



Universidad del Azuay
Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *ILEX GUAYUSA* COMO
NUTRACÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 2**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniera en
Alimentos**

Autora:

Valeria Estefanía Fernández Romero

Directora:

María Elena Cazar Ramírez

Cuenca - Ecuador

2014

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedico de la manera más grata a mis Padres, hermanos, esposo, hijo, sobrinos, abuelos, amigos, y por supuesto y de manera especial a mi directora de tesis María Elena Cazar, quienes creyeron en mí, me apoyaron y me impulsaron a continuar con paciencia la realización de mi proyecto de graduación.

Valeria

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis Padres Rusbel y Noria por haberme dado la vida y por el sacrificio brindado para mi educación. A mi esposo Francisco y a mi hijo Francis por ser mi apoyo y pilar de vida. A mis hermanos, Christian, María Eugenia, Verónica, Ester y a mis sobrinos Keyla, Mathías, Joshua y Martín.

Agradezco la colaboración y el aporte a mi trabajo de tesis al Ing. Fausto Parra, Ing. Marcelo Calle, Dr. Piercosimo Tripaldi, Ing. Ximena Orellana, Diego Vidal, Andrés Moncayo, Nube Rivera, María Méndez y Diana Orellana.

De la misma manera, quiero agradecer a la Universidad del Azuay, a todos los demás profesores que aportaron con mi educación profesional y a todos mis compañeros: Adriana, Valeria, Mirian, Pepito, Diego, Maryori y Diana con quienes compartí mi vida estudiantil.

Finalmente, y de manera muy especial, agradezco a una gran persona, mi directora de tesis Ph. D María Elena Cazar porque fue quien estuvo siempre a mi lado y me abrió nuevas oportunidades a lo largo de la realización de mi trabajo de graduación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de contenidos.....	iv
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice Alfabético de Acrónimos.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. Generalidades de la Diabetes Mellitus (DM).....	4
1.1 Diabetes Mellitus (DM).....	4
1.2 Clasificación de la DM.....	5
1.2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.....	5
1.2.2 Diabetes Mellitus Tipo 2.....	5
1.2.3 Diabetes Gestacional.....	5
1.2.4 Otros tipo de diabetes.....	6
1.3 Frecuencia de la DM en Ecuador y en el mundo.....	6
1.4 Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).....	8
1.4.1 Definición de la DM2.....	8
1.4.2 Signos y síntomas de la DM2.....	9
1.4.3 Posibles causas de la DM2.....	10
1.4.4 Tratamiento y efectos secundarios de la DM2.....	10
1.4.5 Medidas generales para un correcto tratamiento de DM2.....	11
1.5 Inhibidores Enzimáticos.....	12
1.5.1 Definición.....	12
1.5.2 α -glucosidasa e inhibidores α -glucosidasa.....	12
1.5.3 β -glucosidasa e inhibidores de β -glucosidasa.....	13
1.6 Plantas hipoglicemiantes.....	13

1.7 Mecanismo de acción de plantas hipoglicemiantes.....	14
1.8 Metabolismos hipoglicemiantes.....	15
1.9 Descripción botánica de <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	16
1.9.1 Características.....	16

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2. Recolección de material vegetal.....	18
2.1 Ubicación geográfica del punto de recolección.....	18
2.2 Elaboración de extractos orgánicos.....	19
2.3 Fraccionamiento de extractos por técnicas cromatográficas.....	20
2.4 Aplicación de cromatografía en capa fina.....	22
2.5 Bioensayo de inhibición de las enzimas α y β glucosidasa.....	24
2.6 Bioensayo de Inhibición de α -glucosidasa (EC 3.2.1.20).....	24
2.6.1 Principio.....	24
2.6.2 Condiciones.....	24
2.6.3 Preparación de la muestra para el ensayo.....	24
2.6.4 Procedimiento.....	25
2.6.5 Cálculo de la actividad inhibitoria para los ensayos espectrofotométricos de α -glucosidasa.....	27
2.7 Bioensayo de Inhibición de β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).....	27
2.7.1 Principio.....	27
2.7.2 Condiciones.....	27
2.7.3 Preparación de la muestra.....	27
2.7.4 Procedimiento.....	27
2.7.5 Cálculo de la actividad inhibitoria de β -glucosidasa.....	28

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3. Rendimiento de los extractos.....	30
3.1 Patrones de separación cromatográfica y rendimiento de las fracciones.....	31
3.2 Ensayos de la actividad enzimática para α y β glucosidasa obtenidos de los extractos orgánicos.....	31
3.3 Ensayos de actividad enzimática con fracciones para β -glucosidasa...32	

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
CONCLUSIONES.....	35

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales causas de consulta médica de DM en Ecuador.....	6
Tabla 2. Mortalidad por tipo de diabetes en Ecuador.....	7
Tabla 3. Principales causas de consulta médica de DM en la ciudad de Cuenca.....	7
Tabla 4. Mortalidad por tipo de diabetes en la ciudad de Cuenca.....	8
Tabla 5. Criterios para el diagnóstico de DM2.....	9
Tabla 6. Características comparativas con las alternativas disponibles En Diabetes Mellitus 2.....	10
Tabla 7. Sustancias Naturales Hipoglicemiantes.....	15
Tabla 8. Esquema para la determinación de la capacidad inhibitoria de α -glucosidasa.....	26
Tabla 9. Esquema para la determinación de la capacidad inhibitoria de β -glucosidasa.....	29
Tabla 10. Porcentajes de rendimiento obtenidos en la elaboración de los extractos orgánicos con los diferentes solventes.....	30
Tabla 11. Rendimiento de las fracciones obtenidas con cada extracto.....	31
Tabla 12. Resultados del ensayo de Inhibición de α y β glucosidasas.....	32
Tabla 13. Porcentaje de inhibición enzimática de β -glucosidasa para las fracciones bioactivas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	16
Figura 2. Cantón Sucúa, Morona Santiago.....	18
Figura 3. Elaboración de extractos orgánicos de <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	19
Figura 4. CCF para prueba de mezcla de los solventes HX : AcOEt en una concentración 70:30.....	20
Figura 5. Identificación y numeración de las fracciones obtenidas a partir del extracto Hexano:Guayusa.....	21
Figura 6. Identificación y numeración de las fracciones obtenidas a partir del extracto Acetato de Etilo:Guayusa.....	21
Figura 7. Identificación y numeración de las fracciones obtenidas a partir del extracto Etanol:Guayusa.....	22
Figura 8. Fraccionamiento del extracto guayusa-Acetato de Etilo por cromatografía en capa fina.....	23
Figura 9. Recolección y filtrado de las fracciones bioactivas.....	23
Figura 10. Preparación del inhibidor en una concentración de 500mg/ml a partir de la solución madre para Bioensayo de inhibición de α -glucosidasa.....	25
Figura 11. Espectrofotómetro utilizado en los ensayos de inhibición enzimática de las enzimas α y β - glucosidasa.....	26
Figura 12. Ensayo de Inhibición de β - glucosidasa en fracciones bioactivas de Hexano y Alcohol.....	28

ÍNDICE ALFABÉTICO DE ACRÓNIMOS

Ab	Absorbancia
AcOEt	Acetato de Etilo
α	Alfa
EC 3.2.1.20	α -glucosidasa
β	Beta
E.C. 3.2.1.21	β -glucosidasa
Na₂CO₃	Carbonato de Sodio
CCF	Cromatografía en capa fina
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EtOH	Etanol
g	Gramos
°C	Grados Centígrados
HX	Hexano
TRIS	Hidroximetil amino metano
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
l	Litro
λ	Longitud de onda
μl	Microlitros
ml	Mililitros
mmol	Milimol
mg	Miligramos
min	Minutos

nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PNP-G	p-nitrofenil- α -D-glucósido
\bar{X}	Promedio
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Solución buffer de Fosfato de Potasio
SDS	Sodio Dodecil Sulfato

Handwritten signature and date: 09/01/14

**"EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE ILEX GUAYUSA COMO
NUTRACÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 2."**

RESUMEN

Las cifras alarmantes de personas con Diabetes Mellitus a nivel mundial y la tendencia de consumo de productos naturales endémicos han provocado la búsqueda e investigación exhaustiva de especies vegetales que contrarresten los efectos de esta enfermedad. En el presente trabajo se investigó el potencial de *Ilex guayusa* Loes como fuente de sustancias inhibidoras de las enzimas α y β glucosidasas, involucradas en el mecanismo de desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2. Para cumplir este objetivo se prepararon extractos orgánicos de la planta en estudio, la cual fue recolectada en zonas aledañas al cantón Sucúa perteneciente a la Provincia de Morona Santiago. Los extractos orgánicos fueron fraccionados mediante estrategias cromatográficas. La actividad biológica de las fracciones obtenidas fue probada mediante un ensayo de inhibición enzimática "in vitro". Los resultados obtenidos permiten valorar a los componentes de *Ilex guayusa* como sustancias nutraceuticas que aportarán en la dieta de pacientes diabéticos.

Palabras clave: α -glucosidasa, β -glucosidasa, *Ilex guayusa*, Diabetes Mellitus tipo 2, Inhibición enzimática.

Handwritten signature of Ing. Fausto Tobías Parra Parra

ING. FAUSTO TOBIÁS PARRA PARRA
Director de Escuela

Handwritten signature of Dra. María Elena Cazar Ramirez

DRA. MARÍA ELENA CAZAR RAMIREZ
Directora del Trabajo de Grado

Handwritten signature of Valeria Estefanía Fernández Romero

VALERIA ESTEFANÍA FERNÁNDEZ ROMERO
Autora del Trabajo de Grado

Handwritten signature
13/01/14

ABSTRACT

“EVALUATION OF ILEX GUAYUSA ORGANIC EXTRACTS AS NUTRACEUTICS IN THE TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES”

The alarming numbers of people worldwide with diabetes mellitus and the global trend for consumption of endemic natural products have led the search and exhaustive investigation of plants in order to counteract the effects of this disease. This work is about the investigation of *Ilex guayusa* Loes potential as a source of inhibitors substance of α - and β glucosidase enzymes involved in the development mechanism of type 2 diabetes mellitus. To meet this objective extracts of the organic plant under study were prepared. This plant was collected in areas adjacent to *Sucua* Canton, Province of *Morona Santiago*. The organic extracts were fractionated by means of chromatography strategies. The biological activity of the obtained fractions was tested by an "in vitro" enzyme inhibition analysis. The results obtained allow assessing the components of *Ilex guayusa* as nutraceuticals substances to contribute to diabetic patients' diet.

