Estudio fitoquímico y farmacológico de plantas con efecto Hipoglicemiante.

C. B. Castañeda; M. R. Manrique ** & V. L. Ibáñez****

Resumen

En la primera parte del estudio farmacológico evaluamos el efecto de la Notholaena nivea, «cuti-cuti», el Geranium lechleri «pasuchaca» y el Smallanthus sonchifolius «yacón», «llacón» (tubérculo y hojas), sobre la hiperglicemia aloxánica, siguiendo las técnicas del CYTED y utilizando 50 ratas machos, Ratus norgicus de la cepa Holtzman. En la segunda parte, del estudio, evaluamos el efecto del cuti cuti sobre la glicemia y la lipidemia; utilizamos 60 ratas distribuidas en tres grupos de 20 animales cada uno. La determinación de la glicemia, colesterol total, HDL y triglicéridos fue realizada en el autoanalizador bioquímico Vitalab SELECTRA 2, a las 1, 2, 4, y 12 horas. La DL50 del cuti cuti fue determinada en ratones, utilizando el método de los probits y correspondió a: 11.099 mg/kg, con un límite superior e inferior, al 95%, de 13.009,72 y 9.470,59 respectivamente. Encontramos que los extractos metanólicos de Natholaena nivea, Geranium lechleri y hojas del Smallanthus sonchifolius poseen efecto hipoglicemiante frente a la hiperglicemia aloxánica. La Notholaena nivea, «cuti- cuti», administrada por vía oral a la dosis de 250mg/kg, además de un buen efecto hipoglicemiante frente a la hiperglicemia inducida por aloxano; redujo los valores de triglicéridos y colesterol, aumentados por el aloxano. En la evaluación fitoquímica del extracto se encontró la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, leucoantocianidinas, entre otros. Observamos la presencia de rutina y quercetina confirmados por TLC, HPLC, IR y RMNH1, así como un principio activo al que se le ha denominado CH-2.

* Director del Instituto de Investigación de la FMH-USMP

** Investigador del Centro de Investigación de Medicina Tradicional A.

*** Profesora Investigadora del Centro de Investigación de Medicina Tradicional A.

Palabras clave: *Agentes hipoglicemiantes, Notholaena nivea, Geranium lechleri, Smallanthus sonchifolius, Aloxano, Rutina, Quercetina.*

Abstract

In the first part of the pharmacologic study we evaluated the effect of the methanolic extracts of Notholaena nivea, «cuti-cuti», Geranium lechleri «pasuchaca» and Smallanthus sonchifolius «yacon», «llacon» on the alloxanic hyperglycemia in rats, following the CYTED models.We used 50 male rats Ratus norgicus, Holtzman. In the second part of the study, we evaluated the effect of methanolic extract of Notholaena nivea «cuti cuti» on glycemia and lipdemia in rats. We used 60 rats distributed in three groups of 20 animals each. The determination of glucose, total cholesterol, HDL and tryglicerids in plasma was made in the Vitalab SELECTRA 2 biochemical self-analyzer. The DL50 of «cuti cuti» was determined in mice by the probits method, and it was 11,099 mg/kg of weight with superior and inferior limit, at 95%, of 13,009 and 9,470 mg/kg of weight. We found that the methanolic extracts of Notholaena nivea, «cuti-cuti», Geranium lechleri «pasuchaca» and Smallantus sonchifolius'leaves «yacon», administered by oral route, showed hypoglycemic effect against the hyperglycemia induced by alloxan. Notholaena nivea «cuti cuti», administered by oral route, to the doses of 250 mg/kg of weight showed a good hypoglycemic effect against the hyperglicemia induced by alloxan; in the other wide, it reduced the triglycerids and cholesterol values, increased by the alloxan. In the phytochemical screening of the extract we found fenolics compounds, flavonoids, tannins, alkaloids, leucoantocianidines, among others. Besides, we found rutin and quercetin confirmed by TLC, HPLC, IR y RMNH1, and an active principle denominated as CH-2 .

Key words: *Hipoglycemic agents, Notholaena nivea, Geranium lechleri, Smallantus sonchifolius, Alloxan, Rutin, Quercetin.*

INTRODUCCIÓN

La investigación en plantas, así como la utilización de los recursos del medio ambiente bajo condiciones de racionalidad (mínimo costo y alto grado de satisfacción social), se han convertido, actualmente, en una premisa fundamental que debe ser considerada para orientar la incorporación sistemática de los conocimientos científicos y tecnológicos a las actividades económicas, sociales y culturales. No obstante, a pesar de la gran utilización de las plantas medicinales por la población, cada vez mayor, pocas de ellas han sido estudiadas siguiendo métodos científicos válidos y atendiendo a las normas éticas definidas internacionalmente. Pues, si bien el uso popular es un indicador importante, no es garantía de la actividad terapéutica, existiendo, además, factores muy importantes como son las variaciones ecológicas, por las cuales una misma especie puede presentar concentraciones diferentes de los mismos principios activos, debido a que el metabolismo secundario de los vegetales superiores es responsable de la síntesis de sustancias

químicas, con poca acción, del propio vegetal, aunque orientadas por las características genéticas de las plantas. La síntesis química de estas sustancias, es controlada por factores del ecosistema (luz, calor, temperatura, humedad y suelo) siendo importante reconocer que, muchas veces, no es posible encontrar la misma proporción relativa de esos constituyentes en las mismas especies recogidas en épocas y lugares diferentes (CYTED, 2000; Ibáñez, 2002).

Asimismo, es necesario comprobar el potencial de toxicidad de una planta para su posible aceptación como medicamento, además de la garantía de su efecto específico, evaluando su relación riesgo/beneficio, en la especie humana, siguiendo las normas éticas. La experimentación animal debe preceder a la evaluación de la planta medicinal en la especie humana, aunque éste sea el objetivo final de la validación. En cuanto a la especie humana, es preciso considerar la susceptibilidad individual a los fármacos, la reacción a los placebos y a la capacidad de autosugestión, para que puedan ser debidamente evaluados los efectos de una planta medicinal utilizada como medicamento. Asociando estas variables a las enfermedades, de intensidades diferentes y/o de causas diferentes, es fácil imaginar que el tratamiento humano con una planta, sin control de calidad y sin la determinación de su actividad farmacológica, puede llevar a cualquier resultado ineficaz o hasta tóxico (Ministerio de Salud Pública de Cuba, 1993; Comitee of the European Communities, 1992). Las técnicas científicas modernas permiten la evaluación adecuada de los medicamentos, en la especie humana. De modo general, los criterios son extensos y muy ceñidos a cuestionamientos de ética, pero permiten obtener resultados cuantificables, eliminando los falsos positivos o falsos negativos.

