

Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador

[Antioxidant and antihyperglycemic activity of the medicinal specie *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., in southern Ecuador]

Mónica ALEJANDRO-ESPINOSA¹, Ximena JARAMILLO-FIERRO¹, Santiago OJEDA-RIASCOS¹, Omar MALAGÓN-AVILES¹ & Jorge RAMÍREZ-ROBLES¹

¹Universidad Técnica Particular de Loja / Departamento de Química, San Cayetano alto, calle Marcelino Champagnat, s/n. AP: 11 01 608, Loja-Ecuador.

Contactos | Contacts: Jorge RAMÍREZ ROBLES - E-mail address: jyramirez@utpl.edu.ec

Abstract

In this study we evaluated the antioxidant and antihyperglycemic activity *in vitro* of the extracts obtained with solvents: hexane, ethyl acetate and methanol, of the medicinal plant *Oreocallis grandiflora* (cucharillo), collected in the Saraguro indian community of the province Loja, southern Ecuador. The antioxidant activity was evaluated by the tests: DPPH, FOLIN-CIOCALTEU and β -CLAMS, while the antihyperglycemic activity was determined by inhibition assay α -amylase and α -glucosidase. The samples were diluted to different concentrations and the reading was performed in a UV spectrophotometer, using as positive control α -tocopherol for DPPH and Folin-ciocalteu test, trolox for β -CLAMS test, and Glucobay® for testing α -amylase and α -glucosidase. The results are expressed as IC₅₀, these show that the methanol extract of *Oreocallis grandiflora* has inhibitory effect on α -amylase, the IC₅₀ is 109 μ g/ml, compared to 126 μ g/ml of Glucobay®. It also shows inhibitory effect on α -glucosidase, the IC₅₀ is 3 μ g/ml compared to 1316 μ g/ml of Glucobay®. It also shows antioxidant activity, its IC₅₀ is 15 μ g/ml compared to 5 μ g/ml of α -tocopherol.

Keywords: medicinal plant, antioxidant, antihyperglycemic, α -tocopherol, DPPH, Folin-ciocalteu, trolox, Glucobay®, α -amylase and α -glucosidase.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante y antihiper glucemiante *in vitro* de los extractos obtenidos con los solventes: hexano, acetato de etilo y metanol, de la planta medicinal *Oreocallis grandiflora* (cucharillo), recolectada en la comunidad indígena de Saraguro en la provincia de Loja, al sur del Ecuador. La actividad antioxidante fue evaluada a través de los ensayos: DPPH, FOLIN-CIOCALTEU y β -CLAMS, mientras que la actividad antihiper glucemiante fue determinada por el ensayo de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa. El extracto metanólico de *Oreocallis grandiflora* presenta efecto inhibitorio sobre la enzima α -amilasa, su concentración inhibitoria (CI₅₀) es de 109 μ g/ml, frente a 126 μ g/ml del control positivo Glucobay®. Además, muestra efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa, su concentración inhibitoria (CI₅₀) es de 3 μ g/ml, frente a 1316 μ g/ml del Glucobay®. Muestra también actividad antioxidante, su concentración inhibitoria (CI₅₀) es de 15 μ g/ml, frente a 5 μ g/ml del α -tocoferol.

Palabras Clave: planta medicinal, antioxidante, antihiper glucemiante, α -tocoferol, DPPH, Folin-ciocalteu, trolox, Glucobay®, α -amilasa y α -glucosidasa.

Recibido | Received: 4 de Abril de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 30 de Mayo de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2013.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Se agradece el financiamiento entregado para la realización de este trabajo a la Universidad Técnica Particular de Loja, principalmente al Departamento de Química.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: M Alejandro-Espinosa, X Jaramillo-Fierro, S Ojeda-Riascos, O Malagón-Aviles, J Ramírez-Robles. 2013. Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 12(1): 59 – 68.

