



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO DE 8 EXTRACTOS DE ESPECIES
VEGETALES AMAZÓNICAS SOBRE LA α -GLUCOSIDASA, LORETO-
IQUITOS, 2016**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

PRESENTADO POR

DIEGO VASQUEZ TORRES

ASESOR:

Blgo. MARX PEÑA HIDALGO, M.Sc.

Q.F. MARTHA MILAGROS MACO LUJAN, M.Sc.

IQUITOS, PERÚ

2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS Nº 032

Iquitos, 02 de febrero de 2018

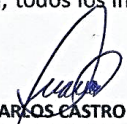
En la ciudad de Iquitos, a los dos días del mes de febrero del 2018 y, siendo las 10:00 horas; se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral Nº 126-2016-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por; Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr. (Presidente); Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr. (Miembro) y Blga. FELICIA DIAZ JARAMA, Dra. (Miembro), para escuchar, examinar y calificar la sustentación de la tesis titulada: "ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO DE 8 EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES AMAZÓNICAS SOBRE LA α -GLUCOSIDASA, LORETO-IQUITOS, 2016", por el Br. DIEGO VASQUEZ TORRES.

La Dirección de Formación Profesional de Ciencias Biológicas, mediante Resolución Directoral Nº 020-2018-DEFP-B-FCB-UNAP, de fecha 29 de enero de 2018, declara expedita para SUSTENTAR LA TESIS del Br. DIEGO VASQUEZ TORRES, promoción 2015-I, graduado con R.R. Nº 1400-2016-UNAP, de fecha 29 de noviembre 2016, se reconoce como ASESORES de la tesis a los profesionales: Blgo. MARX PEÑA HIDALGO, M.Sc. y Q.F. MARTHA M. MACO LUJAN, M.Sc.


Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL Nº 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADA COMO REGULAR; quedando en consecuencia el candidato apto para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12:00 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente acta de sustentación por septuplicado.


Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr.
PRESIDENTE


Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.
MIEMBRO


Blga. FELICIA DIAZ JARAMA, Dra.
MIEMBRO

Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú
Teléfono: 236121

www.unapiquitos.edu.pe
e – mail: fccbb@unapiquitos.edu.pe

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



**Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr.
PRESIDENTE**



**Blgo. JORGE LUIS MARAFARA DEL AGUILA, Dr.
MIEMBRO**

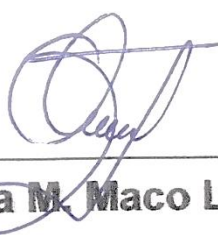


**Blga. FELICIA DIAZ JARAMA, Dra.
MIEMBRO**

ASESORES



Blgo. Marx Peña Hidalgo, M.Sc.



Q.F. Martha M. Maco Luján, M.Sc.

DEDICATORIA

A mis padres Rosa del Carmen
Torres Vásquez y Carlos Odilo
Vásquez Ochos, a mi hermana
Erika Pamela Vásquez Torres

Diego Vásquez Torres

AGRADECIMIENTO

- A mis asesores de tesis el Blgo. Marx Peña Hidalgo, M.Sc. y la Q.F. Martha Milagros Maco Luján, M.Sc. por la orientación, consejos y apoyo en el desarrollo de la tesis; Así como su valiosa contribución en mi formación profesional.
- Al proyecto «EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA MEDIANTE ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE TRES ESPECIES VEGETALES PROCEDENTES DE LA AMAZONÍA PERUANA» y a CIENCIACTIVA-FONDECYT por ser el ente principal de financiamiento en la realización de la Tesis.
- Al Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís, Director del Círculo de Estudios de Plantas Medicinales provenientes de la Amazonía Baja por la confianza brindada para la realización de esta tesis, apoyo incansable y ejemplo a seguir.
- Al Dr. José Alberto Aranda Ventura, y al Ing. Jorge Villacres Vallejo, por brindarme los laboratorios del instituto de Medicina Tradicional.
- Al equipo de investigaciones del Círculo de Estudios de Plantas Medicinales; La Dra. Dora García de Sotero, Ing. Úrsula Vanesa Monteiro Temmerman, Dra. Silvia Patricia Vásquez Flores, Blga. Bárbara Bardales Cabanillas, Q.F. Mario Javier De la Cruz, por el apoyo constante a lo largo del proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
PORTADA.....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESORES.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas.....	9
1.3. Definición de términos básicos	12
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	19
2.1 Formulación de la Hipótesis	19
2.2 Variables y su operacionalización	19
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	20
3.1 Tipo y diseño.....	20
3.2 Diseño muestral	20
3.3 Procedimientos de recolección de datos	21
3.3.1 Área de estudio	21
3.3.2 Colecta del material vegetal e identificación botánica	21
3.4 Procesamiento y análisis de los datos	25
3.4.1 Análisis estadístico	25
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	26
4.1. Porcentaje de inhibición de las especies	26
4.2. Determinación del IC50	34
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	36

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	40
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	41
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN	42
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Determinación del IC ₅₀ de ocho extractos acuosos liofilizados de especies vegetales amazónicas.....	34
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ecuación general de una reacción catalizada por enzimas.	14
Figura 2. Ecuación de una reacción catalizada por enzimas donde sólo participa un sustrato.	15
Figura 3. Relación gráfica de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima (V _m).....	15
Figura 4. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Abuta grandifolia</i> “Abuta” frente a la enzima α-glucosidasa.....	26
Figura 5. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Aspidosperma excelsum</i> “Remo caspi” frente a la enzima α-glucosidasa.	27
Figura 6. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Bahuinia glabra</i> “Pata de vaca” frente a la enzima α-glucosidasa.....	28
Figura 7. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Coussapoa asperifolia</i> “Renaco caspi” frente a la enzima α-glucosidasa.....	29
Figura 8. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Calycophyllum spruceanum</i> “Capirona” frente a la enzima α-glucosidasa.....	30
Figura 9. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Garcinia macrophylla</i> “Charichuelo grande” frente a la enzima α-glucosidasa.....	31
Figura 10. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Handroanthus obscurus</i> “Tahuari negro” frente a la enzima α-glucosidasa.	32
Figura 11. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de <i>Remijia pedunculata</i> “Chullachaqui caspi” frente a la enzima α-glucosidasa.....	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Cuadro que esquematiza el proceso de ensayo in vitro.....	48
--	----

RESUMEN

En la Amazonía Peruana los conocimientos tradicionales del efecto antidiabético de especies vegetales nativas son ampliamente estudiados por la etnobotánica. De tal manera que el objetivo de este estudio fue evaluar los extractos de ocho especies vegetales como potenciales inhibidores de la enzima α -glucosidasa. Las muestras fueron procesadas mediante técnicas estándares para obtener el extracto acuoso liofilizado. El ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa fue desarrollado de acuerdo al método propuesto por Artanti et al. 2012 y Srianta et al 2013. La especie *Coussapoa asperifolia* “Renaco caspi” mostró el más alto porcentaje de inhibición $97\% \pm 1,12$ y un IC50 de $32.1 \mu\text{g/mL}$. Así mismo, las especies *Remijia pedunculata* “Chullachaqui caspi”, *Bahuinia glabra* “Pata de vaca”, *Handroanthus obscurus* “Tahuari negro” y *Calycophyllum spruceanum* “Capirona” reportaron valores que se encuentran dentro del rango óptimo de actividad antihiper glucemiante en un modelo in vitro. En conclusión, varias de las especies estudiadas podrían ser catalogadas como potenciales antihiper glucemiantes. Siendo *Coussapoa asperifolia* “Renaco caspi”, una especie con gran potencial en el uso antihiper glucemiante, por los resultados obtenidos.

Palabras clave: Potencial antihiper glucemiante, patologías, antidiabéticos, método enzimático.

ABSTRACT

In the Peruvian Amazon, traditional knowledge of the antidiabetic effect of native plant species is widely studied by ethnobotanists. In such a way that the objective of this study was to evaluate the extracts of eight plant species as potential inhibitors of the enzyme α -glucosidase. The samples were processed using standard techniques to obtain the lyophilized aqueous extract. The α -glucosidase enzyme inhibition assay was developed according to the method proposed by Artanti et al. Year and Srianta et al Year. The species *Coussapoa asperifolia* "Renaco caspi" showed the highest percentage of inhibition $97\% \pm 1.12$ and an IC₅₀ of $32.1 \mu\text{g} / \text{mL}$. Likewise, the species *Remijia pedunculata* "Chullachaqui caspi", *Bahuinia glabra* "Pata de vaca", *Handroanthus obscurus* "Tahuari negro" and *Calycophyllum spruceanum* "Capirona" reported values that are within the optimal range of antihyperglycemic activity in an in vitro model. In conclusion, several of the species studied could be classified as potential antihyperglycemic agents. Being *Coussapoa asperifolia* "Renaco caspi", a species with great potential in antihyperglycemic use, due to the results obtained.

Keywords: Antihyperglycemic potential, pathologies, antidiabetic drugs, enzymatic method.

INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus (DM) se sitúa como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad para la población a nivel mundial, en nuestro país se encuentra catalogada dentro de las 10 principales causas de muerte; ésta constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de carácter crónico, caracterizada principalmente por una concentración anormal elevada de glucosa en la sangre, comúnmente llamada hiperglucemia (4). Así mismo; en la Amazonía las especies vegetales son fundamentales en el modo de vida del poblador amazónico, ya que se usan para satisfacer necesidades de salud, utilizadas como medicina natural (2). Este conocimiento tradicional constituye una fuente primaria de información potencial para el desarrollo de investigaciones en el campo de la farmacología (3). En este sentido, los estudios en etnobotánica reportan a muchas especies vegetales amazónicas actúan favorablemente en el tratamiento de la hiperglucemia, atenuando sus síntomas y posibles consecuencias (6, 7,8). Por lo tanto es importante realizar estudio de bioprospección de plantas amazónicas con antecedentes de actividad antidiabética y validar estos conocimientos con estudios experimentales.

En ese sentido; en nuestro país, el tratamiento y control de la DM representa un alto costo para el sistema nacional de salud; así mismo, se genera en las personas que lo padecen estados de morbilidad, depresión para la familia y un alto impacto económico (5). En este contexto, han surgido diversos estudios en pro del tratamiento y mejora de la calidad de vida de los pacientes

que la padecen, entre ellos se destacan diversas investigaciones de especies vegetales que ofrecen terapias tanto profilácticas como de mantenimiento (6). Por ello, los ensayos in vitro apertura un espacio de importancia en la investigación como soporte experimental para el tratamiento terapéutico sobre DM en la medicina complementaria, pues proporcionan resultados con mucha precisión del efecto de los metabolitos de extractos vegetales para el tratamiento de la DM (10); Aportando así conocimientos sobre potencial biológico de estas especies. Por consecuencia, el desarrollo de un método analítico que determine el comportamiento de los extracto en disminuir la hiperglicemia se hace urgente.