La Fitoterapia es el tratamiento médico con plantas o productos vegetales no purificados, como por ejemplo: el uso de la corteza de quina usada en polvo o en infusión, comparada con el sulfato de quinina y los derivados sintéticos de esta molécula. En el primer caso, hay el uso basado en la observación de causa-efecto de los productos de la corteza, en el segundo es la aplicación de una molécula antiparasitaria específica derivada de su hallazgo en la corteza del árbol de la Quina. En la actualidad hay dos formas de usar las plantas. Una es la tradicional o folklórica, que sigue las líneas de la etnografía. La otra es el uso científico que se basa en los caminos usuales de la experimentación biológica, siendo la seguridad de principios activos, presentes en las plantas, de vital importancia para su posterior uso en la clínica; por lo tanto, los valores obtenidos en el ensayo toxicológico (DL50) son referenciales, para establecer la inocuidad de los principios activos presentes en la planta, extracto o fracción estudiada, adoptando todos los países del mundo la declaración de Helsinki que sienta las bases de la experimentación en seres humanos. Los criterios actuales para la evaluación de nuevos recursos terapéuticos, en la especie humana, fueron elaborados a partir de esos principios. Se condena la experimentación, en el hombre, sin

conocimiento razonable de la actividad farmacológica y de la toxicidad preclínica en animales de laboratorio. El cumplimiento de un procedimiento de estudios preclínicos, es condición *sine qua non* para los estudios clínicos en humanos, en los centros de investigación clínica, indicando: dosis, efectos más probables y manifestaciones adversas importantes o efecto tóxico grave, en cuyo caso no se recomienda pruebas en humanos (Ibáñez, 2002; Ministerio de Salud Pública de Cuba, 1993; Comitee of the European Communities, 1992).

La diabetes mellitus representa un problema de salud pública mundial y es considerada como una de las enfermedades crónicas con persistencia permanente, con características de epidemia. La OMS ha estimado que para el año 2010, Latinoamérica doblará el número de diabéticos, de 12 a 24 millones de personas; del mismo modo que lo harán otras regiones en vías de desarrollo, como resultado del proceso de envejecimiento poblacional y también del estilo de vida, sobre todo en las ciudades donde el ritmo de vida es mucho más activo que en el campo, pero sedentario, por otro lado, pues poca gente dispone del tiempo suficiente para hacer ejercicio físico y muchas enfermedades se complican por la ingestión diaria, en la dieta, de alimentos procesados, refinados, bajos en fibras y otros compuestos presentes en los alimentos naturales; enlatados, conservados de manera artificial durante largos períodos de tiempo, con sustancias como colorantes y saborizantes artificiales o sintéticos, etc. Recientes datos de la OPS (Boletín Epidemiológico, Junio 2001), revelan que la incidencia de diabetes tipo I en el Perú equivale al 0,4/100000 habitantes. Así mismo, estas investigaciones le asignan al Perú una tasa entre el 5,1% y 6,0% para la prevalencia de diabetes mellitus en adultos (Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2000). Éstas mismas estadísticas estiman que las poblaciones urbanas tienen tasas dos veces mayores que las poblaciones que viven en zonas rurales. El aumento de la prevalencia de diabetes se acentúa debido a la migración progresiva de la población del campo a la ciudad y a la incorporación de hábitos que favorecen la aparición de la obesidad.

La diabetes se caracteriza por déficit de secreción de insulina, o por la menor acción de la misma sobre su receptor, dando como resultado altos niveles de glicemia. La diabetes está asociada a un incremento del riesgo de muerte, particularmente porque está vinculada a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las personas que presentan diabetes tienen, además, un mayor riesgo de padecer: retinopatías, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores por fallas en la circulación. La diabetes aparece en dos formas: Tipo I (que se inicia con mayor frecuencia durante la infancia o la adolescencia) y Tipo II (que está relacionada con la obesidad y la inactividad física). La diabetes tipo II representa alrededor del 90% de todos los casos de diabetes y aparece con mayor frecuencia después de los 40 años (Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2000).

En el Perú en 1989, se logró, por Resolución Ministerial, aprobar el listado de recursos terapéuticos vegetales para ser usados en los centros asistenciales del antes Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS), hoy Seguro Social de Salud (EsSalud); sin embargo no logró el impacto necesario entre los profesionales de la salud para su utilización debido, entre otras razones, al desconocimiento del efecto terapéutico, acompañado de falta de experiencia clínica confiable, con un soporte del control toxicológico de las plantas medicinales mencionadas, lo que generó desconfianza entre los médicos. Sin embargo, existen algunos principios activos aislados de las plantas, como flavonoides y alcaloides, que se encuentran en gran proporción en *Notholaena nivea,* «cuti-cuti», y otras plantas con efecto hipoglicemiante. Entre los flavonoides hallados se encuentran la rutina y quercetina, que cuentan con investigaciones probadas de su efecto hipoglicemiante.

La quercetina ejerce un efecto hipoglicemiante, inhibiendo a la enzima aldosa reductasa, la cual está relacionada con la producción de polioles, responsables de los efectos crónicos en la diabetes y, por sus propiedades antioxidantes, reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares, incluyendo las trombosis vasculares (Cody *et al.,* 1987; Duke, 2000).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que puede ser controlada con dieta, hipoglicemiantes orales e insulina, por lo cual resulta importante investigar la existencia de algunos principios activos, presentes en las plantas provenientes de nuestra biodiversidad, con propiedades normalizadoras de la glicemia. La primera descripción del uso de plantas medicinales para el tratamiento de diabetes se encuentra en el papiro de Ebers, que data del año 1500 A.C (Bayley, 1989). Más de 400 plantas tradicionales han sido descritas como beneficiosas para disminuir los niveles de glicemia en pacientes diabéticos, aunque sólo en, aproximadamente, 60 de ellas se ha demostrado este efecto y en 35 de ellas se ha identificado el principio activo.

Para el género *Notholaena* se han descrito 42 especies, las cuales son helechos distribuidos en el continente sudamericano en las variedades *nivea, oblongata, tenera, flava,* conociéndose en el Perú a la especie *Notholaena nivea*, con los nombres de doradilla, cuti-cuti, raqui raqui y en Bolivia como kutu kutu (Quechua), chaxella Aymara), doradilla, siendo consumida por la población en infusión para la diabetes y como vermífugo reportándose que en algunos casos produjo temblores en el ganado ovino. Mencionándose en los estudios químicos realizados en esta especie a 5-hidroxi-7,4'-dimetoxyflavona, quercetina y ácido isonotholaénico.

En el Perú se están realizando trabajos en plantas medicinales con efecto sobre la glicemia. Diversos estudios han encontrado efectos sobre la glicemia de *Geranium ayavacense* (Apumayta *et al.,* 2000; Dávila 2000)

en ratas diabéticas. Cáceres *et al.* (1991) realizaron una investigación preliminar sobre el efecto hipoglicemiante de *Notholaena nivea* Cuti-Cuti y *Geranium lechleri* en ratas hiperglicémicas, utilizando el glucómetro como instrumento de medición de glucosa observando una significativa disminución de la glicemia por parte de los extractos metanólicos de *Geranium lechleri* proveniente de Cajamarca y *Notholaena nivea* proveniente de Ancash, con respecto al control (suero fisiológico), a partir de la primera hora de administrado el extracto por vía oral, siendo *Geranium lechleri* más significativa durante la primera y segunda hora y *Notholaena nivea* más efectiva desde la segunda hora hasta la duodécima hora, planteándose que el efecto hipoglicemiante podría deberse a una mejor utilización de la glucosa por los tejidos periféricos y un aumento de la sensibilidad de los receptores de insulina (véase también Talla *et al.*, 2000).