INTRODUCCIÓN

La diabetes *mellitus* (DM) llamada también diabetes sacarina, se define como una enfermedad progresiva crónica, constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de los hidratos de carbono, que alteran también al metabolismo lipídico y proteico (Alberti *et al.*, 2006; Hart y Collazo, 1998; Ramos *et al.*, 2006; Licea *et al.*, 2008). Se estima que el mundo hay más de 346 millones de personas con diabetes (WHO, 2011). Los tipos de diabetes más importantes son: tipo 1, en la que no se produce suficiente insulina, debido a la destrucción de las células β -pancreáticas, por tanto, el problema radica 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 en la sangre. La tipo 2, en cambio, es la más frecuente 90% de incidencia, se caracteriza por la dependencia o no de insulina, ya que las células del páncreas no producen la suficiente insulina para mover la cantidad de glucosa de la sangre a las células (WHO, 2011; Zimmet *et al.*, 2001). Esto genera daño vascular y complicaciones que se presentan a largo plazo, tales como: insuficiencia renal, daño a la retina, entre otras. Evidencias experimentales sugieren un vínculo entre los RL (radicales libres) y enfermedades tales como la diabetes, puesto que uno de los factores etiológicos implicados en el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones es el daño inducido por los RL, los mismos que provocan oxidación a las macromoléculas (proteínas, fosfolípidos poli-insaturados de las membranas celulares y ácidos nucleicos) que no puede ser contrarrestado por los sistemas de defensa antioxidantes, por lo que un compuesto con propiedades antioxidantes sería beneficioso contra la diabetes (Clapes, 2000; Modak *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2008; Muñoz y Gutiérrez, 2009; Vásquez *et al.*, 2007). Existen sustancias tales como los triterpenoides pentacíclicos, ácido ursólico y derivados de ácidos oleánicos, capaces de inhibir las enzimas: α -amilasa y α -glucosidasa que podrían ser usadas como antihiper glucemiantes, y que ayudan al tratamiento de la diabetes el mismo que consiste en disminuir la hiper glucemia postprandial mediante la absorción de glucosa a través de la inhibición de éstas enzimas en el tracto digestivo, las mismas que retrasan la digestión y provocan un aumento del tiempo de permanencia de los carbohidratos, causando una reducción en la tasa de absorción de la glucosa (Hasenah *et al.*, 2006; Shaiq-Ali *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2008; McCune y

Johns, 2002). Con estos antecedentes en los últimos años han aparecido 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 terapias alternativas (Bafna y Mishra, 2005). De esta manera surge la revolución verde de la medicina es decir el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos en vista que éstas contienen principios activos: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminoras), carotenoides, etc. (Katalinic, 2006; Aquino *et al.*, 2001), que pueden ser utilizados directamente o como precursores para la hemisíntesis en química farmacéutica (Matsui *et al.*, 2004; Tlacuilo y Acosta, 2007; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Eddouks *et al.*, 2002; Hamdan y Afifi 2004; Erasto *et al.*, 2005; Ernst, 1997; Grover *et al.*, 2002; Norah and Rowais, 2002; Alarcon-Aguilara *et al.*, 1998; Funke y Melzig, 2006; García *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción por los cuales preparados herbolarios 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, disminución de la pérdida de glucógeno, aumento del consumo de glucosa en los tejidos y órganos, eliminación RL, resistencia a la peroxidación de lípidos, estimulación o aumento de micro circulación de sangre en el organismo (Negri, 2005). Se ha considerado el estudio de la especie vegetal *Oreocallis grandiflora*, debido a que estudios etnobotánicos preliminares realizados en la Planta de Productos Naturales de la UTPL indican que 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, úlcera gástrica, inflamaciones, problemas de los ojos, y la gripe, por lo nos planteamos como objetivo evaluar la actividad antioxidante e antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Tene *et al.*, 2006; Ceroni, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas en estado de floración de *Oreocallis grandiflora*, fueron recolectadas en el mes de marzo del 2009 en el cantón Saraguro, provincia de Loja-Ecuador. El sector de recolección se encuentra ubicado en las coordenadas 17686765 E, 9602527 N a una altura de 2916 msnm. La muestra de herbario fue depositada en el Herbario del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja e identificada y almacenada con el código PPN-pe-001.

Obtención del extracto

Fueron obtenidos a partir de 200 g de hojas secas utilizando los solventes: hexano, acetato de etilo y metanol, el proceso se lo realizó tres veces de manera consecutiva a una relación solvente/planta (10:1). La extracción fue realizada a temperatura ambiente por maceración dinámica a 400 rpm durante 5 horas. Posteriormente cada extracto fue concentrado a una presión de 50 mbar a temperatura de 37 °C, obteniendo 6.58 g de extracto hexánico, 10.64 g de extracto en acetato de etilo y 14.34 g de extracto metanólico, posteriormente fueron almacenados a 4 °C.

Actividad Antihiper glucemiante

Preparación del control positivo

Se utilizó el Glucobay®, un inhibidor sintético cuyo principio activo es la acarbosa y cuya función es retrasar la absorción intestinal de los hidratos de carbono y ayudar a reducir la glucosa postprandial (Anda and Azparren, 1999). A partir de 1 mg se prepararon cinco concentraciones del control 50, 100, 500, 1000 y 2000 µg/mL disueltas en 3.22 mL de agua desionizada fría para ser empleadas en los dos ensayos.