Keywords: α -Glucosidase, β -Glucosidase, *Ilex Guayusa*, Type 2 Diabetes Mellitus, Enzyme Inhibition

Ing. Fausto Tobías Parra Parra
School Director

Dra. María Elena Cazar Ramirez
Thesis Director

Valeria Estefanía Fernández Romero
Author



Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Fernández Romero Valeria Estefanía

Trabajo de Graduación

Cazar María Elena

Enero de 2014

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE ILEX GUAYUSA COMO NUTRACÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 2.

INTRODUCCIÓN

Son alarmantes las cifras de personas con diabetes y, desgraciadamente, Ecuador no es la excepción. La Federación Ecuatoriana de Diabetes, reporta que por cada familia ecuatoriana existe por lo menos una persona con diabetes y que el 90% de ellas sufren diabetes tipo 2 (Carrillo, 2011). La diabetes tipo 2 está cerca de ser una epidemia, se la relaciona con la edad y está ligada a ciertos factores de obesidad en las personas. La causa de la diabetes es un misterio, aunque los factores genéticos y ambientales, tales como: obesidad y falta de ejercicio parecen jugar un papel importante. Estudios revelan que la población diabética mundial aumentaría a 366 millones para el 2030 (Wild et al., 2004). La diabetes es un padecimiento conocido desde hace siglos; sin embargo, a fin del milenio el conocimiento de su etiología, historia natural y epidemiología es aún incompleto (Moreno, 2001).

El tratamiento farmacológico de este síndrome metabólico es de por vida, y pretende controlar las manifestaciones clínicas y prevenir complicaciones. Desafortunadamente, para muchos pacientes este objetivo no se logra y además, los fármacos utilizados son costosos y presentan efectos adversos importantes (Santos et al., 2009). Posiblemente sea por esto que las personas que padecen diabetes tipo 2 recurran cada vez más a la medicina natural, utilizando

diversas plantas y frutos como tratamiento alternativo o combinado con fármacos. Los mecanismos de actividad hipoglicemiante de algunas plantas están siendo estudiadas. Recientemente, se han publicado varios estudios de la química de las plantas medicinales con potencial antidiabético (Jung et al., 2006). Además, reviste de interés científico la búsqueda de inhibidores de enzimas involucradas en el mecanismo de la diabetes tipo 2 como α y β -glucosidasa provenientes de fuentes naturales (Andrade-Cetto et al., 2008).

Actualmente, los metabolitos secundarios de las plantas medicinales son estudiados para determinar su potencial antidiabético (Jung et al., 2006). A nivel mundial, 10.000 plantas medicinales son utilizadas en fitoterapia (Cañigüeral et al., 2003). Afortunadamente, Ecuador es un país megadiverso; posee alrededor de 15901 especies vegetales, de las cuales, cerca de 4173 son endémicas (De la Torre et al., 2008) e incluyen a la especie vegetal del presente estudio, *Ilex guayusa*.

El conocimiento fitoquímico de la guayusa es limitado y la literatura científica es escasa, razón por la cual es necesaria una profunda investigación científica con el fin de evaluar su actividad biológica y posteriormente, sus posibles usos comerciales (Radice & Vidari, 2010). La propuesta de la presente investigación se orienta a la evaluación de extractos orgánicos de *Ilex guayusa* como nutraceuticos en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y servirá como base para la mejora de investigaciones orientadas al desarrollo de productos dirigidos a solucionar la problemática nutricional de pacientes diabéticos.

Por otra parte, las personas con diabetes, son un segmento de la población muy amplio; sin embargo existen muy pocas alternativas para su alimentación. En cuanto a aditivos alimentarios se han utilizado edulcorantes que no aportan más que con el dulzor a los alimentos. El estudio acerca de la capacidad antidiabética de la guayusa, podrá dar paso a una de las tendencias actuales de producción de alimentos, los nutraceuticos. Los alimentos nutraceuticos además

del valor nutritivo, aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano.

El uso correcto de los recursos naturales que presenta nuestra amplia biodiversidad en la Amazonía ecuatoriana, beneficiará a quienes aprovechen las bondades y fines terapéuticos de la guayusa, y además aportará positivamente a las comunidades en donde se produce dicha planta, aumentando los ingresos económicos de las comunidades más pobres.

Recientemente se dispone de referencias en el país en las que se informa de la actividad de extractos aislados en cuanto a su capacidad de inhibir alfa glucosidasa y alfa amilasa; sin embargo aún no han sido estudiadas las sustancias bioactivas que participan como inhibidores de estas enzimas. Por ello, existe la necesidad de aplicar la metodología de aislamiento bioguiado que ha demostrado, en estudios previos, ser eficaz para reconocer moléculas de fuentes naturales con capacidad para inhibir enzimas *in vitro* para validar el uso de plantas medicinales, con el fin de conocer el potencial de las plantas ecuatorianas como fuentes de sustancias bioactivas (Ferro y Degen de Arrúa, 2011).

En el marco del citado proyecto se recolectaron las hojas de *Illlex guayusa* especie reconocida popularmente como medicinal en la zona de Sucúa y se prepararon extractos utilizando solventes de polaridad alta (Etanol), media (Acetato de Etilo) y baja (Hexano) para someterlos a tamizado de actividad biológica frente a diversos sistemas *in vitro*.

Finalmente, el presente estudio se plantea como base para la mejora de investigaciones orientadas al desarrollo de productos dirigidos a solucionar la problemática nutricional de pacientes diabéticos.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Introducción.

En el presente capítulo se muestra información referente a la Diabetes Mellitus, sus características, la situación actual del país frente a esta enfermedad, los síntomas, posibles causas, y su tratamiento. De la misma manera, se hace énfasis al desarrollo de información referente a la Diabetes Mellitus tipo 2 que es el objeto del presente estudio. Se detalla información con respecto a las plantas hipoglicémicas y su mecanismo de acción. Finalmente, se hace una descripción botánica de *Ilex guayusa* la especie vegetal involucrada en esta investigación.

1. Generalidades de la Diabetes Mellitus (DM).

1.1 Diabetes Mellitus (DM).

La DM es una enfermedad caracterizada por la hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o la acción de la insulina (Salud, 2000). La hiperglucemia crónica está asociada con ciertos efectos a largo plazo, disfunción y fallos de diferentes órganos especialmente: los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (ADA, 2012).

La frecuencia de DM ha aumentado dramáticamente en los últimos 40 años. La OMS y el Banco Mundial consideran a la diabetes como problema de salud pública (Moreno, 2001).

1.2 Clasificación de la DM.

En la actualidad se sabe que existen dos categorías para su clasificación; etiología y tolerancia a la glucosa (Altamirano, 2001). La asignación de un tipo de diabetes a nivel individual, a menudo depende de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico, y muchos individuos diabéticos no encajan fácilmente en una sola clase, es por ello que se ha clasificado a la diabetes de la siguiente manera:

- 1.2.1 **Diabetes Mellitus Tipo 1:** Representa del 5-10% del total de personas con diabetes. Es conocida como inmunológica mediadora y resulta de la destrucción autoinmune celular influida por las células- β del páncreas (se conoce que existe destrucción de células- β , por lo general conduce a la deficiencia absoluta de insulina) (ADA, 2012).
- 1.2.2 **Diabetes Mellitus Tipo 2:** Este tipo de diabetes representa aproximadamente del 90-95% del total de pacientes con diabetes (Carrillo, 2012). Se refiere a pacientes no-insulinodependientes o es conocida como diabetes del adulto. Las personas que la padecen no necesitan de insulina para su tratamiento. Se conoce que tampoco existe una destrucción de las células- β del páncreas (ADA, 2012).
- 1.2.3 **Diabetes gestacional:** La diabetes gestacional es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo (Almidrón et al., 2005). No se denomina diabetes gestacional cuando las mujeres ya tienen diabetes (tipo 1 o tipo 2) y posteriormente quedan embarazadas, este otro tipo se denomina pregestacional, ocurre cuando antes del embarazo ya tenía diabetes (Triviño, 2010). Estudios demuestran que este tipo de diabetes afecta del 2-5% de mujeres (Carrillo, 2012).
- 1.2.4 **Otros tipos de diabetes:** pancreatitis, hipertiroidismo, rubeola, citomegalovirus o Inducida por productos químicos (Carrillo, 2012).

1.3 Frecuencia de la DM en Ecuador y en el mundo.

Entre 1995 y 2025 se ha estimado un incremento de 35% en la prevalencia de esta enfermedad; además, predomina el sexo femenino y es más frecuente en el grupo de edad de 45 a 64 años. La prevalencia es mayor en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo y así continuará; sin embargo, el incremento proporcional será mayor en países en vías de desarrollo (Altamirano, 2001).

La DM afecta a personas de todas las edades, en Ecuador, según estadísticas del INEN se reflejan resultados, en cuanto a causas de consulta médica de un 44% de pacientes con DM tipo 2, siendo la segunda causa de consulta médica de DM en país (Tabla 1).

Tabla 1. Principales causas de consulta médica de Diabetes Mellitus en Ecuador.

Causas	Condición de edad					
	DÍAS (1 A 29 DÍAS)	MESES (1 A 11 MESES)	AÑOS (1 A 99 AÑOS)	IGNORADO	TOTAL	%
E10-DM INSULINODEPENDIENTE	-	5	1297	-	1302	7%
E11- DM NO INSULINODEPENDIENTE	1	3	7680	4	7688	44%
E12- DM ASOCIADA CON DESNUTRICIÓN	-	-	24	-	24	0%
E13- OTRAS DM ESPECIFICADAS	-	-	114	-	114	1%
E14- DIABETES MELLITUS, NO ESPECIFICADA	1	6	8089	14	8110	46%
O24- DM EN EL EMBARAZO	-	-	276	-	276	2%
TOTALES	2	14	17480	18	17480	100%

Fuente: CEPAL/CELADE 2003-2007

En cuanto a casos de muerte por diabetes, se reporta casi un 45% de pacientes fallecidos por DM tipo 2. La mayoría de casos se presentan en pacientes entre 65 y más años de edad como se revela en la Tabla 2.