Así mismo, encontramos diversas plantas medicinales de uso popular que manifiestan un efecto hipoglicemiante, por ejemplo Ortiga, Chanca Piedra, Yacón (autóctona del Perú, que ha sido muy estudiada por japoneses que ahora la cultivan y exportan), las cuales en su mayoría no cuentan con estudios preclínicos, ni clínicos demostrados. Por ello, en el presente trabajo, evaluamos el efecto hipoglicemiante de tres plantas usadas popularmente, para el tratamiento de la diabetes mellitus. En el caso del cuti cuti, además, del efecto hipoglicemiante, evaluamos el efecto sobre las alteraciones de los lípidos plasmáticos, producidas por el aloxano. Los experimentos se realizaron en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional Andina, del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina de la USMP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del Material Botánico

Para la obtención del material biológico se solicitó al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Illary las muestras de *Notholaena nivea* (cuti cuti) de la zona de Cañete, *Geranium lechleri* (pasuchaca), de la zona de Cajamarca y *Samallantus sonchifolius* (yacón), de la provincia de Celendín, Cajamarca; las cuales fueron identificadas taxonómicamente, para luego preparar los extractos metanólicos respectivos, al 10% p/v, por maceración durante siete días. Utilizamos metanol Q. P, el cual fue filtrado y la solución evaporada hasta la total eliminación del solvente y secado en una campana de extracción hasta obtener un residuo seco verdoso. De la *Natholaena nivea*, se utilizó la corteza y la flor, del *Geranium lechleri*, el tallo y la flor y del *Samallanthus sonchifolius*, el tubérculo y las hojas.

Screening fitoquímico

Se realizó de acuerdo al método descrito por Ciulei (1982, ver Figura 1). Se extrae la droga seca y molida con éter, utilizando un Soxhlet. El residuo se seca, extrayéndose en el Soxhlet con alcohol. Finalmente, el resto se extrae con agua, bajo reflujo. Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso se sometieron a una secuencia de pruebas químicas de coloración y precipitación para la detección de compuestos orgánicos. Estas pruebas utilizaron los siguientes reactivos.

Acetato de plomo básico para flavonoides. Este reactivo precipita los flavonoides como sales de plomo por lo que puede ser usado como método de extracción y de separación.

Cloruro férrico para fenoles y ácidos hidroxámicos. Los fenoles reaccionan con el tricloruro de fierro ($FeCl3$) para dar sales férricas fenoxídicas coloreadas (azul-verde-violeta). Los ácidos hidroxámicos presentan coloración roja.

Hidróxido de sodio para cumarinas volátiles. Las cumarinas son sustancias fluorescentes y comúnmente fotosensibles. Como son lactosas, se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas con aparición de una coloración amarilla que presenta fluorescencia azul bajo la luz UV.

Ninhidrina para aminoácidos, sales de amonio y anilina. Los alfa aminoácidos en solución acuosa calentados en presencia de ninhidrina producen un color azul-violeta. La ninhidrina reacciona con el aminoácido formando una base de schiff, la que se descompone liberando anhídrido carbónico dando el 2 amino-1,3-diceto hidrindeno y un aldehido. La amino dicetona (a un pH adecuado) se condensa con la ninhidrina dando un producto coloreado.

Prueba de espuma para saponinas esteroides y saponinas triterpenoides. Las saponinas tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua, por lo que sus soluciones acuosas producen espuma, de manera similar al jabón.

Prueba de Shinoda para flavonoides. Los flavonoides al ser tratados con ácido clorhídrico y magnesio dan complejos coloreados (de rojo pálido a oscuro). Al añadir un poco de alcohol isoamílico y agitar, el color pasa a la capa isoamílica.

Reactivo de Bortranger para naftoquinonas, antraquinonas, antronas o antranoles. Las soluciones bencénicas de naftoquinonas, antraquinonas, antronas o antranoles son amarillas y colorean de rojo las soluciones alcalinas, la presencia de varios hidroxilos o dobles enlaces conjugados tienen un efecto batacrómico.

Reactivo de Dragendorff para alcaloides y aminas terciarias. Formación de yoduro doble colorido y en algunos casos, insoluble, de fórmula general Bil3B.HI donde B es la molécula de alcaloide.

Reactivo de Gelatina-sal para taninos. Ocurre la hidrólisis del tanino dando un compuesto fenólico y un azúcar.

Reactivo de Kedde para g-lactonas y glicósidos cardíacos. En medio alcalino se forma un intermediario de ion cardenólido, que se acondiciona nucleofílicamente en la posición orto a los grupos nitro del aromático; se forma un anión de color rojo violeta estabilizado por mesomería (complejo Meisenheimer).

Reactivo de Liebermann-Burchard para esteroides y glicósidos triterpénicos. Ocurre una deshidratación con formación de un doble enlace conjugado a un segundo doble enlace, lo que da un producto coloreado.

Reactivo de Mayer para alcaloides. Precipitación con un ión grande, formación de un yoduro doble, de fórmula general Hgl2-B.HI, donde B es la molécula de alcaloide (precipitado blanco).

Reactivo de Molish para monosacáridos. El ácido sulfúrico con las pentosas y hexosas da furfural o 5-(hidroximetil)-furfural. Estos furfurales con el alfa-naftol se condensan formando cromógenos, que con el ácido sulfúrico dan compuestos quinoides de color violeta.

Reactivo de Rosenheim(NaOH 5%) para flavonoides. Las sales de oxonio de todas las antocianinas y antocianidinas se disocian hidrolíticamente cuando están en soluciones diluídas, formándose la base libre de oxonio (II) que se isomeriza formando la pseudo-base incolora (I).

Reactivo de Wagner (yodo-yoduro de potasio) para alcaloides. Formación de yoduro doble de alcaloide (precipitado café).

Vainillina-ácido clorhídrico para catequinas. Formación de un derivado coloreado que se intensifica por la presencia del ácido.

Vainillina-ácido sulfúrico para alcoholes superiores, fenoles esteroides y aceites etéreos. Formación de derivados coloreados. Este reactivo detecta desde hidrocarburos hasta esteroides sustituidos. El rango de coloraciones que se presenta es muy amplio y aparecen coloraciones de todo el espectro.

Aislamiento de principios activos.

De los diferentes extractos metanólicos de las plantas estudiadas, se procedió a la separación de los principios activos por métodos convencionales de cromatografía en columna. De la *Natholaena nivea*,

se obtuvo: Rutina, Quercetina y un compuesto al que se ha denominado CH-2, los cuales han sido analizados utilizando técnicas de TLC, HPLC, IR, RMNH1. En la separación cromatográfica se ha utilizado, como adsorbente, Gel de Sílice 60(Merck) y como eluyentes solventes orgánicos. Para realizar la c.c.f se ha empleado cromatofolios de Silica Gel de 0,25 mm de espesor (Merck), mientras que para realizar ccfp se ha empleado cromatoplacas de Silica Gel de 2,0 mm de espesor (Merck). La pureza de los compuestos, así como el curso de las reacciones, ha sido observada por cromatografía en capa fina. Como reveladores se utilizaron la luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y cloruro férrico. Los datos espectroscópicos de IR que se presentan han sido obtenidos en los espectrofotómetros Perkin Elmer 283-B y Nicolet FT-JR 5 SX. En el caso de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNH1), se realizaron en el espectrómetro Varian Gemini 2000(200 MHz).