Inhibición de α -amilasa

La detección de inhibición de α -amilasa se realizó mediante la técnica propuesta por Tsujita y Takechi, 2006. La solución enzimática fue preparada con 39.56U (1.72 mg) por ensayo en un volumen de 20 mL de agua desionizada fría. Una unidad de α -amilasa libera 1 mg de maltosa en 3 minutos a pH 6.9 a 20 °C (Tsujita y Takechi, 2006). En el ensayo se utilizaron tubos de 10 mL para realizar la reacción: 125 µL de almidón al 1% se llevo a ebullición junto con el PBS 20 mM (ClNa 81%, ClK 2%, Na₂PO₄ 15%, KH₂PO₄ 2%) por 15 minutos. Luego se mezcló con 125 µL de inhibidor a varias concentraciones (10, 50, 100, 500 y

1000 µg/mL) y se permitió alcanzar el equilibrio a 20 °C por 5 minutos. La reacción se inició al agregar 125 µL de solución enzimática. Toda la mezcla fue incubada a 20 °C por 3 minutos. Después la reacción fue detenida por adición de 125 µL de una solución DNS (96 mM de ácido 3,5-dinitrosalicílico y tartrato de sodio y potasio en NaOH 2M). Luego la muestra se llevó a un baño maría a 80 °C por un tiempo de 15 minutos. Finalmente la solución fue enfriada en hielo por 5 minutos y se agregó 2 mL de agua desionizada, obteniendo como volumen final 2.5 mL, se mezcló por inversión y se realizó la lectura de las absorbancias a 540 nm.

Inhibición de α -glucosidasa

La detección de inhibición de α -glucosidasa, se realizó mediante la técnica propuesta por Matsui *et al.* 1996. La solución enzimática fue preparada con 5.7U (1 mg) por ensayo en un volumen de 3.22 mL de agua desionizada fría. Una unidad de α -glucosidasa libera 1 µmoL de D-glucosa o p-nitrofenil (PNP) a partir de p-nitrofenil- α -D-glucosidasa (PNP-G) por minuto a pH 6.8 a 37 °C (Matsui *et al.*, 1996). En éste ensayo se utilizaron tubos de 10 mL para realizar la reacción: 35 µL de solución enzimática se mezcló con el inhibidor a varias concentraciones (10, 50, 100, 500 y 1000 µg/mL) y se mantuvo a 37 °C por 5 minutos para alcanzar el equilibrio. La reacción se inició al agregar 930 µL de PNP-G (0.914 mM en 2500 µL de PBS 67 mM (ClNa 81%, ClK 2%, Na₂PO₄ 15%, KH₂PO₄ 2%)) y toda la mezcla fue incubada a 37 °C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación adicionó a cada tubo 1 mL de solución TRIS (0.5 M) para detener completamente la reacción, obteniendo como volumen final 2 mL. Luego se mezcló por inversión y se inició la lectura de las absorbancias a 400 nm.

El porcentaje de inhibición para las dos enzimas fue expresado usando la siguiente ecuación:

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

donde B fue la absorbancia de la muestra, D fue absorbancia del blanco, A fue la absorbancia del control 1 (sin inhibidor) y C fue la absorbancia del control 2 (sin inhibidor y sin solución enzimática).

Determinación del CI_{50} para los ensayos de Inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa

El CI_{50} se define como la concentración de α -amilasa y/o de α -glucosidasa requerida para inhibir el 50% de la actividad de las mismas bajo las condiciones del

ensayo (Matsui *et al.*, 1996). Los porcentajes de actividad de α -amilasa y α -glucosidasa fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad} = (B - D)/(A - C) \times 100$$

donde B fue la absorbancia de la muestra, D fue absorbancia del blanco, A fue la absorbancia del control 1 (sin inhibidor) y C fue la absorbancia del control 2 (sin inhibidor y sin solución enzimática).

Actividad Antioxidante

Ensayo DPPH

Se utilizó el método descrito por López *et al.* 2007. Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo) a una concentración de 80 mM en metanol. Se utilizaron tubos de 10 mL para realizar la reacción; así mismo, se prepararon cinco concentraciones (5, 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{g/mL}$) de las muestras, así como también del α -tocoferol (1, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) y fueron disueltas en metanol. Un volumen de 1960 μL de la solución de DPPH fue mezclada con 40 μL de las muestras o del control, obteniendo como volumen final 2 mL y luego se procedió a la lectura de la absorbancia a 515 nm por 15 minutos a temperatura ambiente.