Finalmente, los estudios de plantas amazónicas con actividad antidiabética realizados a la fecha, son ampliamente desarrollados en modelos in vivo. Siendo los modelos in vitro un paso importante como ensayo previo a los modelos in vivo. Debido a esto, El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad inhibitoria in vitro de 8 extractos de especies vegetales amazónicas sobre la α -glucosidasa. Así mismo, determinar los porcentajes de inhibición de la enzima y realizar el IC₅₀ de cada extracto.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Lecca & Rojas (2011), evaluaron el efecto hipoglicemiente del extracto acuoso liofilizado de *Abuta rufescens*, en un modelo *in vivo* con ratas machos cepa holtzmann mediante administración oral durante 28 días, las dosis ensayadas fueron de 14.6 mg/kg/pc y 29 mg/kg/pc y como control positivo se usó Glibenclamida. Según los resultados obtenidos, el extracto acuoso liofilizado de *Abuta rufescens* a dosis de 14.6 mg/kg/pc tuvo una disminución de los niveles séricos de glucosa de 78.16%, mientras que a dosis de 29.36 mg/kg/pc se obtuvo 80.74% respectivamente; se atribuyen los efectos hipoglicemiantes de las dosis usadas a la presencia de metabolitos secundarios (componentes químicos) que tiene la planta.

Sosa et al, (2011), evaluaron la composición fitoquímica de la especie *Aspidosperma excelsum* "Remocaspi" como potencial para posteriores estudios de sus efectos biológicos, en el que determinó de manera cualitativa las familias químicas presentes en el extracto sometido a diversos solventes polares. Entre los compuestos presentes reportaron una cantidad moderada de cumarinas, alcaloides, triterpenos, flavonoides y esteroides. Donde se confirmó la presencia de metabolitos secundarios de en la especie, y concluyo que su uso de esta especie viene siendo utilizada como etnoterapéutica por los moradores de la comunidad Bora de San Andrés el río Momón.

Velásquez & Posada (2013), evaluaron la actividad anti-inflamatoria en un modelo in vitro de la especie vegetal *Tabebuia chrysanta* mediante la estimulación de macrófagos murinos RAW264.7 con LPS; los extractos y fracciones obtenidas en fueron a partir de los siguientes solventes: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y agua, obtenidos a partir de la corteza interna de *Tabebuia chrysantha*. Los resultados obtenidos en este estudio señalan que la estimulación de los macrófagos murinos RAW264.7 con LPS indujo a la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α mostrando altos niveles de inhibición en la producción de TNF- α así mismo el análisis químico del material vegetal muestra la presencia de flavonoides, saponinas y quinonas; metabolitos secundarios de alta actividad farmacológica.

Soares et al, (2015), desarrollaron un levantamiento de información sobre plantas medicinales de uso popular, utilizadas para el tratamiento de enfermedades crónicas en el estado de Mato Grosso (Brasil); mediante el método de investigación bibliográfica exploratorio, descriptivo de revistas indizadas y encuestas. Este estudio reporta a *Bauhinia nitida* como especie vegetal ampliamente utilizadas en la terapia complementaria para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II, el uso más común es en forma de té de las hojas. Los autores concluyen de importancia la posterior realización de estudios farmacológicos complementarios a las revisiones bibliográficas que investiguen los efectos de las plantas utilizadas por la población.

Apostolidis & Lee (2010), investigaron el potencial inhibitorio de la enzima α -glucosidasa de *Ascophyllum nodosum*; Los autores postulan que la variable

temperatura influye en el porcentaje de inhibición, para medir esta hipótesis sometieron la extracción de los compuestos activos a temperaturas entre 20°C y 80°C y se utilizó como solvente el agua, reportan un IC₅₀ óptimo a una extracción de 80°C; se concluyó que la alta actividad inhibitoria in vitro frente a α -glucosidasa se debe al alto contenido de fenólicos que posee *Ascophyllum nodosum*.

Elya et al, (2012), estudiaron los extractos etanólicos al 80% de un total de 47 plantas de Indonesia, evaluando actividad inhibitoria de α -glucosidasa de plantas de la familia Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae y Rubiaceae; usando espectrofotometría para el análisis, obtuvieron valores de IC₅₀ en un rango de 2.33-112.02 μ g/mL y utilizaron acarbosa como control positivo, también se realizaron el análisis e identificación química de los alcaloides, flavonoides, terpenos, taninos y saponinas.

Kang et al, (2012), estudiaron los compuestos activos del extracto etanólico de *Osmanthus fragrans*, donde las fracciones del ácido oleanólico y del ácido ursólico fueron aislados y sometidos al bioensayo inhibitorio *in vitro* de la enzima α -glucosidasa. Los resultados muestran una alta actividad con un IC₅₀ de 12,5 μ g/mL frente a 1081,27 μ g/mL del control positivo, donde se sugieren que las fracciones estudiadas de los extracto de *Osmanthus fragrans* podrían tener una fuerte actividad antidiabética y ser de valor terapéutico.

Nair et al, (2013), realizaron un análisis preliminar usando el método enzimático inhibitorio in vitro de α -glucosidasa de los extractos de las

especies vegetales *Artrocarpus altilis*, *Artrocarpus heterophyllum*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Piper betel*; usando espectrofotometría para el análisis, las especies *A. altilis* y *A. heterophyllum* mostraron mayor actividad inhibitoria, y obtuvieron valores IC_{50} de $129.85 \pm 10.29 \mu\text{g/mL}$ y $76.90 \pm 9.55 \mu\text{g/mL}$ respectivamente; donde concluyeron que existe una relación entre los polifenoles presentes en los extractos de las plantas y la actividad antihiperlicemiante, así mismo la necesidad de ensayos complementarios podrían determinar la confiabilidad de estas plantas como potenciales agentes farmacológicos para el tratamiento de la hiperglicemia.

Espinoza, A. (2013), evaluó la actividad antihiperlicemiante y antioxidante in vitro de extractos hexánicos y metanólicos de la especie *Oreocallis grandiflora* "Cucharillo" colectada en la provincia de Loja, Ecuador. Los resultados en cuanto a los porcentajes de inhibición de α -glucosidasa de los extractos metanólico ($99.6 \pm 0.3\%$), y en acetato de etilo ($77.2 \pm 3.1\%$) respectivamente, los que poseen una actividad inhibitoria relevante en comparación con el Glucobay 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 gran actividad inhibitoria frente a la α -glucosidasa, siendo el extracto metanólico el más inhibitorio a una concentración $100 \mu\text{g/mL}$ y al poseer un IC_{50} de $3 \mu\text{g/mL}$, frente a $1316 \mu\text{g/mL}$ del Glucobay.

Sevilla et al, (2013), estudiaron los efectos antioxidante e inhibitorio de α -glucosidasa y α -amilasa de los extractos acuosos de *Cinnamomum zeylanicum* "canela", *Cuminum cyminum* "comino", *Origanum vulgare*

"orégano, *Piper nigrum* "pimienta negra" y *Eugenia caryophyllus* "clavo". Los resultados muestran la capacidad inhibitoria a la enzima α -glucosidasa de las especie que fue de (22- 70 %), a la concentración estandarizada de 0.25 mM de compuestos fenólicos totales, en los ensayos demuestran que la mayor actividad fue *Cinnamomum zeylanicum*, mientras que los extractos acuosos de *Origanum vulgare* muestran menor inhibición de la actividad. El inhibidor de referencia fue acarbosa, mostrando una inhibición del 93 %.

Srianta et al, (2013), evaluaron la actividad inhibitoria in vitro del extracto de la especie *Monascus sp.* (Dioscoreaceae) mediante la inhibición enzimática de α -glucosidasa por espectrofotometría, así mismo se realizó el análisis de fenólicos totales y la efectividad de los solventes etanol y agua en relación al porcentaje de inhibición. Los resultados muestran que el IC₅₀ de mayor actividad se obtuvo del extracto etanólico con un 199.1 μ g/mL. Y concluyeron la importancia del uso de α -glucosidasa que ayuda a prevenir la hiperglicemia postprandial retrasando la degradación de carbohidratos a glucosa.

López et al, (2014), reportaron la capacidad antiradical de la cebolla; Además determinaron, contenido de compuestos fenólicos totales y la inhibición de la enzima α -glucosidasa de extractos acuosos y etanólicos de tres variedades de cebolla. Donde encontraron gran actividad de los extractos que usaron como solvente el etanol, teniendo una inhibición de 34% a 58% de α -glucosidasa; entre los extractos etanólicos de cebolla probados a la concentración máxima inhibitoria (0.7mg/mL), solamente la variedad blanca inhibe la actividad α -glucosidasa más allá del 50%, este estudio postula que

los extractos acuosos son menos efectivos frente a extractos tratados con otros solventes.

Shori, A. (2015), realizó la revisión bibliográfica de las siguientes plantas medicinales: *Santalum spicatum*, *Pterocarpus marsupium*, *Acacia ligulata*, *Beyeria leshnaultii*, *Mucuna pruriens*, *Boerhaavia diffusa*, *Telfairia occidentalis*, *Struchium sparganophora*, *Amaranthus cruentus*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus spiralis*, *Artocarpus heterophyllus*, *Artocarpus altilis*, *Piper betel*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Rhodiola rosea*, *Rhodiola crenulata*, *Pine*, *Solanum surratense*, *Asystasia gangetica*, *Syzygium aromaticum*, *Abelmoscus esculentus*, *Senna surattensis*, *Crataeva magna*, *Swertia kouitchensis*, *Eleusine coracana*, *Capsicum annum*, *Potentilla fulgens*, *Carex baccans*, *Glycine max*, *Thymus quinquecostatus*, *Ecklonia maxima*, *Ribes nigrum*, *Sorbus aucuparia*, *Epimedium brevicornum*, *Stillingia lineata*, *Erythroxyllum laurifolium*, *Elaeodendron orientale*, *Antidesma madagascariensis*, *Flemingia macrophylla*, *Flemingia lineata*; en las que detalló la actividad antihyperglicemiante mediante el bioensayo de inhibición de la α -glucosidasa; así como los solventes usados para la extracción de los principios activos (metanol, etanol y agua), la parte de la planta usada y los valores de IC₅₀ de cada especie vegetal.

1.2. Bases teóricas

La Amazonía Peruana comparte con los ocho países amazónicos no sólo la más grande cuenca del planeta, sino también la mayor diversidad biológica del mundo (12). Es también poseedora de diversas plantas que se usan en el tratamiento de dolencias. El conocimiento de las propiedades curativas se ha ido acumulando durante muchas generaciones formando así una rica herencia cultural, la que se transmite de generación en generación, en la que se reconoce el uso de especies vegetales para el tratamiento de enfermedades desde épocas pre-incaica (2), así mismo existen investigaciones sobre los conocimientos en etnobotánica de las comunidades asentadas en la Región Loreto (10, 12, 13).