Metodología de la evaluación de la toxicidad aguda oral

De las plantas en estudio, la *Notholaena nivea* (cuti cuti), fue evaluada con mayor profundidad, en razón de los mayores efectos observados en el control de la glicemia, quedando las otras dos, para una evaluación posterior, dentro de un programa general de estudio de plantas hipoglicemiantes. Se evaluó la toxicidad aguda del cuti cuti, determinando la dosis letal media (DL50) en animales de experimentación. Para ello, utilizamos 36 ratones divididos en seis grupos de seis animales cada uno, de ambos sexos, provenientes del Ministerio de Salud con un peso de 25 y 30 g. Los ratones fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio, separados en jaulas e identificados individualmente mediante un sistema de marcado con Violeta de Genciana. El extracto se administró en dosis de 2000, 4000, 8000, 10000, 12000 y 16000 mg/Kg. La observación se realizó en forma minuciosa durante las primeras 24 horas y se continuó con una observación diaria, hasta concluir las 72 horas. La DL 50 se estimó mediante el método estadístico de los Probits (CYTED, 1995).

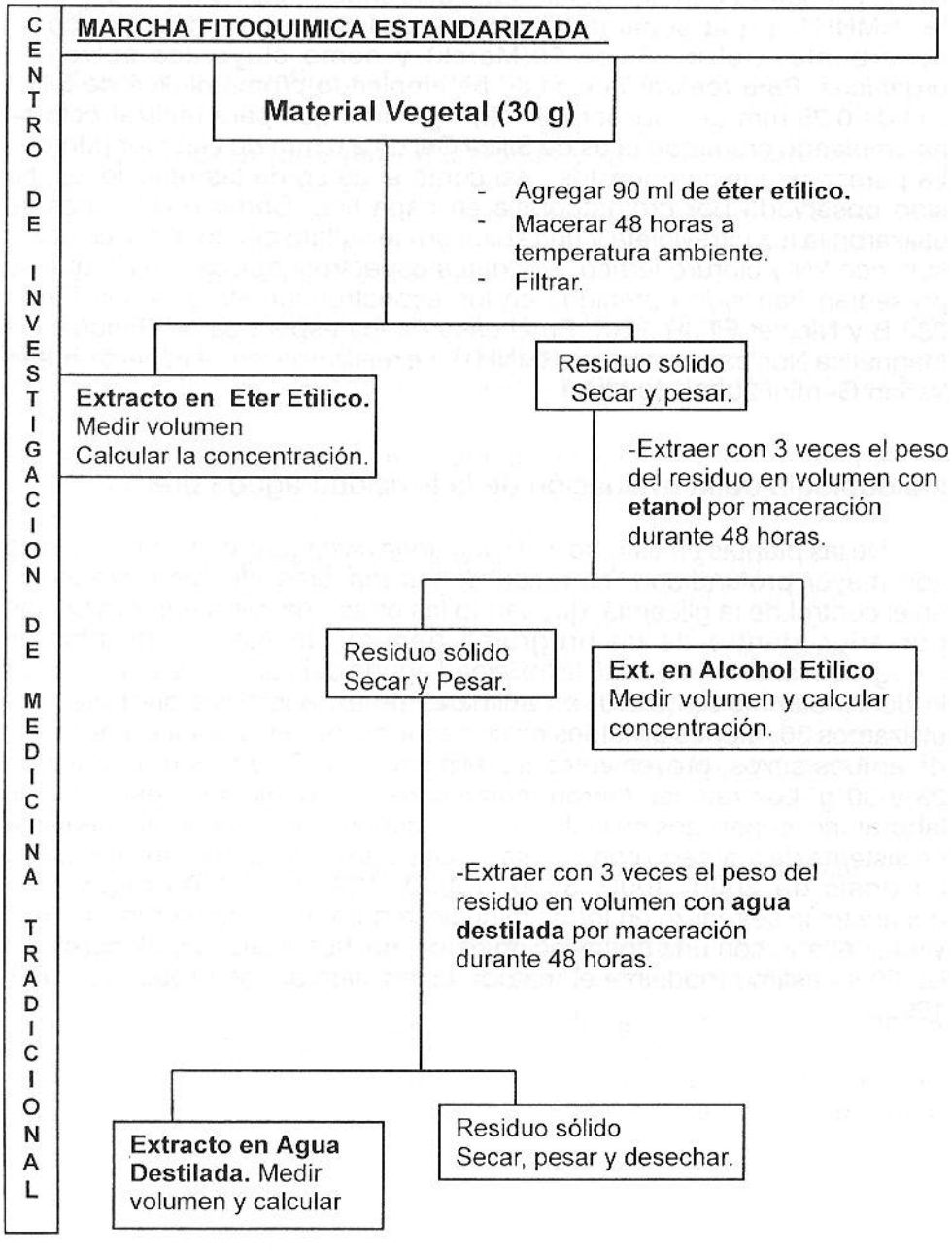

Figura 1
Diagrama del procedimiento de sreening fítoquímico.

Evaluación de la actividad hipoglicemiante.

En la primera parte del estudio farmacológico, evaluamos el efecto del cuti cuti, la pasuchaca y el yacón (tubérculo y hojas), sobre la hiperglicemia aloxánica (diabetes química experimental), para lo que utilizamos 50 ratas machos, *Ratus norgicus* de la cepa Holtzman, de un mes de edad y un peso de 140-170 g. Todos los animales fueron sometidos a ayuno de 24 horas y luego se les administró 150 mg/kg de aloxano, vía intraperitoneal, previa toma de muestra de sangre para determinar los niveles basales de glucosa sanguínea. Se les mantuvo con alimentación estándar y agua *ad libitum* durante la realización del experimento. 72 horas después de la administración de aloxano, se realizó un nuevo control de glicemia, y los animales con valores de glucosa sanguínea mayores a 300 mg/dL, fueron considerados como portadores de diabetes aloxánica, aptas para el experimento. Se constituyeron cinco grupos de 10 animales cada uno, distribuidos de la siguiente manera: GI: suero fisiológico; GII: cuti cuti, 250 mg/kg; GIII: pasuchaca 250 mg/kg; GIV: yacón (tubérculo), 500 mg/kg y GV: yacón (hojas), 500 mg/kg. Se realizó controles de glicemia a las 0, 1, 2, 4 y 12 horas posteriores.

Evaluación del efecto del cuti cuti sobre la glicemia y la lipidemia.