El porcentaje de inhibición para DPPH fue expresado usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = [(Abs_c - Abs_m)/Abs_c] \times 100$$

donde Abs_c fue la absorbancia del control negativo y Abs_m fue absorbancia de la muestra.

Ensayo β -CLAMS

El ensayo β -CLAMS, se realizó siguiendo el método reportado por (Bafna y Mishra, 2005). Se mezcló 500 μL de solución β -caroteno con cloroformo en un vial ambar con 500 mg de Tween 40 y 50 μL de ácido linolénico. La emulsión preparada fue concentrada a una temperatura de 45 °C, a presión de 50 mbar durante 5 minutos y se añadió 60 mL de H_2O_2 agitando vigorosamente durante 1 minuto. De ésta solución se mezcló 1960 μL con 40 μL de las muestras o del control, se prepararon cinco concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$) de las muestras y del α -tocoferol que fueron disueltas en metanol, obteniendo como volumen final 2 mL, se utilizaron tubos de 10 mL para realizar la reacción. Luego las muestras se incubaron en un baño maría a 50 °C por 2 horas. Finalmente procedemos a la lectura de la absorbancia a 470 nm. La actividad antioxidante del β -CLAMS se expresa como factor de protección (FPA) y se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Factor de protección antioxidante} = [(Abs_c - Abs_m)/Abs_c] \times 100$$

Donde:

Abs_c fue la absorbancia del control negativo ($Abs_{c,t=0} - Abs_{m,t=2h}$)

Abs_m fue absorbancia de la muestra ($Abs_{c,t=0} - Abs_{m,t=2h}$).

Cuantificación de fenoles totales

Ensayo FOLIN-CIOCALTEU

Para medir el contenido de compuestos fenólicos se utilizó el método reportado por Dastmalchi *et al.*, (2007). Se preparó previamente el reactivo Folin-Ciocalteu a una concentración 1N en agua destilada, y se lo mantuvo en refrigeración hasta su uso protegiéndolo de la luz. Así mismo se preparó una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% en agua destilada. Las concentraciones utilizadas de las muestras fueron: 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ y se prepararon en tubos de ensayo de 10 mL añadiendo 250 μL del extracto o control en 1500 μL de agua destilada y 125 μL del reactivo Folin-Ciocalteu, luego se mezcló vigorosamente, se mantuvo en reposo por 5 minutos, y se agregó 250 μL de Na_2CO_3 , obteniendo

como volumen final 2.125 mL. La solución se deja en reposo por un periodo de 2 horas y se procede a leer la absorbancia a 760 nm. Los valores obtenidos de las absorbancias fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco del extracto (Vidal *et al.*, 2001).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de regression logística – modelo Logit, con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el programa XLSTAT (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Antihiper glucemiante

Ensayos de Inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa

En la Tabla 1 y 2 se muestran los porcentajes de inhibición tanto para la enzima α -amilasa y α -glucosidasa respectivamente. La actividad inhibitoria del extracto metanólico (Tabla 1) frente a α -amilasa, muestra que a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ tiene un valor de $85.2 \pm 3.5\%$ frente al $96.6 \pm 1.7\%$ presentado por el Glucobay® a una concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$; además, presenta un CI_{50} de 109 $\mu\text{g/mL}$, frente a 126 $\mu\text{g/mL}$ del control, esto sugiere que el extracto tiene una actividad inhibitoria promisorio relevante frente al control positivo. Los datos de los extractos en acetato de etilo y hexánico no se presentan ya que no demostraron actividad inhibitoria importante. Así mismo, se demuestra que a las concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$ los porcentajes de inhibición frente a α -glucosidasa (Tabla 2) de los extractos metanólico ($99.6 \pm 0.3\%$), y en acetato de etilo ($77.2 \pm 3.1\%$) respectivamente, poseen una actividad inhibitoria relevante en comparación con el Glucobay® que a una concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$ presenta un inhibición de $61.6 \pm 1.6\%$. Los extractos metanólico y en acetato de etilo demuestran tener una actividad inhibitoria prometedora frente a α -glucosidasa siendo el extracto metanólico el más inhibitorio a una concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ y al poseer un CI_{50} de 3 $\mu\text{g/mL}$, frente a 1316 $\mu\text{g/mL}$ del Glucobay®. El objetivo de una terapia antidiabética en pacientes insulino dependientes (Diabetes Tipo 1) e insulino independientes (Diabetes Tipo 2) es alcanzar la normoglicemia y reducir la resistencia a la insulina