Estas investigaciones reportan una gran cantidad de plantas utilizadas como antidiabéticas, es así que se genera la importancia realizar la validación de estas especies vegetales por medio de ensayos que justifique su uso empírico (14), entre ellas destacan el *Aspidosperma excelsum* Benth “Remocaspi” especie ampliamente distribuida en zonas tropicales, de hábito arbóreo llegando a medir hasta 30 m. de alto; se caracteriza por la presencia de látex de color blanco y hojas simples lanceoladas. Generalmente se encuentra en bosques de tierra firme, bosques arenosos y en planicies inundables; comunidades amazónicas reconocen a esta especie como útil en el tratamiento de la malaria y control de la diabetes (15); *Handroanthus obscurus* (Bureau & K.Schum.) Mattos “Tahuari negro”, árbol de aproximadamente 20 m. de alto; su corteza es de color marrón claro, hojas compuestas y opuestas; se reconoce esta especie por el tallo cilíndrico y corteza agrietada típica de la especie. La

corteza es utilizada popularmente en la medicina tradicional en el tratamiento de las úlceras gástricas, como antiparasitario, antireumático y en el tratamiento preventivo de la diabetes (13, 16). Así mismo a la especie *Garcinia macrophylla* Mart “Charichuelo grande”, es un árbol que presenta al rayar la corteza y las ramas un látex pegajoso y denso de color amarillo; Las hojas son simples y alternas y el peciolo presenta una cavidad intrapeciolar. Se le atribuye alta actividad antiparasitaria (Leishmania, antimalarico), analgésica, antiinflamatoria y antidiabética (13). La especie *Bauhinia glabra* Jacq. “Pata de vaca”, se caracteriza por ser una especie de hábito arbustivo, con hojas de hojas largas, hendidas, enteras y multinervadas desde la base; el peciolo posee pulvínulo en el ápice y estípulas caducas; las flores son de color blanco; es de importancia en la medicina tradicional por sus propiedades antidiuréticas, en la absorción del colesterol y como antidiabética (13). La especie *Abuta grandifolia* “Abuta”, es una liana de consistencia leñosa, El fuste es achatado y la presencia de ritidoma de color marrón levemente fisurado y lenticelado. Las hojas son coriáceas de tamaño variable, posee hojas simples y alenas, venación palmada. Inflorescencia de tipo racimo y fruto drupa; esta especie se encuentra frecuentemente en zonas bajas. Es considerada una especie de interés, ya que sus usos populares en la Amazonía siguen siendo investigados por sus propiedades en el tratamiento de los cálculos renales, relajante muscular, esterilidad, leishmaniasis y diabetes (7, 17). *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. “Capirona”, especie de hábito arbóreo de entre 20 y 35 m. de alto, con fuste recto y cilíndrico, corteza lisa de color verde, muy característica; homogénea y

lustrosa, posee ritidoma papiráceo de color rojizo que se despende en placas grandes e irregulares. Las hojas son simples, opuestas y decusadas. Se le atribuye acción sobre diversas patologías entre las que destaca como cicatrizante, hemostático, heridas infectadas, hongos de la piel, infecciones oculares, leishmaniasis, mordeduras, picaduras y diabetes (13).

A su vez, algunos estudios sobre plantas potencialmente antidiabéticas se llevaron a cabo en la Amazonía Peruana (17, 18, 19). La especie *Aspidosperma excelsum* Benth "Remocaspi" se evaluó como potencial etnoterapéutica utilizada por los moradores de la comunidad Bora de San Andrés el río Momón, donde se confirmó la presencia de metabolitos secundarios en extractos sometido a diversos solventes polares (14). En los estudios de la especie *Abuta rufescens* como potencial antidiabética, se utilizaron extractos acuosos liofilizados a diferentes concentraciones, reportando resultados positivos y confirmando la presencia de componentes químicos que tienen las plantas, que producen una disminución de los niveles séricos de glucosa en la sangre (17). Además, se concluye de importancia la realización de estudios farmacológicos experimentales complementarios a la información etnobotánica y revisiones bibliográficas que investiguen los efectos de las plantas utilizadas por la población como terapia complementaria para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (20).

1.3. Definición de términos básicos

Enzimas. - Son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción (17).

Insulina.- La insulina es una hormona que se produce en el páncreas. La insulina permite que la glucosa entre en las células del cuerpo, donde se convierte en energía. La insulina se sintetiza a partir de una larga cadena precursora, o preproinsulina, la cual se fracciona para dar lugar a la molécula de proinsulina, que tiene 86 aminoácidos. Esta última, a su vez, es procesada por enzimas de conversión, generando insulina y una pequeña fracción peptídica (péptido C) (23).

Espectrofotometría UV/VIS.- Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (18).

Planta medicinal.- Cualquier especie vegetal que contenga en uno de sus órganos, los principios activos con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos (4).

Extracción con solventes.- Consiste básicamente en colocar en contacto la parte de la planta con un solvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben de pasar de la planta al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando el disolvente. La extracción con solventes es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos (24).

Liofilización o criodesecación al vacío. - Es el método por el cual se reduce la mayor cantidad de agua de un extracto. Consiste en congelar el extracto a temperaturas muy bajas, entre -40°C y -80°C , y luego sublimar el agua aplicando vacío y calentando. El agua pasa directamente del sólido a vapor, y el extracto queda con una cantidad de agua muy baja y adquiere una consistencia esponjosa (7).

IC_{50} .- Es una medida de eficacia de la droga. Indica cuánto de la droga particular o de la otra sustancia (inhibidor) es necesario para inhibir un proceso biológico dado por la mitad, es decir es la media (el 50%) concentración inhibitoria máxima (IC) de una sustancia (IC del 50%, o del IC_{50}). Se utiliza comúnmente como medida de la potencia de la droga del antagonista en la investigación farmacológica (25).

Aspectos generales de la α -glucosidasa y su cinética.

Las hidrolasas son enzimas que catalizan las reacciones de hidrólisis de diferentes sustratos como ésteres de ácidos carboxílicos y de ácidos fosfóricos, éteres, péptidos y carbohidratos utilizando agua en el proceso. Las hidrolasas son importantes en la industria química, farmacéutica y de alimentos. Un grupo importante de hidrolasas son las glicósido hidrolasas (GH) estas son una subclase de las hidrolasas, que actúan sobre los enlaces glicosídicos (α y β) de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos con el fin de obtener unidades de monosacáridos bajo dos mecanismos: inversión o retención. Las α -Glucosidasas pertenecen a esta subclase de enzimas ⁽⁷⁾, están presentes en una amplia gama de seres vivos como microorganismos, hongos, plantas y animales. La especificidad por el sustrato y sus propiedades dependen en gran medida de la fuente donde ella haya sido obtenida (21).

Comportamiento de la cinética de la α -glucosidasa está relacionado en un principio con la catálisis enzimática, ésta puede ser descrita en la ecuación 1 (Figura 1).

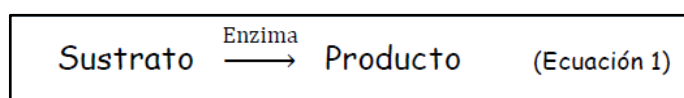


Figura 1. Ecuación general de una reacción catalizada por enzimas.

Las reacciones químicas catalizadas por enzimas donde se involucra un solo sustrato, se describen en la ecuación 2 (Figura 2); la α -Glucosidasa sólo requiere un solo sustrato; donde E es la enzima, S es el sustrato, ES es el complejo enzima-sustrato y P es el producto. La reacción enzimática transcurre en dos etapas: en la primera etapa, la enzima se enlaza al sustrato con el propósito de formar el complejo enzima sustrato la cual es

una reacción reversible; mientras que en la segunda etapa, el sustrato se ha transformado en producto y la enzima permanece sin ninguna modificación durante el ciclo catalítico (7).

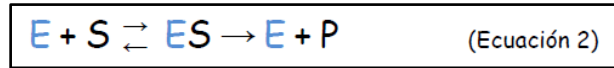


Figura 2. Ecuación de una reacción catalizada por enzimas donde sólo participa un sustrato.

Dentro de los parámetros cinéticos que se conocen para definir las propiedades de las enzimas son la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima (V_m)

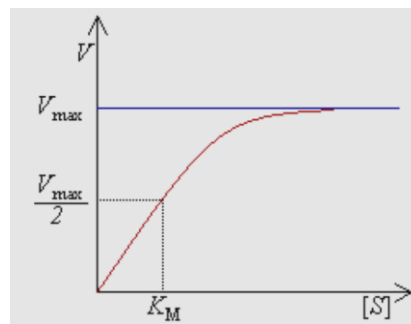


Figura 3. Relación gráfica de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima (V_m).

La constante de Michaelis-Menten se define como la concentración de sustrato a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima (V_m). El Valor de K_m nos da una idea la afinidad que tiene el enzima por su sustrato, cuanto mayor es K_m , menor es la afinidad; cuanto menor es K_m , mayor es la afinidad. La velocidad máxima (V_m) se define como la velocidad cuando todo el enzima se encuentra unido al sustrato, es decir, estima el número de centros activos del enzima. Se puede observar que a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción inicial ($1/2 V_m$) es proporcional al valor de K_m , la cual es un valor específico de concentración

del sustrato donde la reacción es de primer orden con respecto al sustrato (Figura 3) (9).

Inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad; de este modo, es como puede detener la actividad de un organismo patógeno o corregir un desequilibrio metabólico, muchos medicamentos actúan como inhibidores enzimáticos (11). La unión de un inhibidor puede competir con el sustrato y ganar el sitio activo de la enzima y así lograr obstaculizar a la enzima evitando que catalice la reacción. La unión del inhibidor puede ser reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles usualmente reaccionan con la enzima y cambian su estructura química. Estos inhibidores modifican los residuos esenciales de los aminoácidos necesarios para la actividad enzimática. En cambio, los inhibidores reversibles se unen a la enzima de forma no covalente y diferentes tipos de inhibiciones son producidas dependiendo si el inhibidor se une a la enzima, al complejo enzima-sustrato o a los dos (22).