Tabla 2. Mortalidad por tipo de Diabetes Mellitus en Ecuador.

Causas	Grupos de edad del fallecido					
	De 1 a 14	De 15 a 64	De 65 años y más	Ignorado	Total	%
E10-DM INSULINODEPENDIENTE	-	44	58	-	102	2,54%
E11- DM NO INSULINODEPENDIENTE	1	643	1142	3	1789	44,49%
E12- DM ASOCIADA CON DESNUTRICIÓN	-	1	1	-	2	0,05%
E13- OTRAS DM ESPECIFICADAS	-	1	-	-	1	0,02%
E14- DIABETES MELLITUS, NO ESPECIFICADA	2	691	1427	3	2123	52,80%
E15- COMA HIPOGLICÉMICO NO DIABÉTICO	-	-	1	-	1	0,02%
O24- DM EN EL EMBARAZO	-	3	-	-	3	0,07%
TOTALES	3	1383	2629	6	4021	100%

Fuente: CEPAL/CELADE 2003-2007

Por otra parte, en el cantón Cuenca se reportan datos en donde el tipo de diabetes que predomina en las consultas precisamente, el de la DM2. Los adultos mayores los que encabezan el mayor índice de enfermos (Tabla 3).

Tabla 3. Principales causas de consulta médica de DM en la ciudad de Cuenca.

Causas	Grupos de edad del paciente						
	1 a 14	15 a 34	35 a 64	65 y más años	Ignorado	Total	%
E10-DM INSULINODEPENDIENTE	2	7	4	9	-	22	2,5%
E11- DM NO INSULINODEPENDIENTE	8	33	277	368	-	686	77,4%
E12- DM ASOCIADA CON DESNUTRICIÓN	-	-	1	1	-	2	0,2%
E14- DM, NO ESPECIFICADA	5	7	62	95	-	169	19,1%
E15- COMA HIPOGLICÉMICO NO DIABÉTICO	-	-	1	1	-	2	0,2%
O24- DM EN EL EMBARAZO	-	5	-	-	-	5	0,6%
TOTALES	15	52	345	474	-	886	100%

Fuente: CEPAL/CELADE, 2003-2007

El índice de mortalidad por DM2 en la ciudad de Cuenca es el más alto con respecto a otros tipo de diabetes. Sigue prevaleciendo los adultos mayores con el mayor número de casos. Los datos al respecto se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Mortalidad por tipo de Diabetes Mellitus en la ciudad de Cuenca.

Causas	Grupos de edad del fallecido						
	De 1 a 14	De 15 a 49	De 50 a 64	De 65 y más años	Ignorado	Total	%
E11- DM NO INSULINODEPENDIENTE	-	4	8	48	-	60	61%
E14- DM, NO ESPECIFICADA	-	1	5	33	-	39	39%
TOTALES		5	13	81		99	100%

Fuente: CEPAL/CELADE 2003-2007.

1.4 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).

1.4.1 Definición de la DM2.

La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina y un deterioro progresivo de la función beta pancreática (Sánchez, 2008). La DM2 es una enfermedad en la cual la persona no fabrica suficiente insulina o no la utiliza de forma correcta (Banderas, 2006). La insulina es una hormona fabricada por el páncreas que ayuda a transportar la glucosa desde la sangre hacia el interior de las células corporales para ser transformado en energía. La presencia de DM2, hace que la glucosa se acumule en la sangre y las células del cuerpo no reciban la energía que necesitan (Kestel, 2005).

Los pacientes con DM2, presentan aún células β pancreáticas funcionales, sin embargo, la insulina secretada es insuficiente para compensar los niveles de glucosa sanguínea después de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos o grasas. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes se incrementa con la edad, la obesidad y la ausencia de actividad física (Expert Committee, 2003). La obesidad debida a la acumulación excesiva especialmente de tejido adiposo incrementa

el riesgo de varios desordenes metabólicos que incluyen: inflamación crónica, resistencia a la insulina, hipertensión, entre otras (Kiec et al., 2012). La DM2 implica, por lo tanto, alteraciones en la secreción de insulina y en la resistencia a la acción de esta hormona (Banderas, 2006).

1.4.2 Signos y síntomas de la DM2.

La DM2 presenta síntomas característicos tales como: sed intensa (polidipsia), micción frecuente y abundante (poliuria), pérdida de peso, algunas veces con gran apetito (polifagia), visión borrosa, náuseas, vómito, debilidad o cansancio excesivo, altas concentraciones de glucosa en sangre y en orina, incremento en la susceptibilidad a enfermedades e infecciones, tales como vaginitis, irritabilidad, apatía, impotencia (en hombres) y cetoacidosis (condición en la cual se acumulan cetonas en el torrente sanguíneo), como consecuencia de la utilización de ácidos grasos en lugar de glucosa, que resulta en el incremento de acidez en la sangre. La susceptibilidad a ciertas infecciones puede también acompañar a la hiperglucemia crónica (Banderas, 2006).

Recientemente, el Comité de Expertos para el diagnóstico y clasificación de la DM ha establecido una exhaustiva clasificación etiológica de la DM (Tabla 5)

Tabla 5. Criterios para el diagnóstico de DM2.

1. Síntomas de diabetes (poliuria o pérdida inexplicada de peso) junto con glucemia igual o superior a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) en cualquier momento del día, o bien,
2. Glucemia basal igual o superior a 126 mg/dl (7.0 mmol/l), o bien,
3. Glucemia igual o superior a 200mg/dl (11.1 mmol/l) a las dos horas durante la realización de un test de tolerancia oral a la glucosa (Curva de glucemia con 75g de glucosa).

Fuente: Luján, Estela, Hernández, Romero, & Barraza, 2009.

1.4.3 Posibles causas de la DM2.

En la DM2 existe un aumento del estrés oxidativo y una disminución de los sistemas de defensa antioxidante, que se han implicado en la etiopatogenia de la enfermedad y en la aparición de complicaciones crónicas (Cuerda et al., 2011).

Muchas personas con este tipo de diabetes presentan obesidad y esto provoca un cierto grado de resistencia a la insulina. Por otro lado, las personas que no presentan obesidad puede tener un porcentaje mayor de grasa corporal distribuido predominantemente en la región abdominal (ADA, 2012).

1.4.4 Tratamiento y efectos secundarios de la DM2.

Tabla 6. Características comparativas con las alternativas disponibles en DM2.

Medicamento	Mecanismo	%HbA1c	Ventajas	Desventajas
Metformina	↓ gluconeogénesis ↑ sensibilidad tisular	1-2	Peso neutral Mejora pronóstico Cardiovascular	Efecto gastrointestinal contraindicado en IR.
Sulfonilureas	↑ secreción insulina	1-2	Efecto rápido Experiencia	↑ Peso, hipoglucémico
Tiazolidíndionas	↑ sensibilidad tisular ↓ gluconeogénesis	0.5-1.4	Mejora perfil lipídico (piogitazona)	Retención de líquido ↑ Peso, IC. IM (Rosiglit) Fracturas.
Inhibidores de α -glucosidasa	↓ absorción de azúcares	0.5-0.8	Peso neutral	↑ Efecto gastrointestinal 3 tomas /día.
Meglitinidas	↑ secreción insulina (acción corta)	0.5-1.5	Efecto rápido	↑ peso, hipoglucemia, 3 tomas/día
Exenatida	Efecto "incretina" glucosa depend.: ↑ Secreción insulina	0.5-1	↓ Peso	Inyectable. ↑ Efecto gastrointestinal
Inhibidores DPP-4	Efecto Incretina	0.5-0.8	Peso natural	Seguridad largo plazo no establecida
Insulinas	Hormona	1.5-3.5	No limitación de dosis.	Inyectable. ↑ peso, hipoglucémico,

Fuente: Modificado del autor, (Nathan et al., 2009)

El tratamiento de la DM2 comprende estrategias nutricionales como la pérdida de peso, adecuación de fármacos a los hábitos dietéticos y ejercicio físico (Salud, 2000). Con frecuencia dicho tratamiento se realiza con base en el uso de agentes hipoglicemiantes orales del tipo de las sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de enzimáticos (α - glucosidasa, β -glucosidasa) (Banderas, 2006). Sin embargo, el control de la DM también se realiza a través del uso de plantas medicinales, algunas han sido evaluadas experimental y clínicamente; demostrándose que varios extractos y fracciones presentan actividad hipoglicemiante (Luján et al., 2009). En la tabla 6 se presentan algunos tipos de medicamentos empleados en el tratamiento de DM2, además se presentan las ventajas y desventajas de su empleo como fármaco.

Los efectos secundarios gastrointestinales observados en los pacientes con DM2, dependiendo de la dosis, son: dolor abdominal, anorexia, diarrea, edema generalizado (retención de líquidos). Estos efectos secundarios regularmente se atenúan con el uso continuo a dosis pequeñas (250-500 mg/día), dicha dosis debe de incrementarse muy lentamente. Cuando la secreción de insulina no ha sido alterada, no se presenta hipoglicemia con el uso de metformina. Su uso no se ha relacionado con acidosis láctica. La metformina puede ser empleada con extrema precaución y en dosis pequeñas en pacientes con disfunción renal moderada (Katzung, 1999; Cheng y Fantus, 2005).

1.4.5 Medidas generales para un correcto tratamiento de DM2.

La hiperglucemia persistente es el fenómeno central en todas las formas de DM2. El tratamiento debe estar encaminado a descender los niveles de glucemia a valores próximos a la normalidad siempre que sea posible (Luján et al., 2009). Con ello perseguimos:

1. Evitar descompensaciones agudas, cetoacidosis o síndrome hiperosmolar.
2. Aliviar los síntomas cardinales (poliuria / polidipsia / astenia / pérdida de peso con polifagia).

3. Minimizar el riesgo de desarrollo o progresión de retinopatía, nefropatía y/o neuropatía diabética.
4. Evitar las hipoglicemias
5. Mejorar el perfil lipídico de los pacientes.
6. Disminuir la mortalidad.

