  
34. Sarango V. 2009. Determinación de la actividad antidiabética de los extractos totales de nueve especies vegetales nativas del Sur del Ecuador: *Piper crassinervium* (Guabiduca), *Baccharis genistelloides* (Tres fillos), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Croton wagneri* (Mosquera), *Costus comosus* (Caña agria), *Verbena litoralis* (Verbena) y *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo) mediante ensayos de inhibición de alfa amilasa y alfa glucosidasa". Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.

35. Schultz J, Harris A, Rychly D, Ergul A. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*
36. Soler-Rivas, Espin J, Wichers J. 2000. An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11: p. 330-338.
37. Valencia, R, Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador 2000. Quito: Herbario QCA. 489.
38. Vásquez A, Cala M, Miranda I, Tafurt G, Martínez J, Stashenko E. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica* Año XIII, No 33. UTP. ISSN 205-207.
39. Vetrichelvan T, Jegadeesan M. 2002. Anti-diabetic activity of alcoholic extract of *Aer\_ a lanata* (L.) Juss. ex Schultes in rats. *Journal*

of Ethnopharmacology 80 103–107

40. Vidal A, Motidome M, Mancini-Filho J 3, Linares A, Midori M, Brandao M, Lapa A, 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 37, 373-382
41. Zaragoza T, Tene V, Malagón O, Armijos Ch, Burneo I, Jaramillo X. 2004. Bioactividad de aceites esenciales y extractos de Plantas Medicinales y Aromáticas de la Región Sur del Ecuador. FUNDACYT-UTPL

**Referencias web.**

42. <https://SciFinder.cas.org>