Tipos de Inhibidores. - Existen tres tipos de inhibidores de las α -glucosidasas, basados en su estructura química generalmente hidroxilados; 1) compuestos heterocíclicos N-sustituidos poli-hidroxilados, 2) ciclo-alquenos poli-hidroxilados y 3) oligómeros de pseudoazúcares. A nivel farmacológico, dentro de los inhibidores naturales de esta enzima, existen compuestos de origen bacteriano como la acarbosa, el miglitol y la Voglibosa (hemi-sintético); son ingredientes activos en medicamentos contra la diabetes tipo II (22). La acarbosa es un inhibidor de las α -glucosidasa intestinales, es un Pseudo oligosacárido que actúa como un inhibidor competitivo de las α -glucosidasa que están localizadas en el

borde en cepillo del intestino delgado, que son las enzimas que actúan en el desdoblamiento de la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa). El resultado es una demora en la digestión de los hidratos de carbono con reducción de los picos glucémicos postprandiales. Actualmente, los medicamentos procedentes de plantas que actúan bajo el mecanismo de inhibición de las α -Glucosidasas son muy pocos; los metabolitos secundarios que son ingredientes activos en dichos medicamentos, se les han realizado modificaciones hemi-sintéticas como triterpénos que han sido hibridados, la α -amirina, el lupeol y la niacina N-alílicas/ N-alquílicas (22, 23).

Así mismo, los métodos fotométricos son los más utilizados para cuantificar la actividad catalítica de una enzima. El método por el cual se propone la evaluación de la actividad inhibitoria α -Glucosidasa en extractos vegetales, consiste en la hidrólisis enzimática del sustrato de origen sintético, p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido (p-NFGP) que por acción de la α -glucosidasa, libera unidades de p-nitrofenolato y α -D-glucosa. Donde el ión p-nitrofenolato presenta una coloración amarillo claro que evidencia que la reacción de hidrólisis enzimática se ha llevado a cabo; sin embargo, en ocasiones no se observa claramente. Varios autores proponen que para intensificar el color, se debe adicionar una solución básica con el objetivo de generar un ambiente denso en electrones para que el anión p-nitrofenolato entre en resonancia y se estabilice, teniendo en cuenta que toda la concentración sustrato (p-NFGP) ha reaccionado con la enzima y no se presenten falsos-positivos en los resultados debido que el sustrato p-NFGP es susceptible de reaccionar frente a una hidrólisis básica (7, 24).

En ese sentido, investigaciones recientes, desarrollaron un modelo *in vitro* para el análisis de especies vegetales con actividad antihiperlicemiante, mediante la inhibición enzimática de la α -glucosidasa y usando como control para el ensayo al fármaco Acarbosa (21, 24, 25); usando espectrofotometría para el análisis se estudiaron los extractos etanólicos al 80% de un total de 47 especies vegetales de Indonesia; especies pertenecientes a las familias Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae y Rubiaceae (26). Además, con la investigación de la especie *Ascophyllum nodosum*, se postuló que la variable temperatura influye en el porcentaje de inhibición. Para medir esta hipótesis sometieron la extracción de los compuestos activos a temperaturas entre 20°C y 80°C y se utilizó como solvente el agua; Los autores reportan un IC₅₀ óptimo a una extracción de 80°C y se concluyó que la alta actividad inhibitoria *in vitro* frente a α -glucosidasa se debe al alto contenido de fenólicos que posee *Ascophyllum nodosum* (27).

Es por ello que, el análisis preliminar usando el método enzimático inhibitorio *in vitro* de α -glucosidasa de los extractos de las especies vegetales *Artrocarpus atilis*, *Artrocarpus heterophyllum*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Piper betel*; usando espectrofotometría para el análisis, concluyó que existe una relación entre los polifenoles presentes en los extractos de las plantas y la actividad antihiperlicemiante, se concluyó la necesidad de ensayos complementarios para determinar la confiabilidad de estas plantas como potenciales agentes farmacológicos para el tratamiento de la diabetes (28).

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la Hipótesis

Ha: Los extractos acuosos liofilizados de 8 especies vegetales presentan actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa.

H₀: Los extractos acuosos liofilizados de 8 especies vegetales no presentan actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa.

2.2 Variables y su operacionalización

Variable	Indicador	Índice	Escala	Pregunta
Dependiente Extractos acuosos liofilizados de 8 especies vegetales	Concentración del extracto	$\mu\text{g/mL}$	Continua	¿Presentan actividad inhibitoria in vitro los 8 extractos de especies vegetales amazónicas sobre la α -glucosidasa?
Independiente Actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa.	inhibición	%	Continua	

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño

Tipo de investigación. - No experimental, porque el estudio se limita a evaluar los extractos y obtener el IC₅₀ inhibitorio frente a la α -glucosidasa. Sin intervenir o manipular variables.

Diseño de investigación. - Descriptivo comparativo, porque, parte de la consideración de 8 extractos donde se recoleta información del IC₅₀ de inhibición de cada uno de los 8 grupos independientemente para determinar las diferencias en el comportamiento de la inhibición.

3.2 Diseño muestral

3.2.1 Población. - Son todas y cada una de las ocho diferentes especies presentes en los lugares de colecta de la región amazónica, que ha sido clasificadas para el estudio (Jenaro Herrera, IMET, Tamshiyacu, INIA y Arboretum-UNAP), de estas diferentes especies se tomaran muestras de hojas y cortezas para preparación de extractos.

3.2.2 Muestra. - Los ocho extractos de las diferentes especies serán sometidos a 10 repeticiones de reacción inhibitoria sobre alfa glucosidasa para cada una de las ocho especies, donde se obtendrán datos del IC₅₀ que serán analizadas.

3.3 Procedimientos de recolección de datos

3.3.1 Área de estudio

El siguiente estudio se realizó en el Departamento de Loreto, provincia de Maynas, distrito de Iquitos; ciudad localizada a 124.4 m.sn.m. y una latitud sur de 03°45'05,865'' y una latitud oeste de 73°14'40,970'' ubicada en la región oriental del Perú.

El análisis experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología del Instituto de Medicina Tradicional – EsSalud “IMET”, ubicado en el Pasaje San Lorenzo 205, distrito de San Juan Bautista, Provincia Maynas del departamento de Loreto, donde se realizaron los ensayos de la actividad antihiperlicemiantes de los extractos vegetales.

3.3.2 Colecta del material vegetal e identificación botánica

Una vez ubicadas las especies, se registraron las coordenadas de cada individuo con un GPS marca Garmin, luego a cada árbol se le puso una placa de metal con un código correlativo. Para colectar las hojas se utilizó una tijera telescópica, y solo se colectó las hojas en buen estado, se tuvo en cuenta la presencia de marcas de herbivoría y hongos macroscópicos en las hojas y corteza; luego fueron almacenadas en sobres manila con su código respectivo para su posterior procesamiento.

3.3.3 Procesamiento de las muestras y métodos empleados

Se realizó en el área de producción del Instituto de Medicina Tradicional, donde las hojas pasaron por un proceso de selección, en la cual se escogieron hojas sanas, que no presenten hongos ni heridas. Las que se lavaron con una solución con hipoclorito de sodio al 6%, luego se enjuagaron con abundante agua destilada, restregando el haz y envés de la hoja, para luego llevar a secar en una estufa a 40°C.

3.3.3.1 Obtención de extractos.

Cada uno de las 8 especies se procesaron de la siguiente manera: se pesó 50 mg de la muestra obtenida previa molienda de la planta, se adicionó 500 mL de agua destilada. Ésta mezcla se calentó en una parrilla eléctrica siendo agitada constantemente. La temperatura se mantuvo entre 60 y 70°C por un tiempo de 3 horas. Posteriormente se dejó enfriar y se filtró con papel Whatman, para luego concentrar con un Rotavapor a 45°C por un tiempo aproximado de 3 horas. La muestra luego se almacenó en un frasco de color ámbar a 4°C por 24 horas para ser liofilizada. Posteriormente con los liofilizados de cada una de las especies, se prepararon soluciones a concentraciones de 1000 µg/mL, 500 µg/mL y 100 µg/mL.

3.3.3.2 Preparación de Soluciones.

a) 2 mL. Solución α -Glucosidasa 0,24U/ml

La enzima 100 UI se disolvió en 1 mL de buffer fosfato pH 7. De esta disolución se utilizó 5 μ l de solución y se agregó a 1995 mL de buffer fosfato para obtener la concentración final. Se llevó a congelar a 4 °C.

b) 1 mL. Solución p-nitrofenil- α - D-glucopiranosido 5 mg/mL 0.1M

Se pesó 5 mg de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido y 1 mL de agua millipore. En un vial se mezcló por inversión suavemente hasta homogenizar y se llevó a refrigeración.

c) 1 mL. Solución Acarbosa 1000 μ g/mL

Se pesó 1 mg de Acarbosa, luego se adicionó 1 mL de agua millipore. Luego en un vial se mezcló por inversión y diluyó a las concentraciones de 500 μ g/ mL y 100 μ g/ mL. Luego se almacenó a 4°C.

d) 50 mL. Solución de Na_2CO_3 0,2 M

En una probeta 50 mL se mezcló 1.05 gr. del reactivo de Na_2CO_3 , luego se enrazó el total del volumen.

e) Solución Buffer fosfato 6,5 pH

En una fiola de 500 ml se pesó 7,8 gr de reactivo y se enraza el total de volumen con agua millipore autoclavada. Se adicionó HCl para ajustar el pH a 6,5.

f) Solución muestra 1000 µg/ mL

En un vial se pesó 1 mg de extracto liofilizado y se diluyó en 1 mL de agua millipore autoclavada, luego se diluyó a las concentraciones de 500 µg/ mL y 100 µg/ mL.

3.3.4 Ensayo *In Vitro*

Para el bioensayo se prepararon 4 tubos de ensayo de 100 x 10 mm previamente autoclavados, y rotulados la cuál tienen las siguientes soluciones (Anexo 1).

Se colocaron 600 µL de solución buffer fosfato helado a pH 6,5; luego se adicionó 50 µL de solución sustrato p-Nitrofenil α -D-glucopiranosido a 5 mg/mL, 100 µL de muestra a concentraciones de 1000 µg/mL, 500 µg/mL y 100 µg/mL; se incubó en baño maría a 37°C por 5 minutos. Posteriormente se adicionó 250 µL 0,24 UI/mL de la solución enzimática, luego se incubó nuevamente en baño maría por 15 minutos a 37°C, esta mezcla se agitó suavemente. Finalmente, se adicionó 1000 µL a 0,2 M de solución Na₂CO₃ y se homogeneizó.

Luego esta solución se llevó al espectrofotómetro para realizar la lectura a una absorbancia a 400 nm.

El blanco de los estándares de la solución hay ausencia de solución enzimática y el control positivo presenta acarbossa. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\left[1 - \left(\frac{B}{A}\right)\right] \times 100\%$$

Donde A es la absorbancia en ausencia de muestra y B es la absorbancia en presencia de la muestra.

Los valores del porcentaje de inhibición del α -Glucosidasa se utilizaron para calcular el IC₅₀ de los extractos. El valor de IC₅₀ corresponde a la cantidad de extracto utilizado para inhibir el 50% de la enzima α -glucosidasa.