con la intención de mejorar el control metabólico y prevenir al paciente diabético futuras complicaciones (Onal *et al.*, 2005), una estrategia efectiva para el manejo de la diabetes Tipo 2 es la inhibición de estas dos enzimas: α -amilasa y α -glucosidasa (Krentz y Bailey, 2005), a fin de retardar la absorción de los carbohidratos, moderando así la elevación postprandial de azúcar en la sangre y minimizando los efectos de la dieta en la hiperglicemia (Bischoff, 1994); es así, que los extractos metanólicos y en acetato de etilo de la especie *Oreocallis grandiflora* al poseer una actividad inhibitoria relevante frente a dichas enzimas demuestran ser candidatos prometedores que puedan ser útiles en el tratamiento tanto de la diabetes Tipo 2. Sin embargo, la excesiva inhibición de α -amilasa debida a los inhibidores de α -glucosidasa como la acarbosa, conlleva ciertos efectos colaterales (distensión abdominal, flatulencia, meteorismo y posiblemente diarrea) como resultado de una anormal fermentación bacteriana de los carbohidratos no digeridos en el colón (Horri *et al.*, 1986). Según Kwon *et al.*, 2007a y Apostodilis *et al.*, 2006, afirman que los inhibidores naturales de α -amilasa y α -glucosidasa obtenidos de plantas tienen suave actividad inhibitoria contra α -amilasa y fuerte actividad inhibitoria contra α -glucosidasa, lo cual indica que estos pueden ser usados efectivamente en la terapia contra la hiperglicemia postprandial con reducidos efectos colaterales, esto se demuestra en la investigación ya que el extracto metanólico posee una actividad inhibitoria muy alta para α -glucosidasa frente a α -amilasa.

Tabla 1
Inhibición α -amilasa

EXTRACTO METANÓLICO		GLUCOBAY 50 mg	
CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICIÓN	CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICIÓN
10	0.0 ± 0.0	50	16.4 ± 4.9
50	42.7 ± 3.7	100	57.6 ± 4.6
100	55.8 ± 4.0	500	77.0 ± 1.2
500	75.6 ± 3.1	1000	92.4 ± 4.0
1000	85.2 ± 3.5	2000	96.6 ± 1.7

CONC: Concentración del extracto
% INHIBICION: Porcentaje de inhibición de la enzima

Tabla 2
Inhibición α -glucosidasa

EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO		EXTRACTO HEXÁNICO		EXTRACTO METANÓLICO		GLUCOBAY 50 mg	
CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICIÓN	CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICIÓN	CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICIÓN	CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICIÓN
10	16.6 \pm 3.9	10	0.3 \pm 0.3	1	1.1 \pm 1.8	50	0.5 \pm 0.3
50	34.3 \pm 4.0	50	0.3 \pm 0.3	5	79.5 \pm 3.0	100	8.6 \pm 3.4
100	52.1 \pm 4.9	100	12.4 \pm 0.9	10	90.0 \pm 2.4	500	20.5 \pm 6.7
500	70.3 \pm 2.0	500	19.0 \pm 1.1	50	97.1 \pm 1.8	1000	36.2 \pm 1.9
1000	77.2 \pm 3.1	1000	25.6 \pm 3.9	100	99.6 \pm 0.6	2000	61.6 \pm 1.6

CONC: Concentración del extracto
% INHIBICION: Porcentaje de inhibición de la enzima

Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales de las hojas de *Oreocallis grandiflora*