En la segunda parte del estudio, evaluamos el efecto del cuti cuti sobre la glicemia y la lipidemia, para lo cual utilizamos 60 ratas, distribuidas en tres grandes grupos I, II y III de 20 ratas cada uno. Todos los animales fueron sometidos a ayuno de 24 horas previo a la realización de los experimentos. Para observar los efectos del cuti-cuti sobre la glicemia normal, el primer grupo de 20 ratas fue dividido en dos subgrupos de 10 animales cada uno, a los que no se les administró Aloxano. El segundo grupo de 20 ratas, recibió 150mg/Kg de Aloxano por vía intraperitoneal para inducir hiperglicemia experimental, evaluándose el nivel de glucosa en sangre, previa canalización del seno venoso del ojo de cada una de ellas, por medio del método de la glucosa oxidasa en el Autoanalizador Bioquìmico Vitalab SELECTRA 2 a partir de las 72 horas. El grupo II fue subdividido en dos subgrupos de 10 animales cada uno; uno de los subgrupos recibió suero fisiológico y el otro, cuti cuti a la dosis de 250 mg/kg de peso y sirvieron para evaluar el efecto del cuti cuti, sobre la glicemia y lipidemia normales. Se realizó control de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL, en sangre, a las 1, 2, 4 y 24 horas. El tercer grupo estuvo constituido por 20 ratas, a las que se les produjo hiperglicemia por aloxano; posteriormente, 10 animales con glicemia superior a 300 mg%, recibió suero fisiológico (control) y los 10 restantes cuti cuti, a la dosis antes indicada, controlándose la glicemia y la lipidemia, a las 1, 2, 4 y 24 horas posteriores.

RESULTADOS

Clasificación taxonómica.

El material vegetal fue identificado taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con los resultados que se muestran en la Tabla 1.

Según el criterio de Williams para la calificación de los resultados de la DL50, se tiene:

Extremadamente tóxico	DL50 $\leq$	a	1 mg/kg
Altamente tóxico	DL50 $\leq$	a	50 mg/kg
Moderadamente tóxico	DL50 $\leq$	a	500 mg/kg
Ligeramente tóxico	DL50 $\leq$	a	5 000 mg/kg
Prácticamente no tóxico	DL50 $\leq$	a	15 000 mg/kg
Relativamente inocuo	DL50 $\geq$	a	15 000 mg/kg.

De acuerdo con este criterio y a las clases de toxicidad según la Comunidad Europea, y considerando los datos de la Tabla 2, el extracto metanólico de cuti-cuti se puede clasificar como prácticamente no tóxico, ya que tiene una DL50 mayor a 5000 mg/Kg, equivalente a 11,099 mg/kg de peso, con un límite superior e inferior, al 95%, de 13.009,721 y 9.470,5949 respectivamente.

Tabla 1
Identificación taxonómica del material vegetal.

REINO	: Plantae	Plantae	Plantae
FILO	: Pteridophyta	Magnoliophyta	Angiospermas
CLASE	: Filices	Magnoliosida	Dicotiledonae
ORDEN	: Pteridales	Geraniales	Asterales
FAMILIA	: Sinopteridaceae	Geraniaceae	Astereaceae
GENERO	: Notholaena	Geranium	Smallanthus / Polymnia
ESPECIE	: *Notholaena nivea* (Poir) Desv	*Geranium lechleri* Knuth	*Smallantus sonchifolius* Polimnia sonchiflius OPEP.
NOMBRE	: Cuti-Cuti.	Pasuchaca	Yacon, bacón, llakuma

Tabla 2
Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50)
de Notholaena nivea, cuti-cuti.

GRUPO	DOSIS	Muertos 24 h	Muertos 48 h	Muertos 72 h
1	2000	0/6	0/6	0/6
2	4000	0/6	0/6	0/6
3	8000	1/6	1/6	1/6
4	10000	2/6	2/6	2/6
5	12000	3/6	3/6	3/6
6	16000	6/6	6/6	6/6

DL50: 11.099 mg/kg; con límites, al 95 %, de: superior = 13.010, inferior = 9.471

Efecto de la *Natholaena nivea* (cuti cuti), sobre la Glicemia y la Lipidemia

En la Tabla 3 y la Figura 2 consignamos los valores de la glucosa sanguínea, en los diferentes grupos estudiados. Apreciamos un claro efecto hipoglicemiante de cuti cuti, pasuchaca y hojas de yacón, no así el yacón tubérculo; igualmente apreciamos que el mayor efecto hipoglicemiante corresponde al cuti cuti, seguido de las hojas de yacón.

En la Tabla 4 consignamos los valores de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL plasmáticos, en los diferentes grupos estudiados con cuti cuti; igualmente sus representaciones corresponden a las Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Apreciamos que el cuti cuti, carece de efecto hipoglicemiante en ratas normoglicémicas; sin embargo, si se evidenció un buen efecto hipoglicemiante en los grupos tratados con Aloxano, observándose una disminución, en la hiperglicemia, de 70,8, 83,0, 65,63 y 62,11% a las 1H, 2H, 4H y 24H respectivamente, frente al grupo control.

Con respecto a los valores de triglicéridos, se observó un descenso, sobre todo, a la segunda hora de tratamiento, obteniéndose un 85,20% de reducción, no hallándose cifras de reducción, estadísticamente significativas, en los diferentes grupos, respecto a los valores de HDL-Colesterol.

Tabla 3
Glicemia según grupos, por tiempo

Grupo	Tiempo					
	Basal	**Aloxano (0)**	**1 h**	**2h**	**4 h**	**12 h**
Control	120,4	503.5	512	455	353	251
Cut cuti	114,3	501	402	350	205	90
Pasuchaca	119,3	503,6	357	319	305	155
Yacón (T)	107	514	478		432	
Yacón (H)	112	469	359		251	

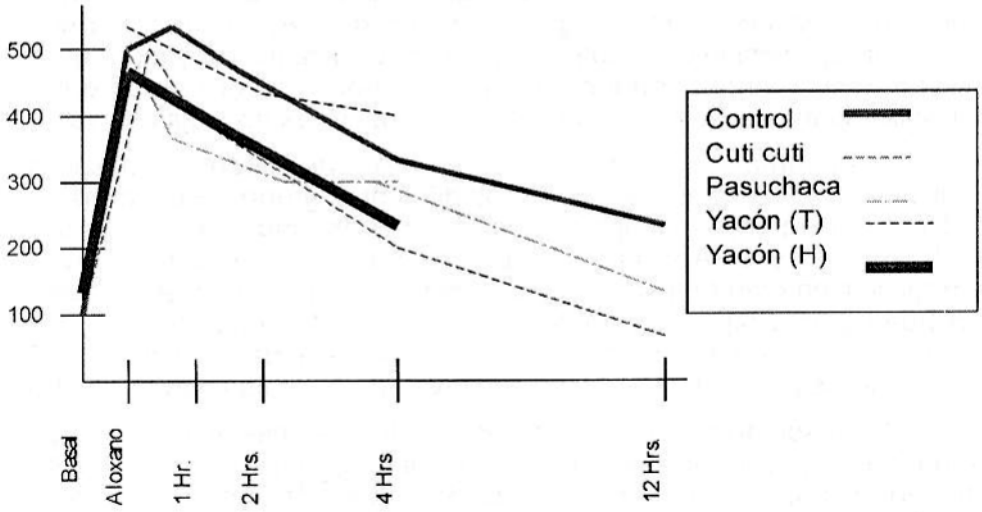

Figura 2
Glicemia según grupos por tiempo.