3.4 Procesamiento y análisis de los datos

3.4.1 Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante el paquete estadístico SPSS v21 calculando frecuencias y porcentajes en tablas de contingencias. El análisis de relación y dependencia entre variables con un nivel de significancia $p < 0,05$. El IC₅₀ se determinó mediante la prueba estadística PROBIT.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Porcentaje de inhibición de las especies

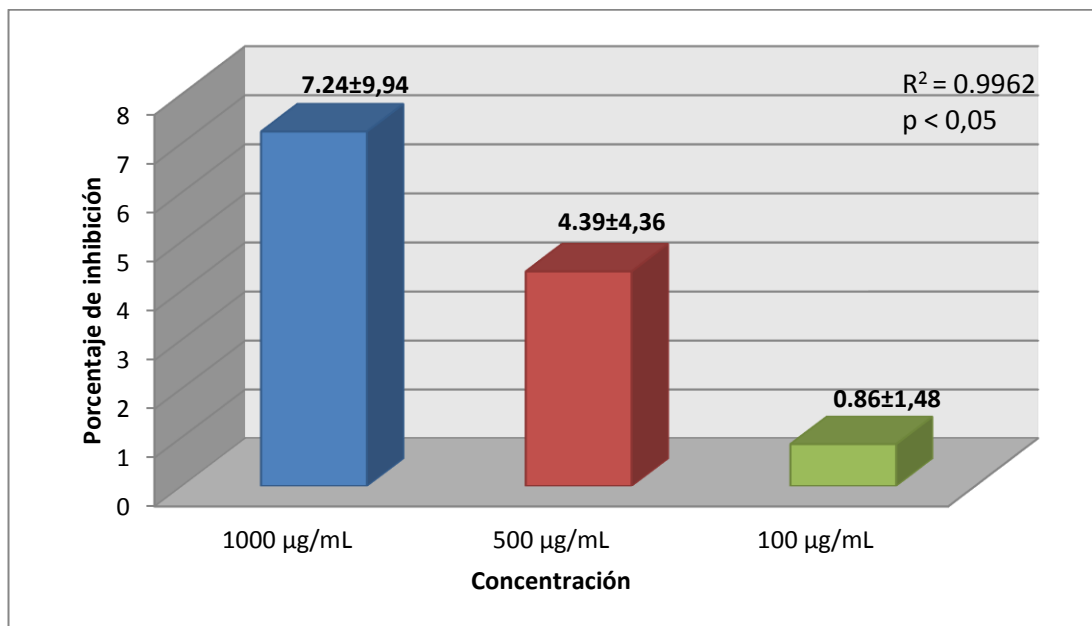


Figura 4. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Abuta grandifolia* “Abuta” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperглиcemiante de la especie *Abuta grandifolia* “Abuta” (Figura 4) fue en síntesis baja. Aunque, se observó que el mayor porcentaje de inhibición fue a la concentración de 1000 µg/mL (7.24 ± 9.94 $p < 0,05 = 0,334$), se observó así mismo una mínima actividad inhibitoria a la concentración de 500 µg/mL ($4.39 \pm 4,36$ $p < 0,05 = 0,224$) y 100 µg/mL ($0.86 \pm 1,48$ $p < 0,05 = 0,423$), los resultados se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado. Para la especie *Abuta grandifolia* se evidencia que a un $p < 0,05$ las diferencias no fueron significativas para las tres concentraciones.

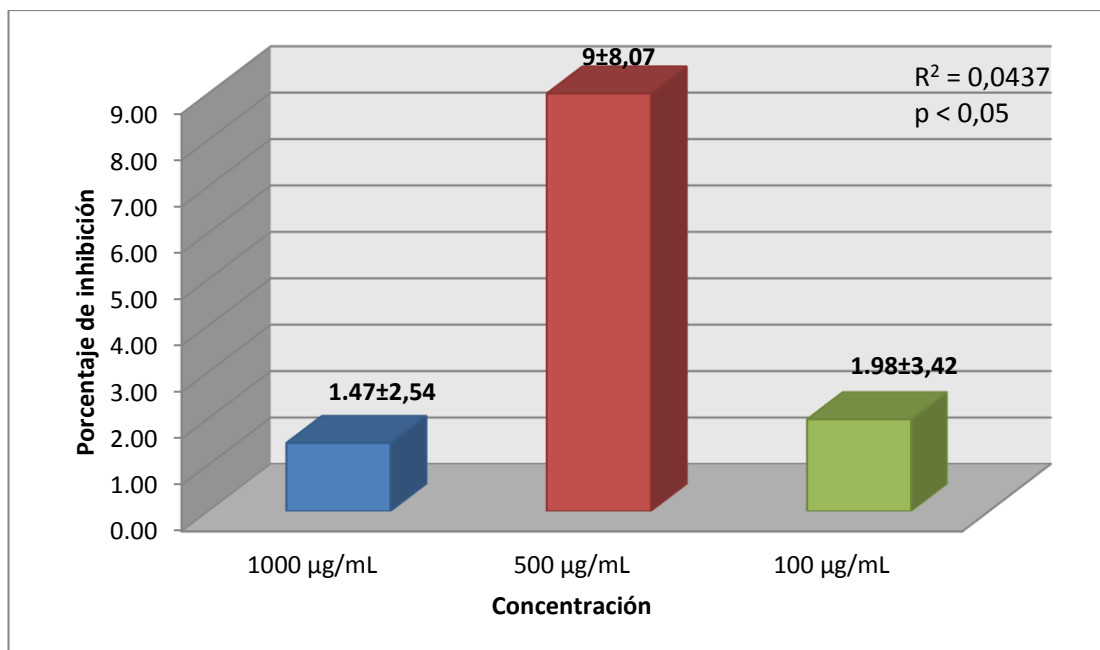


Figura 5. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Aspidosperma excelsum* “Remo caspi” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiante de la especie *Aspidosperma excelsum* “Remo caspi” (Figura 5) obtuvo valores por debajo del 10%, la mayor actividad fue a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ ($9 \pm 8,07$ $p < 0,05 = 0,193$), la actividad a 100 $\mu\text{g/mL}$ ($1.47 \pm 2,54$ $p < 0,05 = 0,423$) y 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($1.98 \pm 3,42$ $p < 0,05 = 0,423$) respectivamente, evidenciaron un menor porcentaje de inhibición. Los valores se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado. Para la especie *Abuta grandifolia* se evidencia que a un $p < 0,05$ las diferencias no fueron significativas para las tres concentraciones. En este ensayo los porcentajes de inhibición mostraron una tendencia logarítmica con un valor de R^2 igual a 0,0437; lo que indica una baja relación entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones.

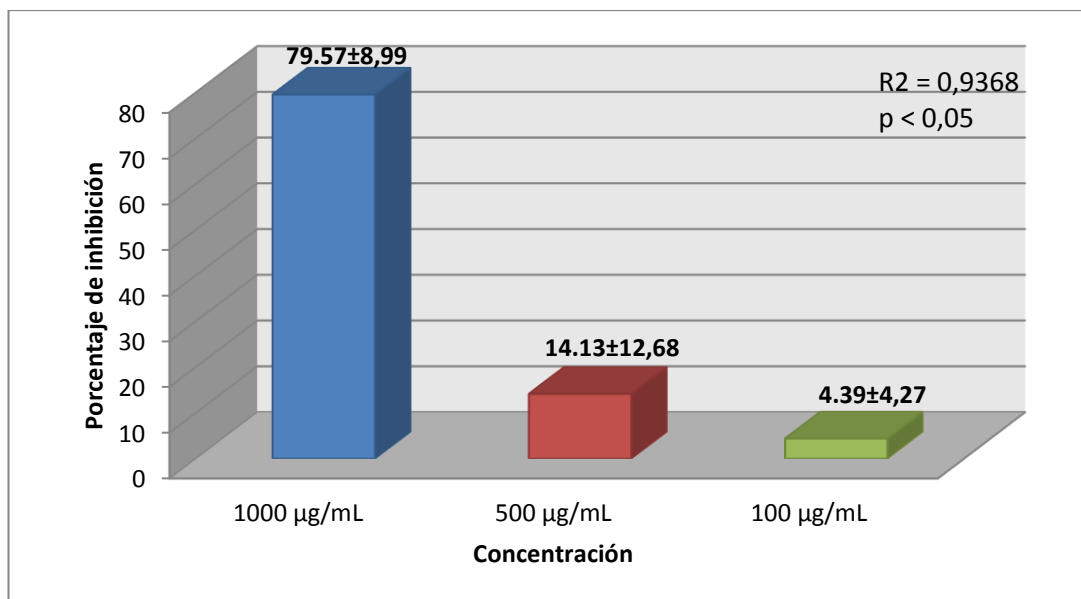


Figura 6. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Bahuinia glabra* “Pata de vaca” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiante de la especie *Bahuinia glabra* “Pata de vaca” (Figura 6) obtuvo una inhibición mayor al 50% a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($79 \pm 8,99$ $p < 0,05 = 0,004$), la actividad inhibitoria a 500 $\mu\text{g/mL}$ ($14.13 \pm 12,68$ $p < 0,05 = 0,193$) y 100 $\mu\text{g/mL}$ ($4.39 \pm 4,27$ $p < 0,05 = 0,217$) evidenciaron un menor porcentaje de inhibición respectivamente. En ese sentido la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ evidencia diferencia significativa. Así mismo en este ensayo los porcentajes de inhibición mostraron una tendencia logarítmica con un valor de R^2 igual a 0,9368; lo que indica una relativamente alta relación entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones. Los valores se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado

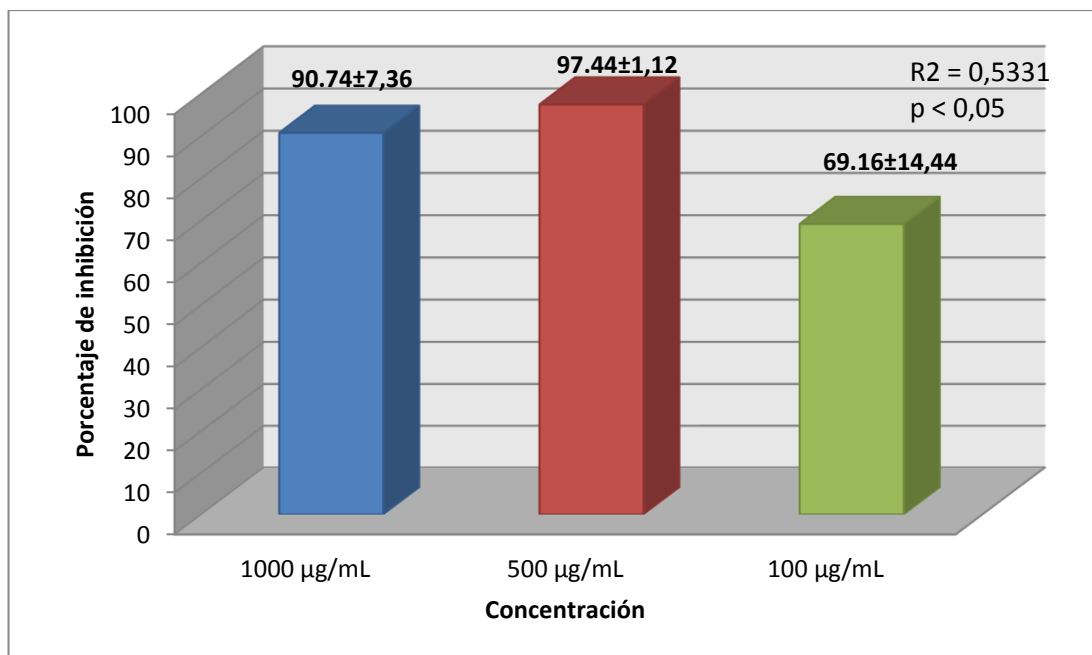


Figura 7. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Coussapoa asperifolia* “Renaco caspi” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiante de la especie *Coussapoa asperifolia* “Renaco caspi” (Figura 7) obtuvo una inhibición mayor al 50% para las tres concentraciones; se observó una inhibición elevada a 1000 µg/mL ($90.74 \pm 7,36$ $p < 0,05 = 0,002$), a 500 µg/mL ($97.44 \pm 1,12$ $p < 0,05 = 0,000$) y 100 µg/mL ($69.16 \pm 14,44$ $p < 0,05 = 0,014$). En ese sentido la concentración de 1000 µg/mL evidencia diferencia significativa alta. Así mismo en este ensayo los porcentajes de inhibición se ajustan a una tendencia lineal con un valor de R^2 igual a 0,5331; lo que indica una moderada relación entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones. Los valores se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado.

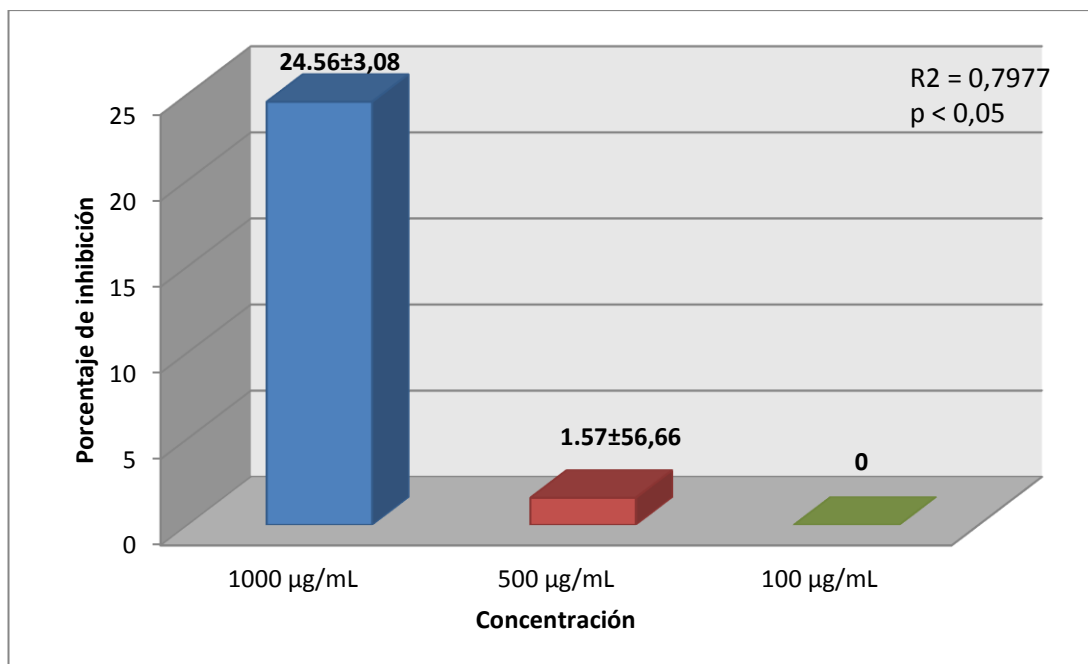


Figura 8. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Calycophyllum spruceanum* “Capirona” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiante de la especie *Calycophyllum spruceanum* “Capirona” (Figura 8) obtuvo una inhibición menor al 50% a la concentración de 1000 µg/mL ($24,56 \pm 3,08$ $p < 0,05 = 0,005$), Se observó una mínima inhibición a 500 µg/mL ($1.57 \pm 56,66$ $p < 0,05 = 0,401$) y no se observó inhibición alguna a 100 µg/mL. Así mismo la concentración de 1000 µg/mL evidencia una diferencia significativa moderada. Es así que, en este ensayo los porcentajes de inhibición se ajustan a una tendencia logarítmica con un valor de R^2 igual a 0,7977; lo que indica una relación moderada a baja entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones. Los valores se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado.

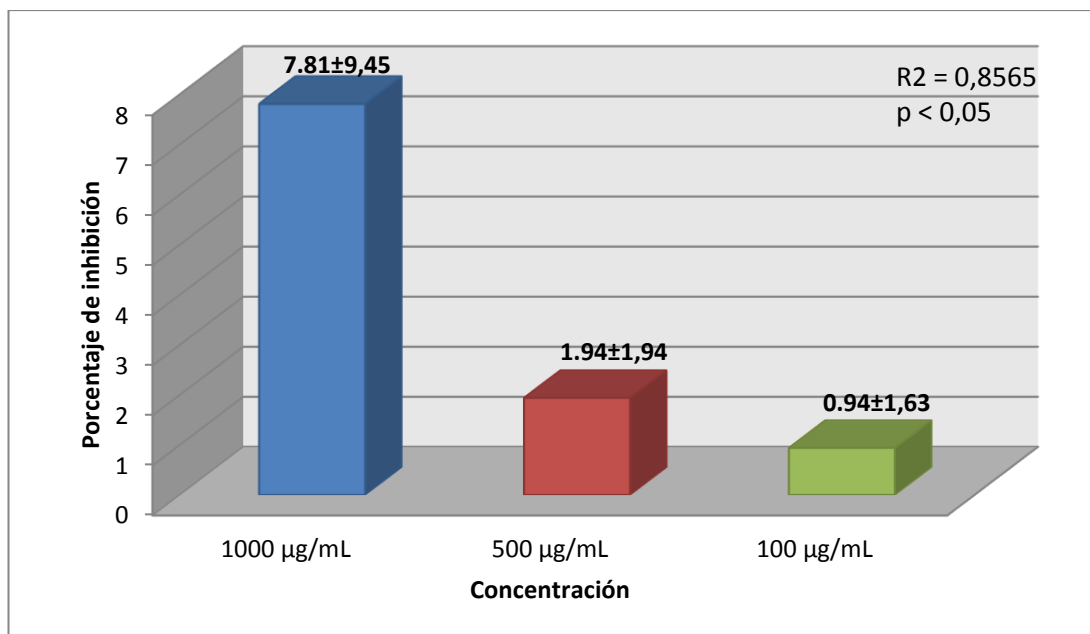


Figura 9. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Garcinia macrophylla* “Charichuelo grande” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiante de la especie *Garcinia macrophylla* “Charichuelo grande” (Figura 9) obtuvo una inhibición mínima para las tres concentraciones, siendo la mayor de 1000 µg/mL (7.81 ± 9.45 p < 0,05 = 0,289), Se observó una mínima inhibición a 500 µg/mL (1.94 ± 1.94 p < 0,05 = 0,218) y a 100 µg/mL (0.94 ± 1.63 p < 0,05 = 0,423). En este ensayo se observa que los porcentajes de inhibición se ajustan a una tendencia lineal con un valor de R² igual a 0,8565 lo que indica una relación alta entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones; así mismo los valores no presentan diferencia significativa, y se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado.

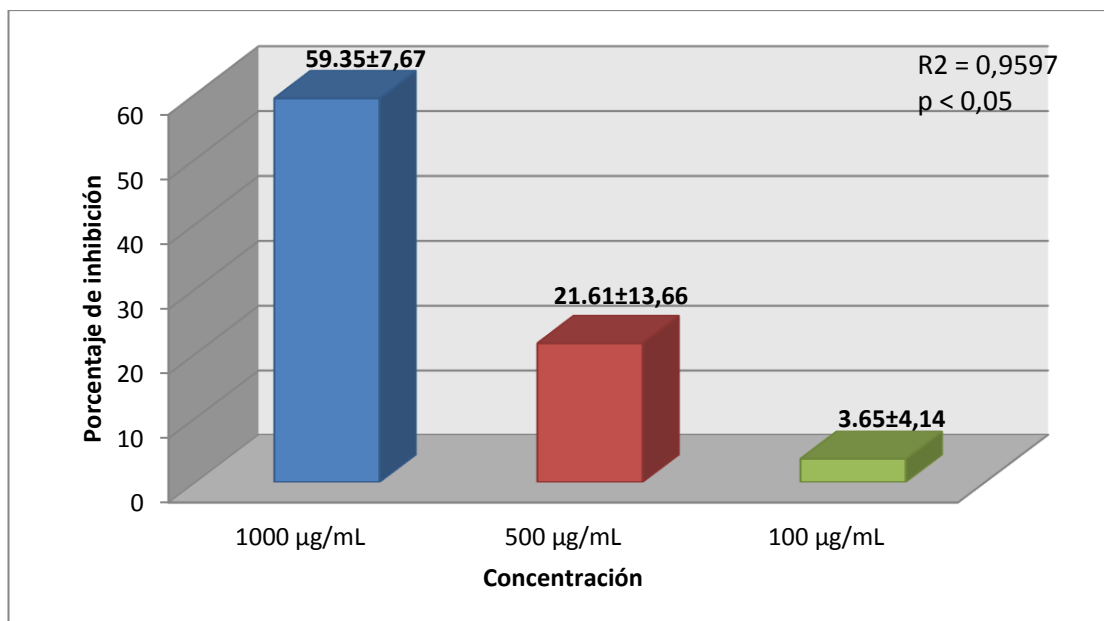


Figura 10. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Handroanthus obscurus* “Tahuari negro” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiantes de la especie *Handroanthus obscurus* “Tahuari negro” (Figura 10) obtuvo una inhibición por encima del 50% a la concentración de 1000 µg/mL (59.35 ± 7.67 p < 0,05 = 0,006), Se observó una inhibición media a 500 µg/mL (21.61 ± 13.66 p < 0,05 = 0,111) y a 100 µg/mL (3.65 ± 4.14 p < 0,05 = 0,267). En este ensayo se observa que los porcentajes de inhibición se ajustan a una tendencia lineal con un valor de R² igual a 0,9597 lo que indica una relación alta entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones; Para esta especie solo la concentración de 1000 µg/mL presenta diferencia significativa, y se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado.