1.5 Inhibidores enzimáticos.

1.5.1 Definición.

Los inhibidores enzimáticos son sustancias que interfieren con la actividad de una enzima. Por medio de los inhibidores, una célula puede regular cuáles enzimas están activas y cuáles inactivas en un momento dado. La actividad de una enzima puede ser disminuida o eliminada completamente por la acción de ciertas sustancias a las cuales se las conoce con el nombre genérico de inhibidores enzimáticos. (Kiec et al., 2012).

1.5.2 α -glucosidasa e inhibidores de α -glucosidasa.

La α -glucosidasa (EC 3.2.1.20, glucohidrolasa-D-glucósido) del intestino delgado es una de las enzimas clave involucradas en el metabolismo y digestión de los carbohidratos en los seres humanos (Adera, Inami, Akamatsu, & Atsuoka, 2006). Cataliza la hidrólisis de residuos de una variedad de sustratos, incluidos los disacáridos, oligosacáridos, y otros como: alquil-aril-glucopiranosidos (Constantino et al., 1990); además, estas enzimas están presentes en el borde del cepillo del intestino delgado. Los inhibidores de esta enzima retrasan su actividad y por lo tanto la absorción del complejo hidratos de carbono, es por ello que inhiben los picos de glucosa postprandial y esto lleva a la disminución de los niveles postprandiales de insulina (Van de Laar FA et. al., 2009).

Los inhibidores de la alfa-glucosidasa actúan inhibiendo las enzimas del borde en cepillo del enterocito que hidrolizan los oligosacáridos a disacáridos y

monosacáridos que posteriormente son absorbidos (Salud, 2000). En la actualidad, existen cuatro inhibidores de la α -glucosidasa: acarbosa, miglitol, voglibosa y emiglitato. De éstos, acarbosa es el más prescrito. En la mayoría de las pautas no es un fármaco de primera elección sino que se utiliza junto con la adición de otros fármacos para la diabetes tipo 2 (Van de Laar FA et al., 2009).

Los principales efectos secundarios del uso de estos inhibidores se producen a nivel gastrointestinal (dolor abdominal, meteorismo y diarrea), son dosis-dependientes, normalmente transitorios y pueden ser disminuidos en gran manera si se introducen de un modo gradual, empezando por una dosis pequeña que se va aumentando cada 2 a 4 semanas (Whiting, Guariguata, Weil, & Shaw, 2011).

1.5.3 β -glucosidasa e inhibidores de β -glucosidasa.

Las glucohidrolasas β -D-glucósido (E.C. 3.2.1.21), más conocidas como β -glucosidasas, pertenecen a la familia de las β -glucanasas, y son responsables del catabolismo de una amplia gama de hidratos de carbono; pueden ser endo o exoglucanasas, cuya diferencia es el punto por el que inician la hidrólisis del polisacárido. Las β -glucosidasas se han aislado de distintas fuentes.

En humanos, se han identificado hasta tres β -glucosidasas nativas, dos de ellas formando parte de las membranas biológicas y con alta especificidad de sustrato, mientras que la tercera se localiza en el citosol de las células hepáticas y en el intestino de los mamíferos (Arévalo, 2006). Recientes estudios han revelado que los inhibidores de β -glucosidasa son fuertemente utilizados como: antivirales, antiadhesivos, antibacteriales, antimestastásicos y agentes inmunoestimuladores (Sánchez, et, al. 2001).

1.6 Plantas hipoglicemiantes.

A lo largo de la historia, se han utilizado una gran variedad de plantas de manera tradicional o experimental para tratar la DM. Estas plantas representan a más de

725 géneros de 183 familias. La mayoría de las plantas que se están utilizando como antidiabéticas han sido evaluadas farmacológicamente demostrando tener actividad hipoglucémica y agentes bioactivos que pueden ser utilizados como modelos para nuevos agentes hipoglicemiantes (Negri, 2005).

Las especies vegetales del Ecuador son especialmente adecuadas para el análisis de cualquier tipo de actividad biológica, ya que se encuentran en una zona donde predomina el clima tropical y subtropical, lo que les ha permitido desarrollar, a través de la evolución, mecanismos de acumulación de metabolitos secundarios que podrían tener distintas aplicaciones terapéuticas, entre ellas la hipoglicemiante (Sarango, 2008).

Los efectos hipoglucémicos de algunas plantas usadas como remedios antidiabéticos se ha confirmado en las poblaciones rurales que las usan, y los mecanismos de la actividad hipoglucémica de estas plantas se ha comenzado a estudiar (Jung, 2006). Estos remedios son aparentemente efectivos, producen efectos secundarios mínimos o no los producen y son de bajo costo comparados con los agentes hipoglucémicos sintéticos orales (Kumar, 2007).

1.7 Mecanismo de acción de las plantas hipoglicemiantes.

En general, las sustancias biológicamente activas extraídas de las plantas son conocidas como metabolitos secundarios, que desempeñan un papel importante en el mecanismo de defensa. El ácido salicílico es un inhibidor del crecimiento de las plantas y actúa como un agente hipoglucémico (Marles y Farnsworth, 1995).

Los mecanismos de acción por los cuales las plantas disminuyen el nivel de glucosa en la sangre pueden ser atribuidos a alguno de los siguientes factores:

- Aumento de la liberación de insulina a través de la estimulación de las células β -pancreáticas.
- Resistencia a las hormonas que aumentan el nivel de glucosa.
- Aumento del número y sensibilidad de sitios receptores de insulina.
- Disminución de la pérdida de glucógeno.

- Aumento del consumo de glucosa en los tejidos y órganos.
- Eliminación de radicales libres.
- Resistencia a la peroxidación de lípidos.
- Estimulación o aumento de la microcirculación de sangre en el organismo (Sarango, 2008).

Considerando que estos extractos y fracciones vegetales sólo son activos en modelos con DM tipo 2 inducida experimentalmente, es probable que su mecanismo de acción sea aumentar la secreción de insulina de manera similar a como lo hacen las sulfonilureas (Banderas, 2006).

1.8 Metabolitos hipoglicemiantes.

Tabla 7. Sustancias naturales hipoglicemiantes.

CLASE QUÍMICA	NÚMERO DE CONSTITUYENTES ACTIVOS
Alcaloides	38
Carbohidratos	66
Cumarinas	4
Glicosidos cianogénicos	1
Flavonoides	7
Glicopéptidos	20
Sales inorgánicas	3
Iridooides	4
Lípidos	6
Péptidos y aminas	15
Fenoles	4
Fenolpropanoides	1
Esteroides	7
Estilbenos	1
Sustancias sulfúricas	2
Terpenoides	17
Vitaminas	2
Xantonas	1

Fuente: Marles y Farnsworth, 1995

Los polifenoles del té y varias plantas han sido reportados como inhibidores enzimáticos de la actividad sacarasa y la actividad postprandial glucemia, polifenoles tales como: catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, las isoflavonas de soya, ácido tánico, glicirricina de la raíz de regaliz, el ácido clorogénico y saponinas. (Dembinskakiec, 2008). En la Tabla 7 se nombran algunas de las sustancias naturales hipoglicemiantes y su número de constituyentes activos.

1.9 Descripción botánica de *Ilex guayusa* Loes.

1.9.1 Características

Ilex guayusa es una planta nativa de las regiones tropicales y subtropicales del continente Sudamericano e incluso de Oceanía, se calcula que existen, aproximadamente, 500 especies (Radice & Vidari, 2010).

En Ecuador, la guayusa está presente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe, además se han encontrado registros en las provincias de Pichincha y Tungurahua (Caranqui & Humanante, 2011).



Figura 1. *Ilex guayusa* Loes.

Ilex guayusa Loes pertenece a la familia Aquifoliaceae y al género del acebo, siendo uno de los tres acebos que contienen cafeína, además contiene teobrimina y L-teanina (Radice & Vidari, 2010). Sus hojas se secan y se elabora con

ellas té y actualmente bebidas con propiedades estimulantes. El contenido en cafeína en la guayusa es de 2,90-3,28% en peso seco (Renase, 2009).

Dentro de este contexto, es fundamental aclarar que el conocimiento fitoquímico de la guayusa es limitado y la literatura científica es escasa, razón por la cual es necesaria una profunda investigación científica con el fin de evaluar su actividad biológica o farmacéutica y los posibles usos comerciales.

Actualmente, los pocos datos fitoquímicos de esta planta solo revelan datos de su contenido en cafeína, así como la presencia de triterpenos y ácidos clorogénicos (Radice & Vidari, 2010).

En el año 2009 se creó la Fundación Runa como una colaboración entre la comunidad Kichwa Amazanga en Pastaza y un equipo de técnicos norteamericanos, con la idea de producir guayusa y exportarla hacia los Estados Unidos.

Se han enfocado en esta planta debido a que es endémica de la Anazonía ecuatoriana y a su alto contenido de cafeína, lo que la ha caracterizado como fuente de energía y nutrición del pueblo amazónico por centenares de años. Las estimaciones realizadas por el personal de la Fundación muestran que 1 Ha puede producir aproximadamente 3000Kg de hojas, lo que generaría alrededor de 2000 dólares por año (Ríos, 2011).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción.

En este capítulo se describirá la metodología que está basada en cuatro etapas: recolección del material, elaboración de extractos orgánicos, fraccionamiento de extractos por técnicas cromatográficas y bioensayos de inhibición enzimática.

2. Recolección del material vegetal.

El material vegetal recolectado fue debidamente etiquetado, secado a temperatura ambiente, a la sombra y reducido a polvo por medio de un equipo de cuchillas inmediatamente antes de su extracción.

2.1 Ubicación geográfica del punto de recolección.



Figura 2. Cantón Sucúa, Morona Santiago

2.2 Elaboración de extractos orgánicos

Cantidades de 200 a 300 g de material vegetal seco fueron extraídas exhaustivamente con un gradiente de solventes que incluye un solvente apolar (hexano), uno de polaridad media (acetato de etilo) y un solvente de elevada polaridad (etanol). Los tres extractos fueron concentrados "in vacuo", mediante el uso de un evaporador rotatorio.



Figura 3. Elaboración de extractos orgánicos de *Ilex guayusa* Loes.