Tabla 4

Valores promedio de glucosa, colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos según grupos de tratamiento

Grupos de Tratamiento		Glucosa		Colesterol		HDL -Colesterol		Triglicèridos	
	Horas	Control	Cuti -Cuti	Control	Cuti -Cuti	Control	Cuti -Cuti	Control	Cuti -Cuti
I	Basal	59	70,4	75	80,2	37,3	42,0	69	60,2
	1H	61	65	59	68	29,4	33,6	50	44,8
	2H	87	87,8	55	61.5	26	27,0	57	43,9
	4H	162	160	51	59,7	22	25,7	67	51,7
	24H	162	160	65	59,0	30	29,7	112	86,6
II	Basal	58	55	76	74	37,3	42,0	69	60,2
	1H	538	157	66	66	26	31,7	242	90
	2H	597	149	108	63	27	27,6	453	67
	4H	486	167	62	58	27	27,2	206	60
	24H	417	158	59	57	24	24,3	155	59
III	Basal	120	120						
I	ALOXANO	503,5	501						
	1H	512	402						
	2H	455	350						
	4H	353	205						
	12H	251	90						

Valores expresados en mg//dl.

Grupo I, no recibió aloxano. Grupo II, recibió aloxano. Grupo III, recibió aloxano y fue subdividido después de constatar la hiperglicemia experimental.

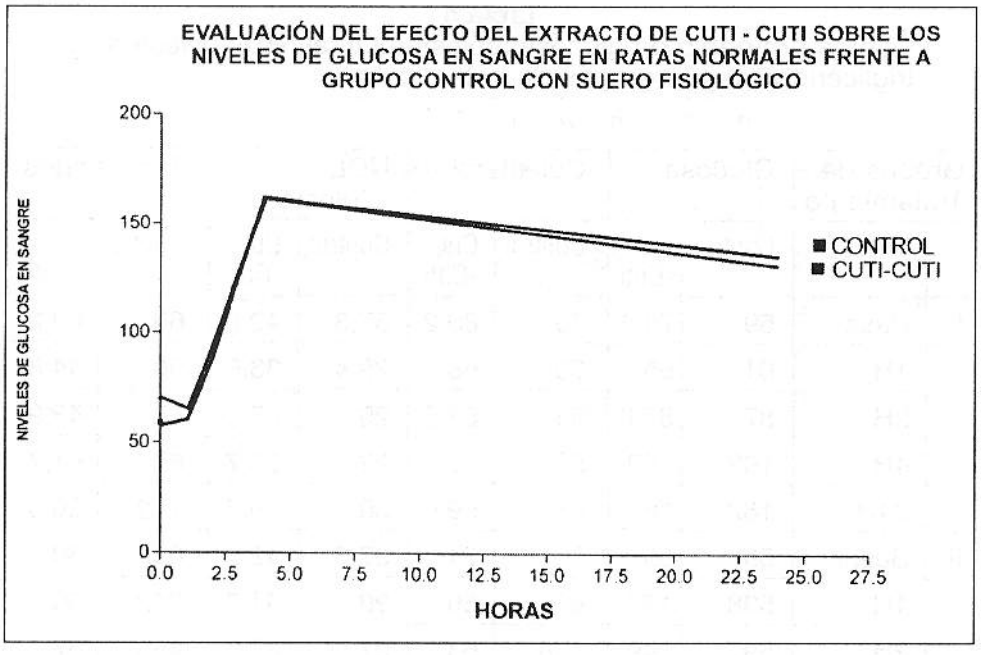

Figura 3.

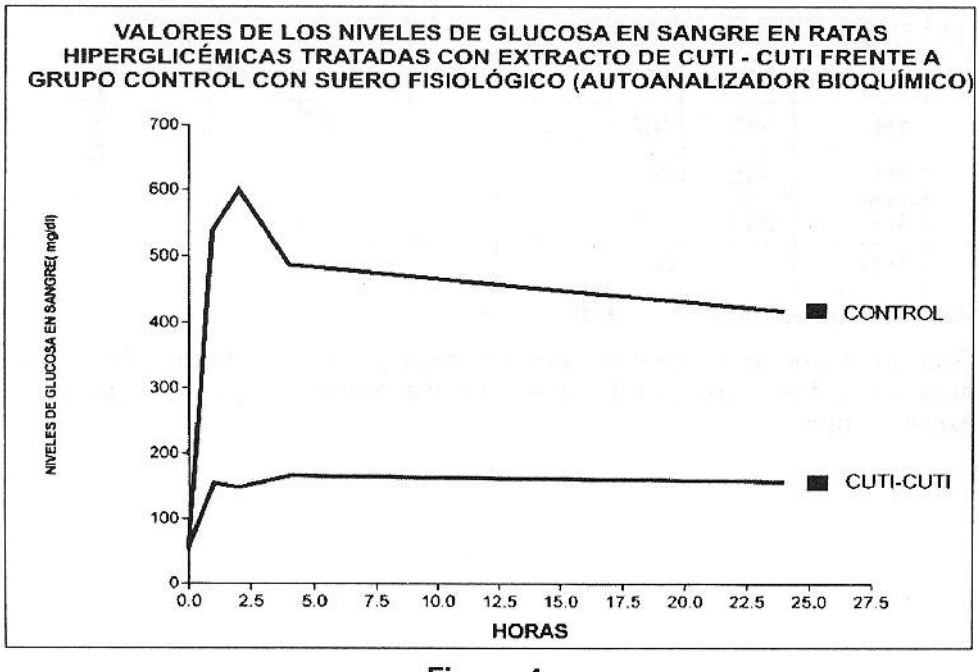

Figura 4.

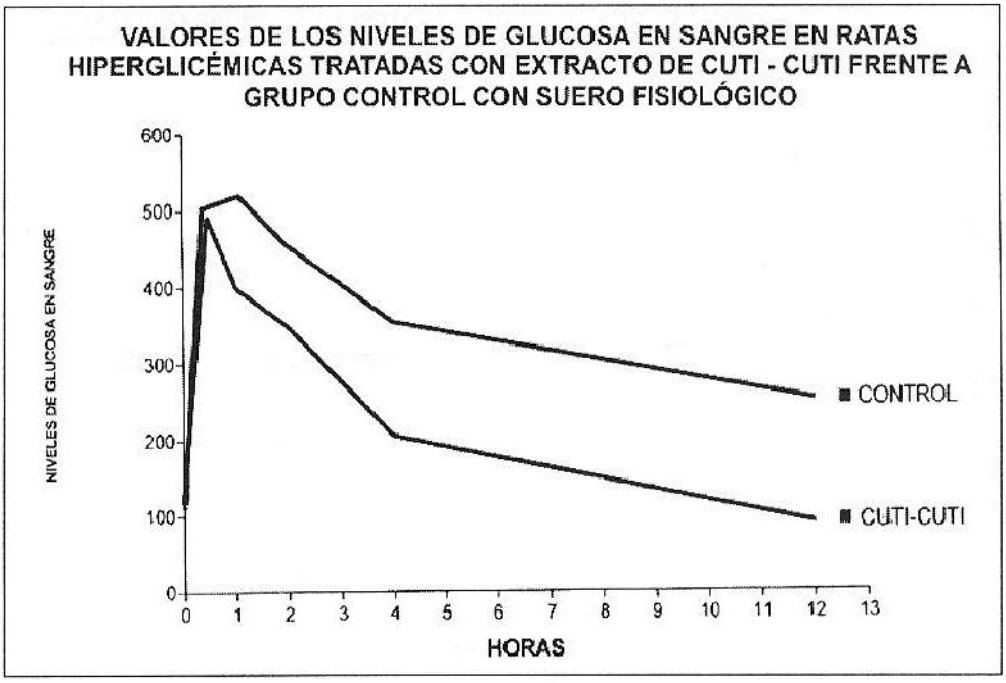

Figura 5.