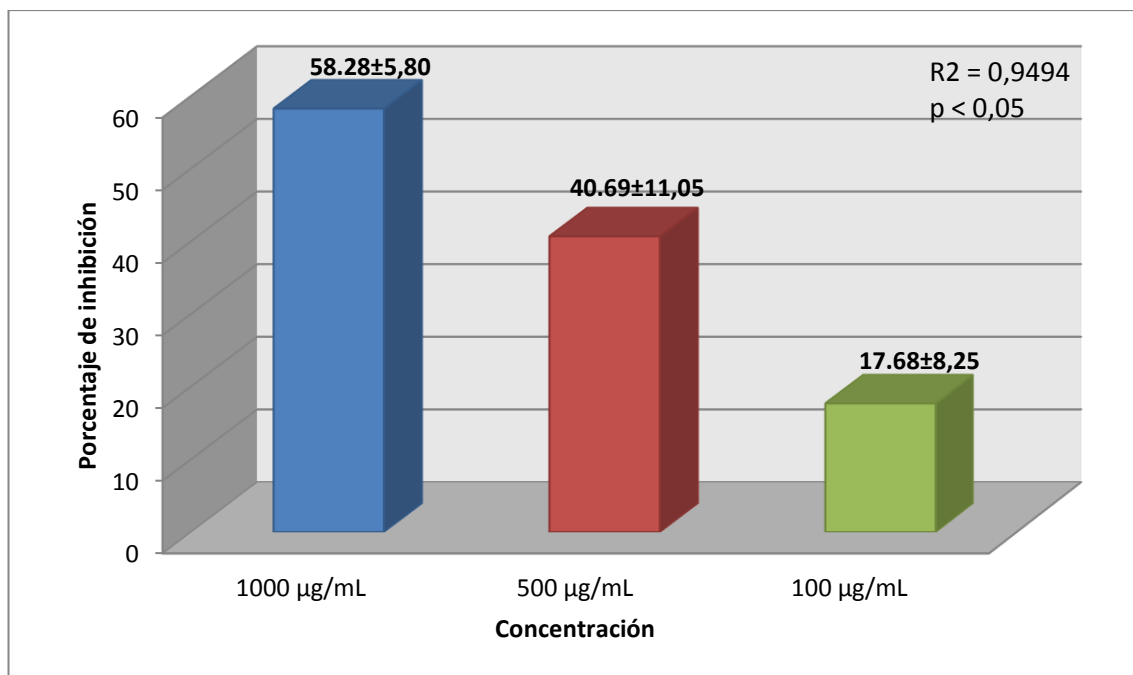


Figura 11. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Remijia pedunculata* “Chullachaqui caspi” frente a la enzima α -glucosidasa.

La actividad antihiperlicemiante de la especie *Remijia pedunculata* “Chullachaqui caspi” (Figura 11) obtuvo una inhibición por encima del 50% a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($58.28 \pm 5,80$ $p < 0,05 = 0,003$), Se observó también una inhibición alta a 500 $\mu\text{g/mL}$ ($40.69 \pm 11,05$ $p < 0,05 = 0,024$) y a 100 $\mu\text{g/mL}$ ($17.68 \pm 8,25$ $p < 0,05 = 0,066$). En este ensayo se observa que los porcentajes de inhibición se ajustan a una tendencia lineal con un valor de R^2 igual a 0,9494 lo que indica una relación alta entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones; Para esta especie las concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$ presentan diferencia significativa, y se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado.

4.2. Determinación del IC50

Tabla 1. Determinación del IC₅₀ de ocho extractos acuosos liofilizados de especies vegetales amazónicas.

Código	Familia	Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada	IC ₅₀
01GLC	Apocynaceae	Remo caspi	<i>Aspidosperma excelsum</i> Benth.	Corteza	1090611.56 µg/mL
02GLC	Bignoniaceae	Tahuari negro	<i>Handroanthus obscurus</i> (Bureau & K.Schum.) Mattos	Corteza	810.50 µg/mL
03GLC	Clusiaceae	Charichuelo grande	<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	Corteza	ND
04GLC	Fabaceae	Pata de vaca	<i>Bauhinia glabra</i> Jacq.	Hojas	613.20 µg/mL
05GLC	Menispermaceae	Abuta	<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith	Corteza	27295997.85 µg/mL
06GLC	Moraceae	Renaco caspi	<i>Coussapoa asperifolia</i> Trécul	Hojas	32.1 µg/mL
07GLC	Rubiaceae	Capirona	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.	Corteza	989.14 µg/mL
08GLC	Rubiaceae	Chullachaqui caspi	<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	Corteza	532.10 µg/mL

En la tabla 1 se observa el cálculo del IC₅₀ de los extractos acuosos liofilizados, en ella se muestran los valores necesarios para inhibir el 50% de la enzima α -glucosidasa en condiciones in vitro, Los valores por debajo de 1000 µg evidencia actividad antihiperlicemiante, en ese sentido la especie *Coussapoa asperifolia* “Renaco caspi” posee una alta actividad inhibitoria (32.1 µg/mL); Así mismo las especies *Remijia pedunculata* “Chullachaqui caspi” (532.10 µg/mL), *Bauhinia glabra* “Pata de vaca” (613.20 µg/mL), *Handroanthus obscurus* “Tahuari negro” (810.50 µg/mL) y *Calycophyllum spruceanum* “Capirona” (989.14 µg/mL) evidencian valores que se encuentran en el rango óptimo de actividad antihiperlicemiante. Las especies *Aspidosperma excelsum* “Remo caspi” y *Abuta grandifolia* “Abuta” presentaron valores elevados propios de una inhibición enzimática baja, mientras que la especie *Garcinia macrophylla* “Charichuelo grande” no se

pudo calcular su IC_{50} por presentar valores bajos de inhibición no significativos.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las enzimas glucosidasas localizadas en las microvellosidades de la superficie de la membrana intestinal son enzimas clave en la digestión de carbohidratos. La administración oral de inhibidores de glucosidasas en sistemas vivos retarda la digestión y absorción de carbohidratos y modulan así, la elevación de la glucosa postprandial en la sangre. En la Tabla 1 se muestra el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de ocho especies vegetales amazónicas sobre la enzima α -glucosidasa. Se utilizó acarbose® (SIGMA) como inhibidor de referencia, mostrando una inhibición del $82.88 \pm 3.84\%$, del mismo modo (21, 24, 26, 27) reportaron porcentajes de inhibición cercanos a nuestros resultados con respecto al control. Los extractos evaluados evidencian la capacidad de inhibir la actividad de esta enzima a concentraciones estandarizadas, siendo en su mayoría menos efectivos comparados con el fármaco de control. Los extractos acuosos de *Coussapoa asperifolia* “Renaco caspi” presentaron la mayor actividad inhibidora, mientras que los extractos de *Garcinia macrophylla* “Charichuelo grande” mostraron la menor actividad contra la enzima α -glucosidasa, La inhibición de esta enzima retarda la digestión de oligosacáridos y monosacáridos, disminuyendo la absorción de la glucosa y consecuentemente disminuyendo los niveles de glucosa postprandial.

En base al protocolo desarrollado por Cruz – Gallegos, J. (29), Se extrajeron los compuestos activos de ocho especies vegetales a 60°C mediante un proceso de liofilización para así cuantificar los volúmenes de las concentraciones de los extractos, en ese sentido Apostolidis, E. & Lee, C. (27)

postulan la efectividad de la extracción de compuestos activos de las plantas teniendo como parámetro a la temperatura y utilizando como solvente el agua; es así que en base al protocolo de inhibición enzimática del α -glucosidasa (24, 25); se ha evaluado la actividad inhibitoria in vitro de extractos acuosos liofilizados de ocho especies vegetales amazónicas a concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Los géneros *Bahuinia* y *Remijia* son un grupo de plantas catalogadas como de gran importancia en la medicina tradicional de los pueblos amazónicos (2, 13, 18), se les atribuyen propiedades antidiuréticas, acción sobre la absorción del colesterol y como antidiabética. Esta información es corroborada por los estudios de Santos, M. et al. (30) en la que hace referencia a plantas de estos géneros como grupos ampliamente utilizados en el tratamiento tradicional de la diabetes mellitus tipo II en Brasil. Así mismo existen evidencias de las propiedades farmacológicas semejantes entre especies dentro de un mismo género, esto producto de las concentraciones de sustancias activas propias de las plantas; así mismo éstas dependerán de las condiciones y factores externos como el clima, la edad de la planta, época de recolección, tipo de suelo, etc. Los resultados obtenidos en la presente investigación ratifican la información etnobotánica mediante los ensayos de la actividad antihiperlicemiantes de las especies *Bahuinia glabra* "Pata de vaca" y *Remijia pedunculata* "Chullachaqui caspi", obteniendo porcentajes de inhibición por encima del 50% y un IC_{50} de 613.20 $\mu\text{g/mL}$ y 532.10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Las evidencias experimentales muestran una gran similitud en cuanto a los resultados obtenidos entre la actividad enzimática de la especie *Coussapoa asperifolia* "Renaco caspi" en la que se obtuvo un porcentaje de inhibición

máximo de $97.44 \pm 1.12\%$ y un IC_{50} de $32.1 \mu\text{g/mL}$ frente al fármaco de control Acarbosa con un IC_{50} de $343.39 \mu\text{g/mL}$ y los resultados obtenidos por Espinoza, A. (31), quién evaluó la actividad antihiperглиcemiante en un modelo in vitro de la especie *Oreocallis grandiflora* "Cucharillo"; muestra que los resultados en cuanto a porcentajes de inhibición de la α -glucosidasa presentaron un máximo de $99.6 \pm 0.3\%$, y un IC_{50} de $3 \mu\text{g/mL}$, frente a $1316 \mu\text{g/mL}$ del Glucobay (Acarbosa comercial) a una concentración de $2000 \mu\text{g/mL}$ los extractos evaluados demuestran tener en teoría una gran actividad inhibitoria frente a la α -glucosidasa. Esto se debe a que en ambos ensayos las especies evaluadas presentaron una gran diferencia en cuanto a la inhibición de la enzima superando el IC_{50} ampliamente, estos resultados muestran que la especie estudiada, posee la capacidad de actuar como agente reductor donador de hidrógeno y electrones, dicho estudio corrobora la relación entre la diabetes y el estrés oxidativo, como consecuencia de la autoxidación de la glucosa, se da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno, radicales superóxido entre otras especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los resultados de inhibición de las especies evaluadas en la presente investigación presentan rangos amplios en los valores de IC_{50} , valores que van desde $32.1 \mu\text{g/mL}$ para la especie *Coussapoa asperifolia* "Renaco caspi" y $27295997.85 \mu\text{g/mL}$ para la especie *Abuta grandifolia* "Abuta"; ésta variación es causada por la posibilidad de que los compuestos químicos de las hojas y cortezas de las especies estudiadas presente un sinergismo para ejercer el efecto inhibitorio, las condiciones del medio de reacción y la

concentración del inhibidor. Sin embargo dichos resultados nos dan una idea de las especies potencialmente útiles para el control de la hiperglicemia ya que reducen la absorción de la glucosa, esto debido a la presencia de compuestos químicos que actúan como inhibidores competitivos de la α -glucosidasa en concordancia con estudios previos (6, 24, 26).