2.3 Fraccionamiento de extractos por técnicas cromatográficas.

Con vistas a realizar una primera separación en familias de compuestos, de los extractos seleccionados previamente se utilizó la cromatografía en capa fina (CCF) como se muestra en la Figura 4. De esta manera se determinó la mejor mezcla de solventes, para la fase móvil de una posterior cromatografía preparativa. Los extractos fueron permeados en soportes cromatográficos, utilizando un gradiente de solventes de polaridad creciente (Cazar, 2006).

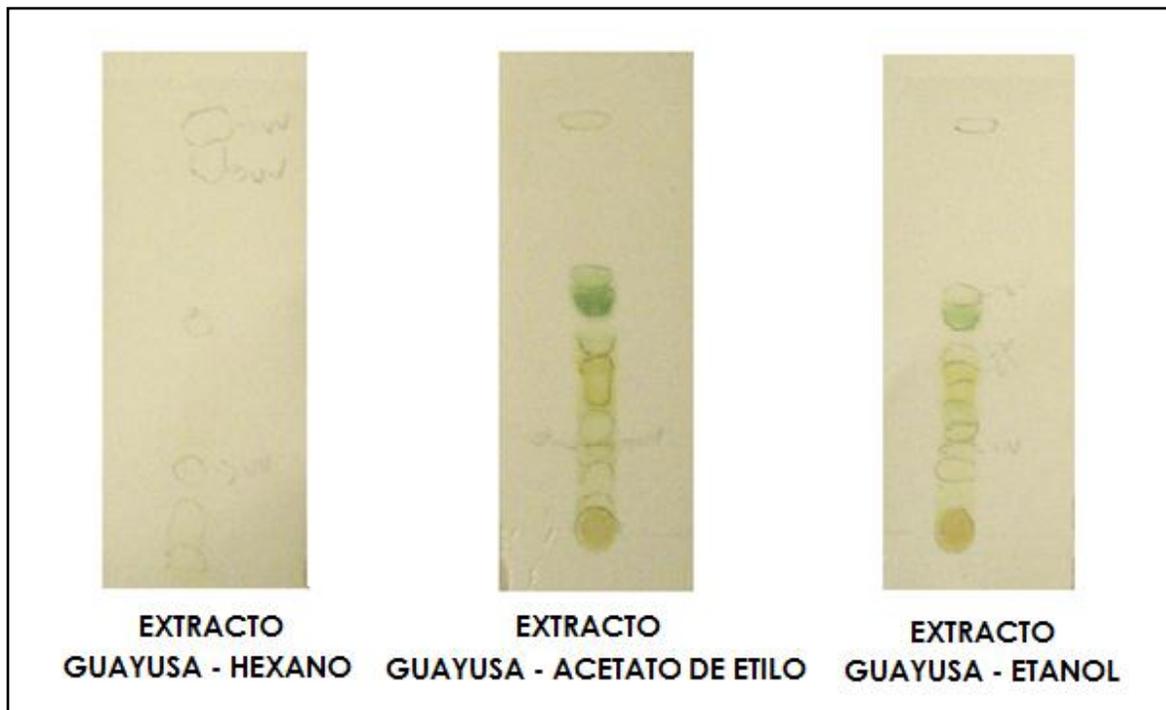


Figura 4. Cromatografía en capa fina para prueba de mezcla de los solventes HX : AcOEt en una concentración 70:30.

Se prepararon mezclas de Hexano (HX), Acetato de Etilo (AcOEt) y Etanol (EtOH). Las mezclas de solventes utilizados fueron:

HX : AcOEt en una concentración 70:30.

HX : AcOEt en una concentración 60:40.

Se identificaron previamente las fracciones obtenidas para cada extracto, estas fueron numeradas como se aprecia en la Figura 5.

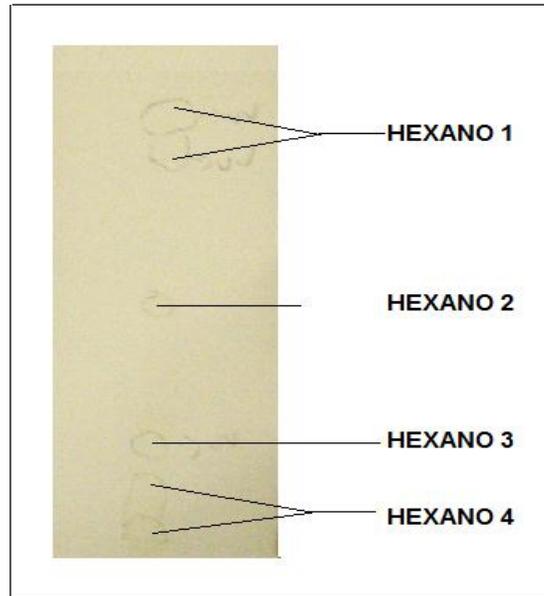


Figura 5. Identificación y numeración de las fracciones obtenidas a partir del extracto Hexano:Guayusa.

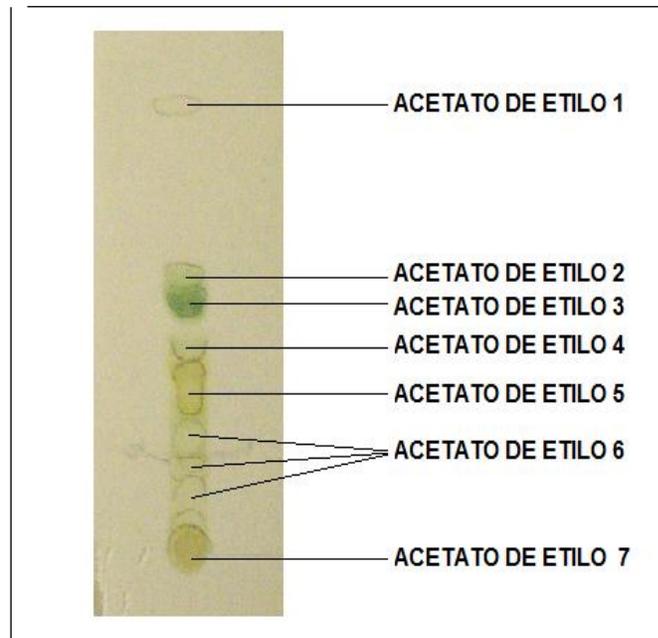


Figura 6. Identificación y numeración de las fracciones obtenidas a partir del extracto Acetato de Etilo:Guayusa.

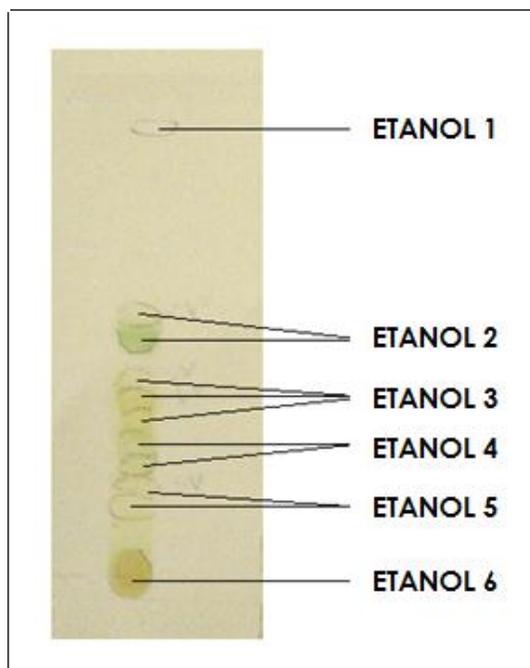


Figura 7. Identificación y numeración de las fracciones obtenidas a partir del extracto Etanol:Guayusa.

2.4 Aplicación de Cromatografía en capa fina (CCF)

Se aplicó la CCF con el objetivo de separar al extracto en fracciones. Se prepararon previamente las placas de vidrio con Sílica gel (fase estacionaria). Se pesó 1 mg de los diferentes extractos de guayusa que fueron colocados en un tubo eppendorf, al mismo tiempo se colocaron 300 μ l de acetona y se los homogenizó, hasta que el extracto quede disuelto completamente.

Se procedió a sembrar en las placas de Sílica gel para luego colocarlas en una cámara cromatográfica, cuya fase móvil es la mezcla de HX : AcOEt 6:4 (obtenida de la CCF). Luego del desarrollo de la cromatografía, la fase estacionaria se secó a temperatura ambiente.

Las secciones de la cromatografía que presentaron colores definidos fueron numeradas desde el origen. Cada sección fue raspada, recolectada, extraída con acetona y filtrada para separar el Sílica de la fracción. Finalmente, el filtrado se colocó en frascos de vidrio previamente pesados, se dejó evaporar la acetona y se registró el peso de la fracción obtenida.

En la Figura 8 se presenta la cromatografía en capa fina para el extracto Guayusa: Acetato de Etilo.

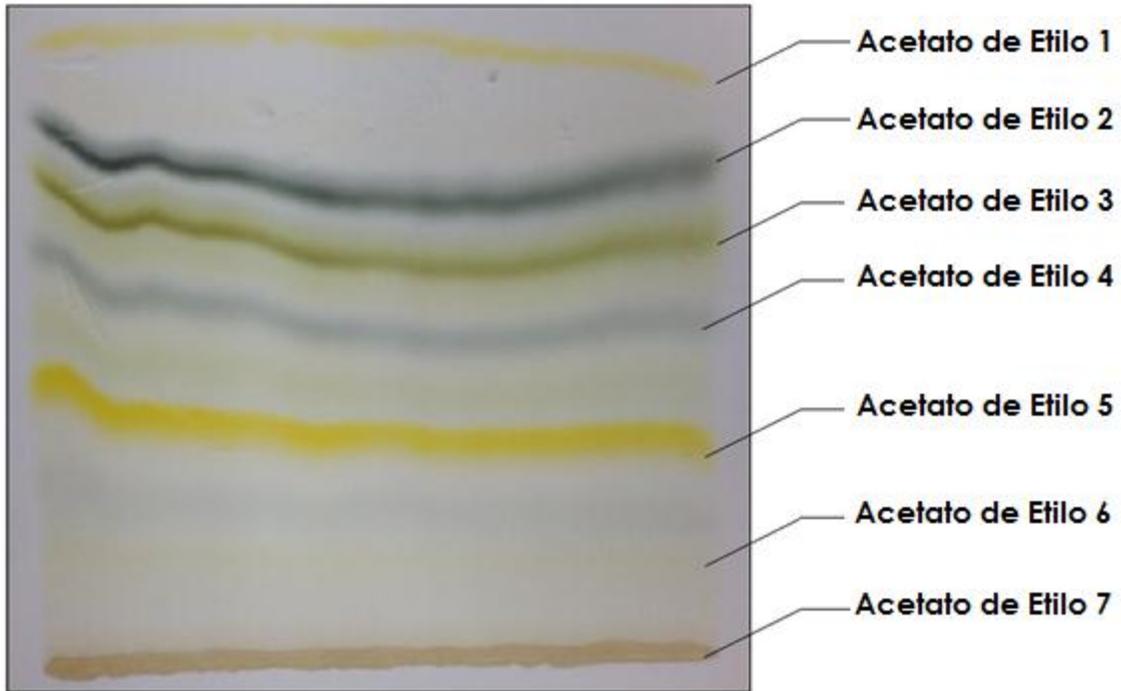


Figura. 8 Fraccionamiento del extracto guayusa-Acetato de Etilo por cromatografía en capa fina.