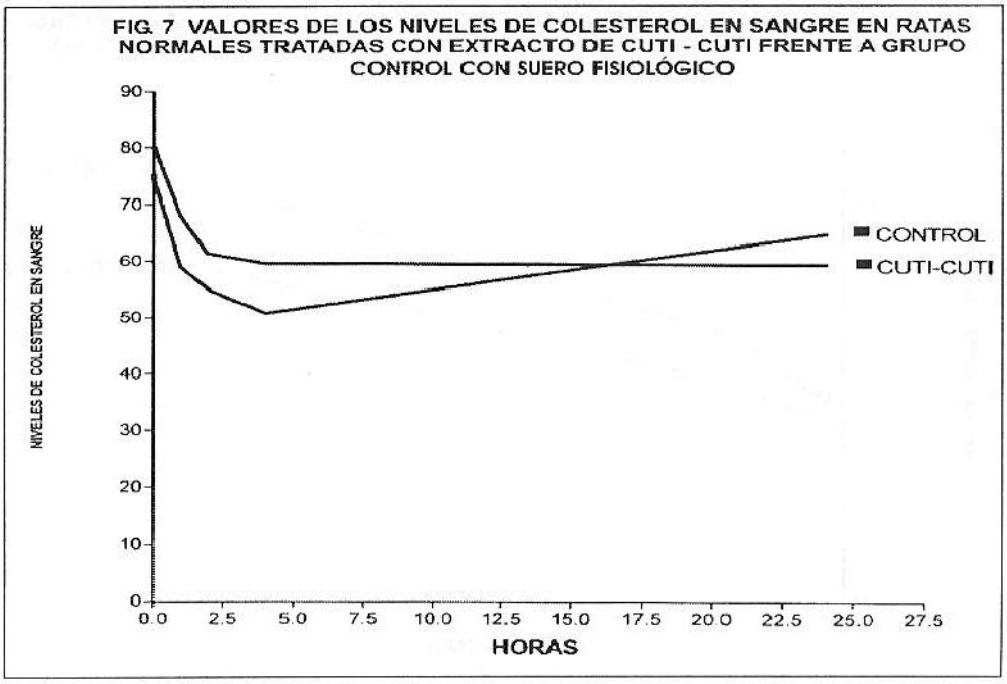

Figura 6.

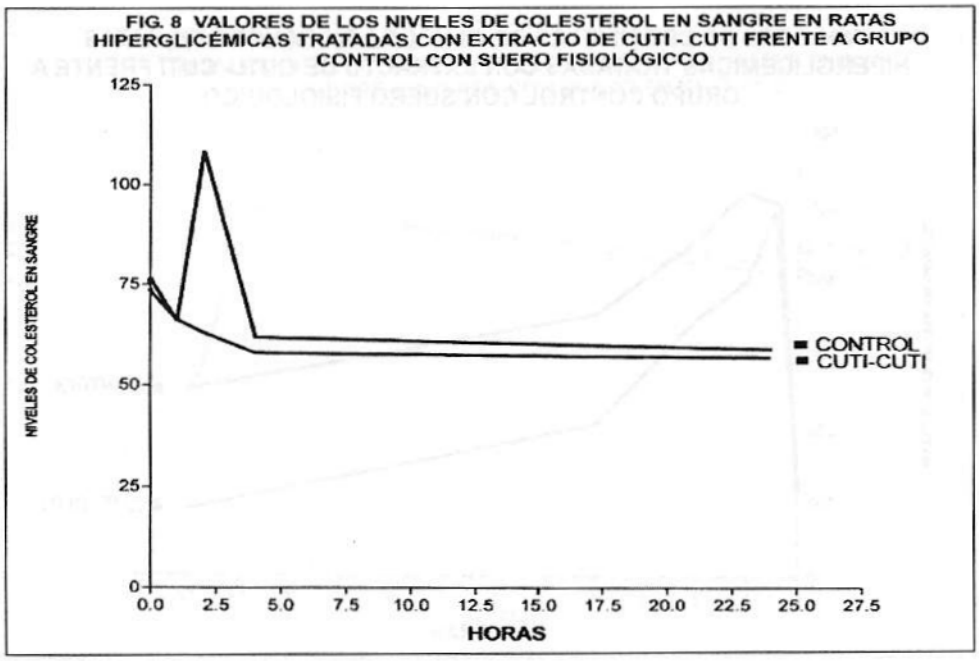

Figura 7.

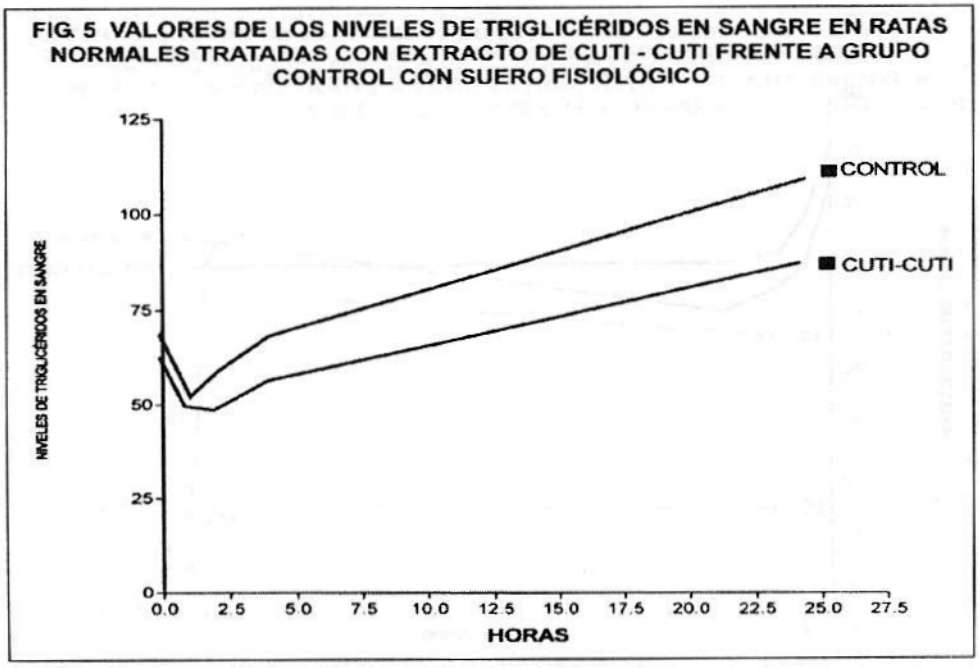

Figura 8.