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen en un valioso aporte a los estudios farmacológicos de especies vegetales amazónicas, por la importancia y la necesidad de continuar con estudios que sirvan de modelo para la búsqueda de especies potenciales para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes mellitus tipo II, se espera que estos aportes, sumados a diversos estudios complementarios, a futuro mejoren la calidad de vida de las personas de nuestra región.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Se pudo estandarizar un método para la evaluación de extractos acuosos liofilizados de especies vegetales, para medir su actividad antihiperlicemiante mediante la inhibición de la α -glucosidasa por medio de espectrofotometría UV/VIS.
- La especie con un mayor porcentaje de inhibición fue *Coussapoa asperifolia* con $97.44 \pm 1,12\%$ a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y un IC_{50} de 32.1 $\mu\text{g/mL}$ frente al control positivo acarbossa con un porcentaje de inhibición máximo de 80% y un IC_{50} de 343.39 $\mu\text{g/mL}$.
- Mostrando una diferencia significativa alta ($p < 0,05$) y una tendencia lineal con un valor de R^2 igual a 0,5331.
- Las especies *Remijia pedunculata* (532.10 $\mu\text{g/mL}$), *Bahuinia glabra* (613.20 $\mu\text{g/mL}$) *Handroanthus obscurus* (810.50 $\mu\text{g/mL}$) y *Calycophyllum spruceanum* (989.14 $\mu\text{g/mL}$) reportaron valores que se encuentran dentro del rango óptimo de actividad antihiperlicemiante en un modelo in vitro.
- Las especies *Aspidosperma excelsum*, *Abuta grandifolia* y *Garcinia macrophylla* presentaron bajos valores de inhibición sin relación estadística significativa ($p > 0,05$).

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Integrar las diversas áreas de la investigación con el fin de generar equipos multidisciplinarios que generen una mejor perspectiva de los procesos adecuados para fortalecer la investigación biomédica en la región.
- Continuar con el estudio de especies vegetales amazónicas con antecedentes etnobotánicos, enfocados en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas para así mitigar los gastos económicos propios del tratamiento de estos trastornos metabólicos así como las reacciones adversas de los fármacos usados para su tratamiento.
- Evaluar los diversos componentes de las especies vegetales tales como frutos, tallos, raíces, etc. así como la efectividad de la extracción de los principios activos mediante solventes polares y apolares.
- Continuar el estudio de especies vegetales amazónicas con potencial antidiabético usando modelos in vivo, técnicas de fraccionamiento químico, modelos toxicológicos crónicos, farmacocinética, CG-MS e IR.

CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. **MORI, J & REÁTEGUI, R.** Evaluación florística y taxonómica en un bosque de arena blanca en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, Loreto-Perú. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. pág. 147.
2. **HUAMANTUPA, I., y otros, y otros.** *Riqueza, uso y origen de plantas medicinales.* s.l. : Revista Peruana de Biología, 2011. Vol. 18, 8, págs. 283-291.
3. **TANANTA, L.** *Análisis del conocimiento tradicional del uso de especies vegetales en tres comunidades de la cuenca baja del río Ucayali, Loreto-Perú.* s.l. : Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 2014. pág. 92.
4. **DIABETES, FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LA.** *6ta Atlas de la Diabetes.* s.l. : Editorial ISBN, 2013. Vol. 2, pág. 160.
5. **GNECCO, F.** **La diabetes en la Práctica. Bogotá, Colombia : Editorial Cromos, 1998. Vol. VIII, págs. 69-75.**
6. **BHUSHAM.** *An analytical review of plants for antidiabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action.* s.l. : International Journal of Pharmaceutical Sciences Research, 2010. Vol. Vol. 1, 1, págs. 29-46 págs.
7. **AVELLANEDA, I.** *Evaluación de la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa in vitro por extractos vegetales.* s.l., Colombia : Universidad Tecnológica de Pereira, 2013. pág. 126 pág.

8. **GÓMEZ, R.** Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, Mexico. s.l. : Revista Fitotécnica de México, 2012. Vol. 35, 1, págs. 43-49.
9. **SZYMANSKI, P., MARKOWICZ, M Y E., MIKICIUK-OLASIK.** *Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discover-Toxicological Screening Tests.* s.l. : International Journal of Molecular Science, 2012. Vol. 13, 1, págs. 427-452.
10. **CORRALES, I. y REYES, J. & PIÑA, R.** *Plantas medicinales de interés estomatológico.* s.l. : Órgano científico estudiantil de ciencias médicas de Cuba, 2014. Vol. 53, 256, págs. 79-98.
11. **GARCÍA, H., y otros, y otros.** *Revisión actual de los conocimientos sobre la absorción intestinal de carbohidratos y su relación con la prevención del riesgo cardiovascular.* s.l. : Journal Med Int Mex, 2011. Vol. 27, 3, págs. 270-280.
12. **BRACK, A.** *Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú.* Lima , Perú : s.n., 1999. Vol. 1, pág. 426.
13. **Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Programa de Investigación de Biodiversidad.** *Base de datos de plantas medicinales.* 2010. pág. 72.
14. **SOSA, A. y LINARES, V., RAMÍREZ, E. & BORBOR, F.** *Evaluación química del extracto etanólico de especies vegetales de uso odontológico en la comunidad de San Andrés-Punchana, Loreto.* s.l. : Universidad Peruana del Oriente, 2011. pág. 87.
15. **ARCE, W.** *Aislamiento e identificación estructural de los alcaloides de la corteza de la especie vegetal *Aspidosperma comporum**

- "Quillobordo" utilizado como antimalárico. Iquitos - Perú : Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 2014.
16. **VELASQUEZ, S. & POSADA, V.** *Actividad Anti-inflamatoria in vitro de los extractos y fracciones obtenidas de la corteza interna de *Tabebuia chrysantha* (JACQ.) G. Nicholson.* s.l. : Universidad tecnológica de Pereira, 2013. pág. 93.
 17. **LECCA, J. & ROJAS, J.** *Efecto Hipoglicemiante del extracto acuoso liofilizado de *Abuta rufescens* A., en ratas con diabetes mellitus tipo 2, inducidas con estreptozotocin.* IMET-ESSALUD, 2011. s.l. : Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 2011. pág. 137.
 18. **RODRÍGUEZ, C. & TUESTA, V.** *Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Abuta rufescens* y *Notholaena nivea* sobre la hiperglicemia inducida en ratas IMET-ESSALUD.* s.l. : Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 2010. pág. 144.
 19. **LLANA, L. & HUAMÁN E.** *Efecto hipoglicemiante y antihiperglicemiante del extracto hidroalcoholico de la corteza de *Abuta grandifolia* "Abuta" en *rattus rattus* con diabetes inducida.* s.l. : Universidad los Angeles de Chimbote, 2009. pág. 89.
 20. **SOARES, A., y otros.** *Diabetes, cancer e hipertensión: tratamiento auxiliar con plantas medicinales usadas por poblaciones en Mato Grasso.* s.l. : Semana da Enfermagem da Ajes, 2015. Vols. ISSN 2446 - 8401.

21. **KANG, W., SONG, Y. y GU, X.** *a-glucosidase inhibitory in vitro and antidiabetic activity in vivo of Osmanthus fragrans*. s.l. : Journal of Medicinal Plants Research, 2012. Vol. 6, 14, págs. 2850-2856.
22. **LIU, L. DESEO, M. A.** *Investigation of a-glucosidase inhibitor activity of heat bran and germ*. s.l. : Journal of Food Chemistry, 2011. Vol. 126, 2, págs. 533-561.
23. **LIU T., YIP, Y. M., SONG, L., FENG, S., LIU, Y., LAI, F., ZHANG, D. AND HUANG, D.** *Inhibiting enzymatic starch digestion by the phenolic compound diboside a: A mechanistic and in silico study*. s.l. : Food Research International, 2013. Vol. 54, 1, págs. 595-600.
24. **ARTANTI, N., FIRMANSYAH, T & DARMAWAM, A.** *Bioactivities Evaluation of Indonesian Mistletoes (Dendrophthoe pentandra (L.) Leaves Extracts*. s.l. : Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2012. Vol. 2, 1, págs. 24 - 27.
25. **SRIANTA, I., KUSUMAWATI, N., NUGERAHANI, I., ARTANTI, N. & XU, G.R.** *In vitro a-glucosidase inhibitory activity of Monascus-fermented durian seed extracts*. s.l. : International Food Research Journal, 2012. Vol. 20, 2, págs. 533-536.
26. **ELYA, B., Y OTROS.** *Sreening of a-glucosidase inhibitori activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae and Rubiaceae*. s.l. : Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012. Vol. ID 281078, pág. 6.
27. **APOSTOLIDIS, E. & LEE, C.** *In vitro potential of Ascophyllum nodosum phenolic antioxidant-mediated a-glucosidase and a-*

- amilase inhibition. s.l. : Journal of food science, 2010. Vol. Vol. 75, 3.
28. **NAIR, S. y KAVREKAR, V & MISHRA, A.** *In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts.* s.l. : European Journal of Experimental Biology, 2013. Vol. 3, 1, págs. 128-132.
29. **CRUZ-GALLEGOS, J.** Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (in vitro por difusión de glucosa) en extractos de Columbrina elíptica. Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2012. pág. 98 págs.
30. **SANTOS, M.; NUNES, M.; MARTINS, R.** Uso empírico de plantas medicinales para el tratamiento de diabetes. Revista Brasileira de Plantas Medicinales, 2012. 327 - 334 págs.
31. **ESPINOSA, A.** Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) Br., al sur del Ecuador. s.l. : Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2013. Vol. 12, 1, págs. 59-68.

ANEXOS

ANEXO 1. Cuadro que esquematiza el proceso de ensayo in vitro

	Tubo N° 01 Blanco sin enzima (A)	Tubo N° 02 Blanco con enzima (B)	Tubo N° 03 Muestra sin enzima (C)	Tubo N° 04 Muestra con enzima (D)
Control +/Muestra			100 µl	100 µl
Buffer fosfato pH 6,5	700 µl	700 µl	600 µl	600 µl
p-Nitrofenil α-D- glucopiranosido 0,1 M	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Pre incubación a 37°C por 5 min				
Buffer fosfato pH 6,5	250 µl		250 µl	
Enzima α - Glucosidasa 0,24U/ml		250 µl		250 µl
Incubación a 37°C por 15 min				
Na₂CO₃ 0,2 M	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Leer las absorbancias a 400 nm				