Ensayos DPPH, β -CLAMS y Folin-Ciocalteu

La reducción del radical DPPH (Tabla 3) por acción de los extractos metanólico, acetato de etilo y hexánico de la especie *Oreocallis grandiflora* muestran que a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ los porcentajes de inhibición son de 96.6 ± 0.3 , 97.2 ± 2.1 y $88.5 \pm 4.6\%$ respectivamente, y a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ el control positivo posee un actividad inhibitoria del $81.7 \pm 2.0\%$, lo que significa que la a muy altas concentraciones los extractos poseen inhibición muy promisoria frente al control positivo que a muy bajas concentraciones genera este tipo de inhibición: es decir a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ los tres extractos presentan un porcentaje de inhibición no significativo en comparación con el α -tocoferol. Así mismo, presentan valores de CI_{50} de 15 $\mu\text{g/mL}$, 69 $\mu\text{g/mL}$ y 134 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos metanólico, acetato de etilo y hexánico respectivamente, y de 5 $\mu\text{g/mL}$ para el control positivo, lo que sugiere que al estar los extractos metanólico y acetato de etilo a una concentración más alta que la del α -tocoferol sus CI_{50} son muy promisorios, no así para el extracto en acetato de etilo. Los datos sugieren que existe una posible actividad inhibitoria relevante contra los radicales libres, al actuar como antioxidante primario, es decir que interrumpe la cadena oxidativa y previene la formación de nuevos radicales libres (Ugartondo, 2009). En la Tabla 4 se muestra la capacidad antioxidante del extracto metanólico ($32.6 \pm 0.5\%$) frente a $63.4 \pm 0.7\%$ del control positivo, ambos a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$; además tienen un CI_{50} de

20 $\mu\text{g/mL}$ y 14 $\mu\text{g/mL}$ tanto para el extracto como el control. lo que sugiere que la actividad antioxidante del extracto es muy promisoria respecto de la del α -tocoferol. A partir de esto se concluye que el extracto metanólico de la especie *Oreocallis grandiflora* posee una relevante capacidad antioxidante comparado con el control y por ello podría ser considerado como promisorios protectores contra los ROS (Reactive oxygen species) (Murthy *et al.*, 2005) y así contrarrestando en parte la acción de estas sustancias antioxidantes en el organismo (Kwon *et al.*, 2007b). Además que, según Huang *et al.*, 2005 considera que un valor CI_{50} es inversamente proporcional a la actividad antioxidante; es decir, valores altos de CI_{50} existe una menor actividad antioxidante y viceversa. Los extractos en acetato de etilo y hexánico no mostraron actividad inhibitoria alguna. La Tabla 5 muestra que el extracto metanólico de la especie *Oreocallis grandiflora* presenta mayor concentración de compuestos fenólicos totales al poseer 174 ± 0.004 mg de ácido gálico por gramo de extracto respecto del control positivo que presenta 136 ± 0.00 mg/g de Trolox, a partir de esto se concluye que la especie *Oreocallis grandiflora* posee capacidad antioxidante promisoria produciendo como resultado la oxidación de fenoles (Vidal *et al.*, 2001), permitiendo actuar como agentes reductores donadores de hidrógeno y electrones e inhibidores de oxígeno individual (Sies *et al.* 1997). Además que se podrían utilizar como inhibidores naturales de α -amilasa ya que actualmente ofrecen una alternativa el tratamiento de la hiperglicemia postprandial o diabetes Tipo 2 (Mccue *et al.*, 2004).

Tabla 3
Ensayo DPPH

EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO		EXTRACTO HEXÁNICO		EXTRACTO METANÓLICO		α -tocoferol	
CONC. (μ g/ml)	% INHIBICIÓN	CONC. (μ g/ml)	% INHIBICIÓN	CONC. (μ g/ml)	% INHIBICIÓN	CONC. (μ g/ml)	% INHIBICIÓN
5	8.2 \pm 1.8	5	0.7 \pm 0.2	5	18.1 \pm 1.7	0.1	0.9 \pm 0.5
10	12.7 \pm 2.8	10	4.4 \pm 0.4	10	31.3 \pm 3.4	0.5	4.5 \pm 0.5
50	33.7 \pm 3.1	50	17.4 \pm 0.9	50	90.1 \pm 3.6	1	9.4 \pm 1.6
100	55.0 \pm 4.3	100	38.2 \pm 2.6	100	96.0 \pm 0.2	5	41.6 \pm 1.0
500	97.2 \pm 2.1	500	88.5 \pm 4.6	500	96.6 \pm 0.3	10	81.7 \pm 2.0

CONC: Concentración del extracto
% INHIBICION: Porcentaje de inhibición de la enzima

Tabla 4
Ensayo β -CLAMS

EXTRACTO METANÓLICO		GLUCOBAY 50 mg	
CONC. (μ g/ml)	% INHIBICIÓN	CONC. (μ g/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

CONC: Concentración del extracto
% INHIBICION: Porcentaje de inhibición de la enzima

Tabla 5
Concentración de fenoles totales

TIPO DE MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACION	M μ g AG	mg AG/g M
TROLOX	1.45933	0.00	13.58	136
H2O	0.00458	0.00	0.00	0
EXTRACTO METANÓLICO	1.86558	0.04	17.44	174