Figura. 9 Recolección y filtrado de las fracciones bioactivas.

2.5 Bioensayo de inhibición de las enzimas α y β glucosidasa

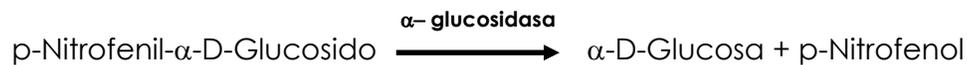
La determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa fue realizada mediante un ensayo espectrofotométrico, que cuantifica la liberación de p-nitrofenol del sustrato p-nitrofenil α -D-glucósido en presencia de α -glucosidasa. Se realizaron lecturas de absorbancia de una solución control de concentración conocida de glucosa y las fracciones en estudio ($\lambda = 400 \text{ nm}$).

La actividad inhibitoria de la enzima β -glucosidasa se determinó mediante una prueba espectrofotométrica que cuantifica los productos de reacción del sustrato β -D glucósido en presencia de la enzima en estudio ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Thermo, la incubación de muestras se desarrolló en una estufa Memmert. Las enzimas y sustratos utilizados fueron adquiridos de la casa Sigma, St. Louis, MO.

2.6 Bioensayo de inhibición de α -glucosidasa (EC 3.2.1.20)

2.6.1 Principio.



2.6.2 Condiciones.

T = 37°C,

pH = 6.9,

Ab = (400 nm)

2.6.3 Preparación de la muestra para el ensayo.

La muestra se preparó partiendo de la mezcla de 25 μl de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%, 25 μl de Polisorbato (Tween 20) y 2450 μl de agua destilada. A esta mezcla se colocó 0.001g de extracto. Se llevó la mezcla al sonicador por veinte minutos, luego se centrifugó a 310 rpm por diez minutos, esta mezcla fue tomada como la solución madre del ensayo. Luego se prepararon diluciones a diferentes concentraciones: 100, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Sánchez, 2001).

2.6.4 Procedimiento.

La solución fue preparada con 1 mg de enzima por ensayo en un volumen de 3,22 ml de agua desionizada fría. En cada tubo de reacción se colocaron, 35 ml de solución enzimática a esto fueron adicionados a 35 ml de inhibidor preparado en una concentración de 500 mg/ml y se mantuvo a 37 °C por 5 minutos para alcanzar el equilibrio como se observa en la Figura 10.

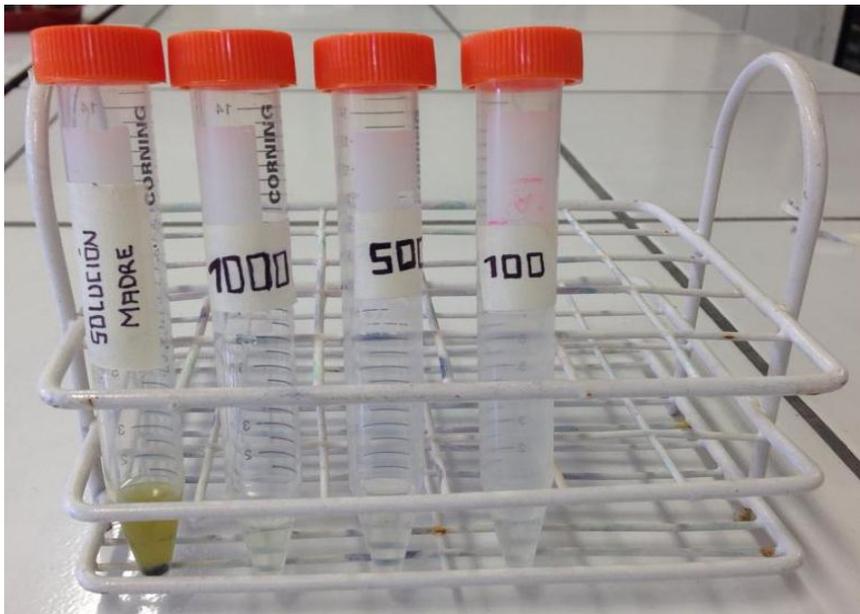


Figura 10. Preparación del inhibidor en una concentración de 500mg/ml a partir de la solución madre para Bioensayo de inhibición de α -glucosidasa en los extractos.

La reacción se inició al agregar 930 μ l de p-Nitrofenil- α -D-Glucósido (PNP-G) (0,914 mM en PBS 67 mM) y toda la mezcla fue incubada a 37 grados centígrados por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada tubo 1 ml de una solución 100 mM de carbonato de sodio para detener completamente la reacción. Se mezcló por inversión y se transfirió a la celda espectrofotométrica de la figura 11 para iniciar la lectura de absorbancias a 400 nm (Sarango, 2008).



Figura 11. Espectrofotómetro utilizado en los ensayos de inhibición enzimática de las enzimas α y β - glucosidasa.

Tabla 8. Esquema para la determinación de la capacidad inhibitoria de α -glucosidasa

Ensayo de inhibición de α-glucosidasa				
Soluciones	Muestra (B)	Blanco (D)	Control 1 (A)	Control 2 (C)
Inhibidor	35 μ l	35 μ l	-	-
Enzima	35 μ l	-	35 μ l	-
Agua desionizada	-	35 μ l	35 μ l	70 μ l
Mezclar por inversión e incubar a 37 °C por 5 min				
Sustrato	930 μ l	930 μ l	930 μ l	930 μ l
Mezclar por inversión e incubar a 37 °C por 15 min				
TRIS	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l
Mezclar por inversión y leer en espectrofotómetro a 400 nm				

Fuente: (Sarango, 2008).

2.6.5 Cálculo de la actividad inhibitoria para los ensayos espectrofotométricos de α -glucosidasa.

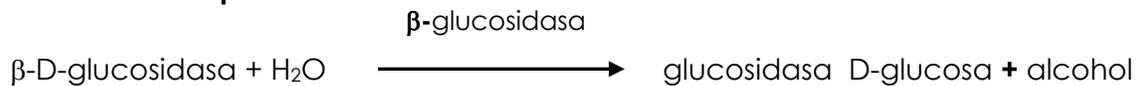
Las absorbancias registradas en el espectrofotómetro son transformadas posteriormente a porcentajes de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\%INH = 100 \left\{ 1 - \left(\frac{B - D}{A - C} \right) \right\}$$

Donde B es la absorbancia de la muestra, D es la absorbancia del blanco (sin enzima), A es la absorbancia del control 1 (sin inhibidor) y C es la absorbancia del control 2 (sin inhibidor y sin enzima) (Sarango, 2008).

2.7 Bioensayo de inhibición de β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).

2.7.1 Principio.



2.7.2 Condiciones.

T = 37°C

pH = 5.0

Ab = (410 nm)

2.7.3 Preparación de la muestra.

La muestra se preparó partiendo de la mezcla de 25 μl de DMSO al 1%, 25 μl de Tween 20 y 2450 μl de agua destilada. A esta mezcla se colocó 0.005 g del extracto. Se llevó la mezcla al sonicador por veinte minutos, luego fue centrifugada a 310 rpm por diez minutos.

2.7.4 Procedimiento.

Se preparó por separado un test que constó de la mezcla de: 0.4 ml del sustrato Salicilina, 0.2 ml de la muestra y 0.4 ml de búfer pH 5, esta mezcla fue incubada a 37 °C por diez minutos. Una vez transcurrido este tiempo se agregó 0.2 ml de la

enzima β -glucosidasa, nuevamente se incubó a 37°C por 30 minutos, posteriormente, se adicionó 2.6 ml de búfer pH 10 para detener la actividad de la enzima.

De la misma manera, se preparó el control positivo, con la diferencia que en este se coloca 0.2 ml de la mezcla de solventes (25 μ l DMSO; 25 μ l SDS 1%; 2450 μ l de agua destilada) como reemplazo de los 0.2 ml de la muestra utilizados en el test como se aprecia en la Figura 12.

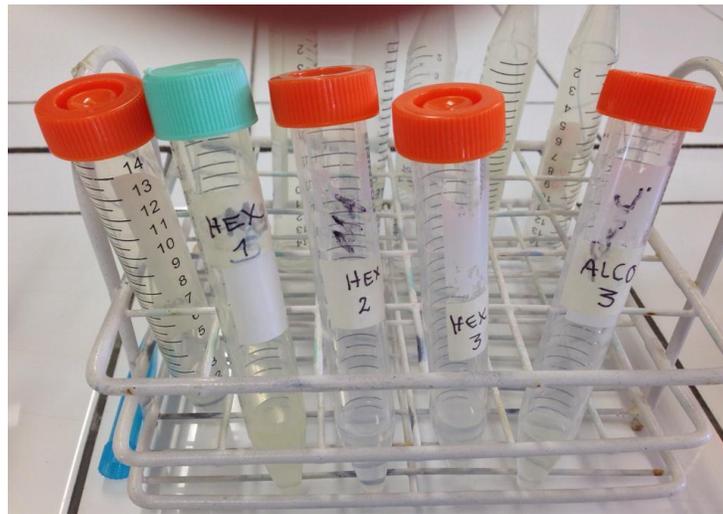


Figura 12. Ensayo de Inhibición de β - glucosidasa en fracciones bioactivas de Hexano y Alcohol.