AG: ácido gálico
M: muestra

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha demostrado que existe una relación entre la diabetes, específicamente las secundarias, y el estrés oxidativo, esto se debe a que valores altos de glicemia conducen a éste proceso, ya que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno, radicales superóxido entre otras especies reactivas de oxígeno (ROS) (Clapés *et al.*, 2001), la especie *Oreocallis grandiflora* es este estudio ha demostrado tener actividades antihiper glucemiantes y antioxidantes promisorias que muestran la potencialidad de los extractos como agentes prometedores en el tratamiento de esta

enfermedad y ayudaría evitando que las especies ROS destruyan las células β -pancreáticas, y eso provoque que exista disminución de las defensas oxidativas, de tal manera que lo que se desea es ayudar a los pacientes que padecen ésta enfermedad al disminuir complicaciones como nefropatía, gangrena y ceguera (Prior *et al.*, 2005).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento entregado para la realización de este trabajo a la Universidad Técnica Particular de Loja, principalmente al Departamento de Química.

REFERENCIAS

- Ahmed H, Al-Mustafa TA, Al-Thunibat O. 2008. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. **J Biol Sci** 11: 351 - 358.
- Alarcon-Aguilara FJ, Roman-Ramos R, Perez-Gutierrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores-Saenz JL. 1998. Study of the effect of plants used as antidiabetics. **J Ethnopharmacol** 61: 101 - 110.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. 2006. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. **J Comp Diab Med** 23: 469 - 480.
- Anda E, Azparren A. 1999. Antidiabeticos orales. **Bol Inform Farmacoter Navarra** 7: 1 - 11.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **J Ethnopharmacol** 99: 325 - 348
- Apostolidis E, Kwon Y, Shetty K. 2006. Potential of select yogurts for diabetes and hypertension management. **J Food Biochem** 30: 699 - 717.
- Aquino R, Morelli S, Lauro M, 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.
- Bafna AR, Mishra SH. 2005. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigoorchiooides* Gaertn. **Ars Pharm** 46: 125 - 138.
- Bischoff H. 1994. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. **Eur J Clin Invest** 24: 3 - 10.
- Ceroni A. 2002. Datos etnobotánicos del poblado de Huaylingas. Cuenca la Gallega Morropon Piura. **Ecol Aplic** 1: 65 - 70.
- Clapés S. 2000. Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. **Rev Cub Inv Biomed** 19: 191 - 195.
- Clapés S, Torres O, Companioni M, Villariño U, Broche F, Céspedes E. 2001. Peroxidación lipídica de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. **Rev Cub Inv Biomed** 20: 93 - 98.
- Dastmalchi K, Damien Dorman HJ, Koşar M, Hiltunen R. 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **Food Sc Technol** 40: 239 - 248.
- Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H. 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). **J Ethnopharmacol** 82: 97 - 103.
- Erasto P, Adebola PO, Grierson DS, Afolayan AJ. 2005. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of diabetes in the Eastern Cape Province, South Africa. **Afr J Biotechnol** 4: 1458 - 1460.
- Ernst E. 1997. Plants with hypoglycemic activity in humans. **Phytomedicine** 4: 73 - 78.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature** 408: 239 - 247.
- Funke I, Melzig M. 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy-phytotherapeutic as inhibitors of α -amylase activity. **Braz J Pharmacogn** 16: 1 - 5.
- García L, Rojo D, García L, Maureen A. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. **Rev Cub Inv Biomed** 21: 214 - 218.
- Grover JK, Yadav S, Vats V. 2002. Medicinal plants on India with anti-diabetic potential. **J Ethnopharmacol** 81: 81 - 100.
- Gutierrez D, Ortiz C, Mendoza A. 2008. **Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal**. Simposio de metrología 2008 (Santiago de Querétaro, México, 22 al 24 de Octubre), 1-4.
- Hamdan II, Afifi FU. 2004. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. **J Ethnopharmacol** 93: 117 - 121.
- Hart W, Collazo M. 1998. Costos del diagnóstico y tratamiento de la diabetes *mellitus* en diferentes países del mundo. **Rev Cub Endocrinol** 9: 212 - 220.
- Hasenah A, Houghton PJ, Soumyanath A. 2006. α - Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **J Ethnopharmacol** 107: 449 - 455.
- Horri S, Fukase H, Matsuo T, Kameda Y. 1986. Synthesis and alpha-D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. **J Med Chem** 29: 1038 - 1046.

- Huang D, Boxin O, Ronald R. 2005. The Chemistry behind Antioxidant capacity Assays. **J Agric Food Chem** 53: 1841 - 1856.
- Katalinic V. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chem** 94: 550 - 557.
- Krentz A, Bailey C. 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. **Drugs** 65: 385 - 411.
- Kwon Y, Apostolidis E, Shetty K. 2007a. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. **J Food Biochem** 31: 370 - 385.
- Kwon Y, Apostolidis R, Labbe R, Shetty K. 2007b. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by phenolic phytochemicals of selected clonal herbs species of lamiaceae family and likely mode of action through proline oxidation. **Food Biotechnol** 21: 71 - 89.
- Levy I, Piñol C, Guardiola E. 2000. La utilización de la acarbose en atención primaria: Evaluación de la tolerancia y seguridad a largo plazo en 2.799 pacientes diabéticos tipo 2. **Avances en diabetología** 16: 135 - 140.
- Licea M, Bustamante M, Lemane M. 2008. Diabetes tipo 2 en niños y adolescentes: aspectos clínico-epidemiológicos, patogénicos y terapéuticos. **Rev Cub Endocrinol** 19: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-29532008000100007&script=sci_arttext (Consultada 3 de enero de 2013)
- López V, Akerreta S, Cavero R, Calvo M^a. 2007. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional de navarra. **Rev Fitoterapia** 7: 43 - 41.
- Matsui T, Ebuchi S, Fujise T, Kanthi A, Doi S, Yamada. 2004. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-*O*-caffeoyquinic acid. **Biol Pharm Bull** 27: 1797 - 1803.
- Matsui T, Yoshimoto C, Osajima K, Oki T, Osajima Y. 1996. In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. **Biosc Biotechnol Biochem** 60: 2019 - 2022.
- Mccue P, Kwon Y, Shetty k. 2004. Anti-amylase anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **J Food Biochem** 29: 278 - 294.
- McCune L, Johns T. 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous People of the North American boreal forest. **J Ethnopharmacol** 82: 107 - 205.
- Modak M, Dixit P, Londhe J, Ghaskadbi S, Devasagayam T. 2007. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. **J Clin Biochem Nut** 40: 163 - 173.
- Muñoz M, Gutiérrez D. 2009. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana glauca*. **Facultad Química. Universidad Autónoma de Queretaro** 1-4.
- Murthy K, Parvatam G, Rajasekaran T, Ravishankar G. 2005. **European Patente No.: WO 2005/063272**. E.P. European patent specification.
- Negri G. 2005. Diabetes melito: plantas e principios ativos naturais hipoglicemiantes. **Braz J Pharmaceut Sc** 41: 121 - 142.
- Norah A, Rowais A. 2002. Herbal medicine in the treatment of diabetes mellitus. **Saudi Med J** 23: 1327 - 1331.
- Önal S, Timmur S, Okuttucu B, Zihnioglu. 2005. Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. **Prep Biochem Biotechnol** 35: 29 - 36.
- Prior RL, Wu XL, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem** 53: 4290 - 4302.
- Ramos ML, Batista C, Gómez B, Zamora A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. **Investigación en Salud** 8: 7 - 15.
- Rosales M, González R. 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en ocho especies de pino. **Madera y Bosques** 9: 41 - 49.
- Shaiq-Ali M, Jahangir M, Hussan S.S, Iqbal M. 2002. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its syntetic derivatives. **Phytochemistry** 60: 295 - 299.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol** 82: 291 - 295.
- Tsujita T, Takeshi T. 2006. **US Patente N° 2006/030567**. Washington DC, US Patent application publication.
- Tene V, Malagón O, Vita Finzi P, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. 2006. An ethnobotanical Surrey of medicinal plants used in Loja and

- Zamora-Chinchipe, Ecuador. **J Ethnopharmacol** 111: 63 - 81.
- Tlacuilo A, Acosta A. 2007. Aislamiento de nuevos principios activos a partir de plantas terrestres. **Infármate** 3: 1 - 4.
- Ugartondo V. 2009. **Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en modelos celulares.** Tesis Doctoral. Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.
- 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 *Montano avolifolia*. **Scientia et Technica** 13: 1 - 5.
- Vidal A, Motidome M, Mancini-Filho J, Linares A, Midori M, Lapa A. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del agua marina *Bryothamnion triquetrum* Howe. **Braz J Pharmaceut Sc** 37: 373 - 382.
- WHO, 2011. **Diabetes: Report of a World Health Organization.** Fact sheet N° 312.
- Zimmet P, Albertini KGMM, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature** 414: 782 - 787.