En el caso del control negativo no se llevó a cabo la incubación por 30 minutos si no que inmediatamente colocada la enzima se detuvo la actividad enzimática. Se realizaron las lecturas de cada ensayo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm (Sánchez, 2001). El resumen del ensayo se presenta a continuación en la Tabla 9.

2.7.5 Cálculo de la actividad inhibitoria para los ensayos espectrofotométricos de inhibición de β -glucosidasa.

La fórmula utilizada para calcular en porcentaje la inhibición es la siguiente:

$$\% \text{Inhibición enzimática} = 100 - \left[\frac{\text{Absorbancia test} - \text{Control negativo}}{\text{Control positivo}} \times 100 \right]$$

Tabla 9. Esquema para la determinación de la capacidad inhibitoria de β -glucosidasa.

Ensayo de inhibición de β-glucosidasa			
Solución	Test	Control positivo	Control negativo
Sustrato	0.4ml	0.4ml	0.4ml
Muestra	0.2ml	-	0.2ml
Búfer pH 5	0.4ml	0.4ml	0.4ml
Solventes	-	0.2ml	-
Incubar a 37°C por 10 minutos			
Enzima	0.2ml	0.2ml	0.2ml
Búfer pH 10	-	-	2.6ml
Incubar a 37°C por 30 minutos			Se detiene la reacción
Búfer pH 10	2.6ml	2.6ml	
Mezclar por inversión y leer en espectrofotómetro a 410 nm			

Fuente: Autora.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Introducción.

En el siguiente capítulo se presentan resultados de los rendimientos obtenidos para cada uno de los extractos orgánicos; de la misma manera, se dan a conocer los rendimientos obtenidos para cada una de las fracciones y finalmente se muestran los resultados obtenidos en los bioensayos de inhibición enzimática de α -glucosidasa y β -glucosidasa expresados en porcentajes de inhibición enzimática.

3. Rendimiento de los extractos

En la presente tabla se detallan los porcentajes de rendimiento de cada uno de los extractos obtenidos a partir de las hojas previamente secas y molidas.

Tabla 10. Porcentajes de rendimiento obtenidos en la elaboración de los extractos orgánicos con los diferentes solventes.

EXTRACTO	PESO HOJAS GUAYUSA (g)	PESO DEL EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO
HEXANO	200	0,833	0,42%
ACETATO DE ETILO	200	4,449	2,22%
ALCOHOL	200	4,458	2,23%

3.1 Patrones de separación cromatográfica y rendimiento de las fracciones

A continuación en la Tabla 11 se muestran los porcentajes de rendimiento detallados para cada una de las fracciones obtenidas con cada extracto, además se presenta un promedio para cada de cada extracto.

Tabla 11. Rendimiento de las fracciones obtenidas con cada extracto

Solvente	Fracción	% Rendimiento	\bar{X}
Hexano	1	6%	37%
	2	49%	
	3	45%	
	4	47%	
Acetato de Etilo	1	68%	15%
	2	5%	
	3	4%	
	4	8%	
	5	8%	
	6	10%	
	7	4%	
Etanol	1	45%	12%
	2	5%	
	3	3%	
	4	5%	
	5	7%	
	6	9%	

3.2 Ensayos de actividad enzimática para α y β glucosidasa obtenidos de los extractos orgánicos

En la Tabla 12 se presentan los porcentajes de inhibición enzimática de las enzimas α y β – glucosidasas de cada uno de los extractos orgánicos.

Tabla 12. Resultados del ensayo de Inhibición de α y β glucosidasas.

Tipo de extracto	Inhibición α -glucosidasa	Inhibición β -glucosidasa
	(500 μ g/ml)	(1000 μ l/ml)
Hexano	98.4 %	14.4 %
Acetato de Etilo	79.1 %	69.1 %
Etanol	58.2 %	38.3 %

3.3 Ensayos de actividad enzimática con fracciones para β -glucosidasa

Las fracciones obtenidas fueron investigadas por el potencial inhibitorio de la enzima β – glucosidasa, los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición enzimática de β -glucosidasa para las fracciones bioactivas.

FRACCIÓN	% Inhibición β -glucosidasa	X
HEXANO 1	29.3 %	
HEXANO 2	41,50%	35%
HEXANO 3	28,10%	
ACETATO 1	52,50%	
ACETATO 3	50,20%	52,47%
ACETATO 5	54,70%	
ALCOHOL 1	69,90%	
ALCOHOL 3	90,20%	84,23%
ALCOHOL 5	92,60%	

NOTA: En la prueba de fracciones en la enzima α -glucosidasa los resultados no se presentan, debido a la falta de condiciones de experimentación.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tres solventes fueron utilizados para la obtención de extractos orgánicos de la especie *Ilex guayusa* Loes, esto permitió separar el mayor número de compuestos presentes tomando en cuenta su polaridad. En la Tabla 8 se puede apreciar un porcentaje de rendimiento según el solvente utilizado dando como resultado un 2.23% al utilizar Etanol, 2.22% para el Acetato de Etilo y un 0.42% para el hexano; es decir, que el porcentaje de rendimiento de los extractos es mayor mientras la polaridad del solvente aumenta.

En cuanto al rendimiento de las fracciones se puede apreciar un mayor porcentaje de rendimiento en las fracciones menos polares que en promedio equivale a un 37%, seguida de un 15% para el Acetato de Etilo y un 12% para el etanol; por lo tanto, mientras menos polar sea el compuesto mayor cantidad de fracciones se obtiene en comparación con los datos de rendimiento de la Tabla 8.

Se evaluó la actividad inhibitoria de las enzimas α y β glucosidasa partiendo de los extractos orgánicos y de las fracciones resultantes, la metodología utilizada para cada uno de los ensayos fue consultada exhaustivamente en la bibliografía existente hasta la fecha. La validación de la técnica se llevó a cabo mediante varias pruebas, finalmente los resultados obtenidos reflejaron ser consistentes y coherentes.

En la Tabla 12 se presentan los resultados de Inhibición enzimática tanto de α -glucosidasa como de β -glucosidasa en cada uno de los extractos. Al comparar el porcentaje de inhibición enzimática de ambos ensayos se aprecia claramente una similitud en el ensayo de los extractos a base de Acetato de Etilo

(medianamente polares) con un 69.1% para β -glucosidasa y 79.1% para α -glucosidasa, esto según la literatura podría tratarse de ciertos antioxidantes que podrían estar involucrados con la capacidad antidiabética de las plantas.

En cuanto a los extractos menos polares se nota una clara diferencia entre el ensayo de α -glucosidasa con un 98.4% de inhibición y β -glucosidasa con un 14.4%. Por otra parte, se elaboraron los bioensayos de β -glucosidasa en las fracciones obtenidas reflejándose un menor porcentaje en las fracciones menos polares que en promedio se registra un 52.5 % de inhibición, esto coincide con los bajos valores resultantes del mismo bioensayo en extractos.

Ya se han reportado antecedentes de inhibición enzimática de la planta en estudios previos con enzimas α amilasa y α glucosidasa que soportan la hipótesis de la presente investigación. Los estudios realizados revelan un potencial inhibitorio, y no se descarta la actividad antidiabética de *Ilex guayusa* Loes. (Sarango, 2008).

Se aproxima que los componentes bioactivos responsables de la actividad antidiabética son los polifenoles que han sido reportados como inhibidores enzimáticos de la actividad sacarasa y la actividad postprandial glucemia, polifenoles tales como: catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, las isoflavonas de soya, ácido tánico, glicirricina de la raíz de regaliz, el ácido clorogénico y saponinas. (DFG A. Dembinskakiiec, 2008). Además se sabe de antemano que en la DM2 existe un aumento del estrés oxidativo y una disminución de los sistemas de defensa antioxidante (Cuerda et al., 2011).

En la presente investigación se demuestra el potencial hipoglicemiante de *Ilex guayusa* Loes. Los usos etnobotánicos de esta especie, común en el Oriente Ecuatoriano, fundamentan su interesante actividad biológica. El desarrollo de posteriores investigaciones orientadas a caracterizar los principios bioactivos y el desarrollo de nuevos modelos de actividad biológica "in vivo" fortalecerán los hallazgos presentados y podrían guiar el desarrollo de suplementos alimenticios recomendados para diabéticos.

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo presenta las siguientes conclusiones:

- Mediante las condiciones en las que han sido realizados los bioensayos se considera a *Ilex guayusa* Loes una especie vegetal con una importante actividad inhibitoria de las enzimas α y β - glucosidasa involucradas en el mecanismo de la diabetes mellitus tipo 2.
- La metodología de aislamiento bioguiado de extractos vegetales y fracciones fue puesta a punto utilizando métodos que se reportan en investigaciones previas, estos métodos fueron adaptados a las condiciones del material vegetal hasta obtener resultados persistentes y claros, de esta manera los ensayos in vitro fueron estandarizados.
- El tipo de compuestos presentes mayoritariamente en los ensayos se aproximan a los polifenoles ya que según la bibliografía consultada, estos están interrelacionados con la capacidad inhibitoria que tiene una planta frente a las enzimas.
- El presente estudio demuestra que *Ilex guayusa* Loes presenta metabolitos hipoglicémicos que podrían ser de interés para la industria de alimentos nutraceuticos.
- El mecanismo por el cual la especie disminuye el nivel de glucosa en la sangre probablemente se deba a la eliminación de radicales libres por la presencia de polifenoles o a la resistencia a la peroxidación de lípidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERA, K. T., INAMI, Y. M., AKAMATSU, K. T., & ATSUOKA, T. M. (2006). "Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids", 149–153.
- ALMIRÓN, M. E., GAMARRA, S. C., GONZÁLEZ, M. S., & ISSLER, J. R. (2005). "Diabetes gestacional". *Rev Postgr Vía Cátedr Med*, 152, 23-7.
- ALTAMIRANO, L. M. (2001). "Epidemiología y diabetes". Pg. 44 (1), 35–37.
- ARÉVALO, M. (2006) "*Estudio de la actividad β -glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología*". Tesis Doctoral. Ciudad Real, Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Universidad de Castilla-La Mancha.
- BANDERAS, T. (2006) "Mecanismo de acción hipoglicemiante de extractos obtenidos de plantas antidiabéticas". Tesis de Maestría. México, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Iztapalapa.
- CARANQUI, J. HUMANANTE A. (2011). "Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa". Fundación Runa Tarpuna. Herbario Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- CARRILLO, P. (2011). "Comprobación del efecto Hipoglicemiante del zumo del fruto de Noni (*Morinda citrifolia*) en ratas (*rattus novergicus*) con *Hiperglucemia Inducida*". Tesis de grado. Ecuador, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- CHENG AY, FANTUS IG. 2005. "Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus". *Canadian Medical Association Journal*. (CMAJ) 18:213-226.

- CUERDA, C., LUENGO, L. M., VALERO, M. A., VIDAL, A., BURGOS, R., & MARTÍNEZ, F. L. C. C. (2011). "Antioxidantes y diabetes mellitus : revisión de la evidencia" 26(1), 68–78. doi:10.3305/nh.2011.26.1.5115
- EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. (2003). "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus". Diabetes Care 26: S5-S20.
- GARCÍA, C. PEREZ, E. MARTÍNEZ, A. CASTRO, F. "Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes", Revista Chapingo Serie Zonas Aridas. Departamento de Postgrado e Investigación. Universidad Juárez del Estado de Durango, México, 2009, pp8:229-239.
- HAYS WS., JENISON SA., YAMADA T., PASTUSZYN A., GLEW RH. (1996). "Primary structure of the β -glucosidase of guinea pig liver". Biochemistry Journal. 319, 829-837.
- KATZUNG BG. 1999. "Farmacología Básica y Clínica. Ed. Manual moderno, México, pp 203, 791-812.
- KIEC, A. D., MYKKÄNEN, O., WILK, B. K., MYKKÄNEN, H., KIEC-WILK, B., & MYKKA, H. (2012). "Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes", (May 2008).
- KUMAR, S. S., PRASHANT KUMAR, R.; JAISWAL, D. Y WATAL, G. 2007. "Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodon dactylon*." eCAM **5**(4): 415-420.
- LUJÁN, C. G., ESTELA, B., HERNÁNDEZ, P., ROMERO, A. M., & BARRAZA, F. C. (2009). "El Control Glucémico De La Diabetes Use Of Medicinal Plants And Dietary Supplements For Glycemic Control Of Diabetes", 229–239.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. "Antidiabetic plants and their active constituents". Review. Phytomedicine. Vol. 2, p. 137-189, 1995.

- MELLOR JD., LAYNE DS. (1971). "Steroid D-glycosidase activity in rabbit tissue". *Journal Biological Chemistry*. 246, 4377-4380.
- NATHAN DM, BUSE JB, DAVIDSON MB, FERRANNINI E, HOLMAN RR, SHERWIN R, ET AL.(2009)."Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes". *Diabetes Care* 2009;32(1):193-203.
- RÍOS, M. (2011) "*Evaluación de la eficacia de cuatro enraizadores y tres tipos de estaca en la producción de plantas de guayusa (Ilex guayusa) a nivel de vivero en el cantón Archidona, provincia de Napo*". Monografía. Riobamba. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales.
- SÁNCHEZ-MEDINA, A., GARCÍA-SOSA, K., MAY-PAT, F., & PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. (2001). "Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities". *Phytomedicine*, 8(2), 144-151.
- SÁNCHEZ, L. (2008). "Fármacos con actividad incretina: una alternativa terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2". *Av Diabetol*. 2008; 24(1): 4-6. volumen 24. número 1.
- SARANGO, V. (2008) "Determinación de la actividad antidiabética de los extractos totales de nueve especies vegetales nativas del Sur del Ecuador: Piper crassinervium (Guabiduca), Baccharis genistelloides (Tres filos), Neonelsonia acuminata (Zanahoria blanca), Siparuna eggertii (Monte de oso), Ilex guayusa (Guayusa), Croton wagneri (Mosquera), Costus comosus (Caña agría), Verbena litoralis (Verbena) y Oreocallis grandiflora (Cucharillo) mediante ensayos de inhibición de alfa amilasa y alfa glucosidasa". Tesis de grado. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja febrero de 2009.

- TRIVIÑO, C. (2010). "Diabetes y Embarazo". Guía Práctica para parteras. Mexico D.F. Luna Maya Casa de partos. Junio 2010.
- VAN DE LAAR FA, LUCASSEN PLBJ, AKKERMANS RP, VAN DE LISDONK EH, RUTTEN GEHM, VAN EEL C. (2009) "Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus" collaboration and published in The Cochrane Library Published by JohnWiley & Sons, Ltd.. 2009, Issue 1.
- WILD, DARAH, et al. "Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030". Diabetes care, 2004, vol. 27, no 5, p. 1047-1053.
- WHITING, D. R., GUARIGUATA, L., WEIL, C., & SHAW, J. (2011). "IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030". Diabetes research and clinical practice, 94(3), 311–21. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- ALVÍDREZ, A. GONZÁLEZ, B. JIMÉNEZ, Z. (2002). "Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales" en *revista de Salud Pública y Nutrición* [En línea] No. 3. Julio-Septiembre 2002, Universidad Autónoma de Nuevo León (México), disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2002/spn023g.pdf>
[Accesado el 09 de Junio de 2013]
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2010). "*Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*" in *Diabetes Care Journal* [en línea] No. 35. Supplement 1 Alexandria, January 2012 disponible en:
http://care.diabetesjournals.org/content/35/Supplement_1/S64.full.pdf+html
[Accesado el 01 de Junio de 2013]
- ANDRADE, A. BECERRA, J. CÁRDENAS, R. (2007) "Alpha-glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes" in *Journal of Ethnopharmacology* [en línea]. No. 116, 28 February 2008, Universidad Nacional Autónoma de México, p. 27-32 disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107005600>
[Accesado el 01 de Junio de 2013]
- CASAS, L. MANTELL, C. RODRIGUEZ, M. TORRES, F. MACÍAS, A. MARTÍNEZ DE LA OSSA. ULLOA, H. (2005). "Extracción y separación de sustancias bioactivas a partir de hojas de *Helianthus annuus* L" en *revista Cubana de Química* [en línea] Vol. 17, No 3, 2005, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, disponible en:
<http://revistas.mes.edu.cu/greenstone/collect/repo/import/repo/20090507/0258599505317.pdf>
[Accesado el 25 de Mayo de 2013]

- CONSTANTINO, R. BROWN, S. KELLY, R. (1990) "Purification and Characterization of an α -Glucosidase from a Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, Exhibiting a Temperature Optimum of 105 to 115°C" in *Journal of Bacteriology* [en línea], No.7. Vol. 172, University of Maryland, July 1990, p. 3654-3660.

Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213339/>

[Accesado el 18 de Mayo de 2013]

- DEMBINSKA, A. MYKKÄNEN, O. KIECWILK, B. MYKKÄNEN, H. (2008) "Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes". *British Journal of Nutrition* [en línea] Vol. 99, Issue ES1, 27 May 2008, disponible en:

http://journals.cambridge.org/abstract_S000711450896579X

[Accesado el 11 de Mayo de 2013]

- FERRO, E. DEGEN DE ARRÚA, R. (2011) "Actividad inhibitoria de extractos de plantas medicinales de Paraguay sobre aldosa reductasa de cristalino de rata". Departamentos de Fitoquímica¹ y de Botánica². Universidad Nacional de Asunción. Vol. 10, 2011: 31-42, disponible en:

[http://www.qui.una.py/botanica/cfq/Vol%2010\(2\)_2011/Actividad%20inhibitoria%20de%20extractos.pdf](http://www.qui.una.py/botanica/cfq/Vol%2010(2)_2011/Actividad%20inhibitoria%20de%20extractos.pdf)

[Accesado el 28 de Agosto de 2013]

- KESTEL, F. (2005) "Diabetes Tipo 2". Educador clínico, Albert Einstein Health Care Network Philadelphia, Estados Unidos. Nursing. 2005, Vol. 23, No. 5, disponible en:

<http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/20/20v23n05a13075746pdf001.pdf>

[Accesado el 14 de Mayo de 2013]

- MANKIL JUNG, MOONSOO PARK, HYUN CHUL LEE, YOON-HO KANG, EUN SEOK KANG, AND SANG KI KIM, (2006). "Antidiabetic Agents from Medicinal Plants" in

Bentham Science Publishers Ltd [en línea] No. 10. Vol. 13, 2006, Yonsei University, Korea, p1203-1218.

Disponible en: <http://www.chifountain.com/wp-content/uploads/2010/05/demand-various-herbs.pdf>

[Accesado el 09 de Mayo de 2013]

- MORENO, L. (2001) "Epidemiología y diabetes" en *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* [en línea]. No.1. Vol. 2001, UNAM.

Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no44-1/RFM44109.pdf>

[Accesado el 11 de Mayo de 2013]

- Negri, G. (2005) "Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes", in *Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea]. No. 2, vol. 41, abr./jun., 2005.

Disponible en:

<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n2/28034.pdf>

[Accesado el 7 de Mayo de 2013].

- Radice, M. y Vidari, G. (2007) "Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial" en *revista La Granja* [en línea]. Vol. 6. Edición. 6. Octubre, 2007, Universidad Politécnica Salesiana.

Disponible en: <http://lagranja.ups.edu.ec/edicion-6>

[Accesado el 18 de Abril de 2013]

- RENASE. Certificado de Análisis de Guayusa para Fundación Runa [en línea]. 2009. Remedios naturales selváticos. Laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana. Departamento de control de Calidad.

Disponible en:

<http://es.scribd.com/doc/61478231/Componentes-Quimicos-Guayusa-19Oct09>.

- SANTOS, D. LORENZANA, M. GUERRERO, G. (2009) "Utilidad del nopal para el control de la glucosa en la diabetes mellitus tipo 2" [en línea] Monografía. Departamento de Farmacología.Facultad de Medicina, UNAM. 2009.

Disponible en:

<http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no49-4/RFM49408.pdf>

[Accesado el 18 de Abril de 2013.

- TORRES Y TORRES, N. Y TOVAR, A. (2009) "La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud" Salud Pública [en línea]. No. 3. Vol. 51 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, mayo-junio de 2009.

Disponible en:

http://bvs.insp.mx/rsp/_files/File/2009/Mayo%20Junio/9-soya.pdf

[Accesado el 11 de Mayo de 2013]