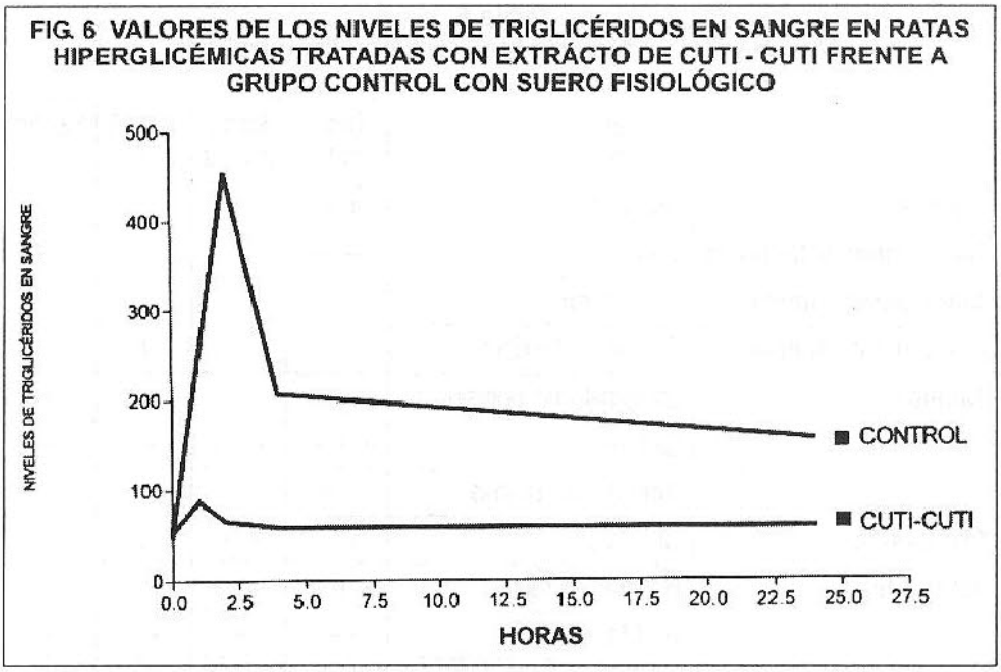

Figura 9.

De la evaluación fitoquímica

Los hallazgos del estudio fitoquímico cualitativo, de los extractos metanólicos de las tres plantas estudiadas, se presentan en la Tabla 5. Algunos de estos hallazgos se muestran también en las Figuras 10, 11, 12 y 13. Vemos que en el caso del cuti cuti, predominan los compuestos fenólicos, los alcaloides y los taninos; en la pasuchaca, predominan los compuestos fenólicos, alcaloides y esteroides; en el yacón (tubérculo), predominan los alcaloides y los glucósidos y en el yacón (hojas), predominan los alcaloides y los esteroides. Dentro del grupo de flavonoides, encontrados en el cuti cuti, aislamos Rutina y Quercetina, confirmados por TLC, HPLC e IR y un compuesto puro al que se le ha denominado CH-2 con el cual se están realizando estudios en México, para la elucidación estructural y para evaluar su actividad farmacológica.

Tabla 5.
Marcha fitoquímica de los extractos metabólicos.

Metabolito	Prueba o reacción	Cuti cuti	Pasu chaca	Yacon (T)	Yacón (H)
Lípidos	Liebermann	++	—	—	—
Coumarinas y lactonas	Balijet	——	—	—	—
Aminoácidos libres	Ninhidrina	++	—	—	—
Compuestos fenólicos	Tricloruro férrico	+++	+++	+	—
Taninos	Dicromato de potasio	++	—	+	+
	Gelatina	+++	+++	—	—
	Acetato de plomo	++		+	—
Flavonoides	Shinoda	++	++	+	—
Alcaloides	R. Dragendorff	+++	+++	++	—
	R. Mayer	++	+	—	+
	R. Popoff	+++	—	+	+++
	R. Bertrand	+++	—	+++	—
Esteroides	Liebermann	+	+++	+	+++
Azúcares reductores	Fehling	+	—	—	—
	Tollens	+	—	—	—
Oximas	Hidroxilamina	+	—	—	—
Alcoholes	Nitrato de cerio amoniacal	+	—	—	—
Glucósidos	R. Antrona	+	—	—	+
	Vainillina sulfúrica	+	—	—	—
	Molish	+	+	—	—
	Benedict	+	—	+++	—
Saponinas	Índice afrosimétrico	-	++	—	—

Presencia Leve (+), Moderada (++), Intensa (+++).

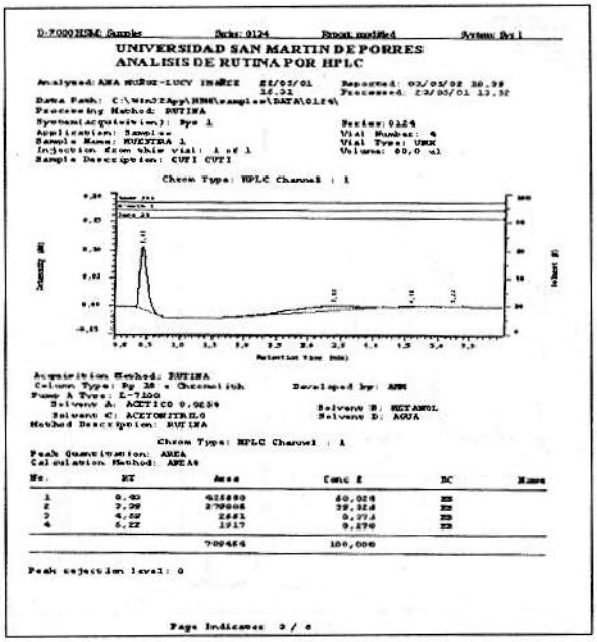

Figura 10.
Presencia de Rutina en el extracto de Cuti-Cuti por HPLC. Instituto de Investigación. FMH USMP.

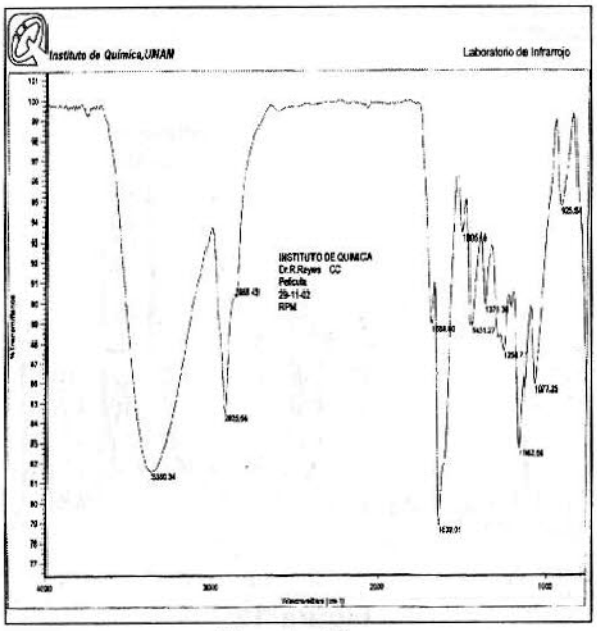

Figura 11.
Presencia de Quercetina en el extracto de cuti-cuti por IR. Instituto de Química, UNAM, México.

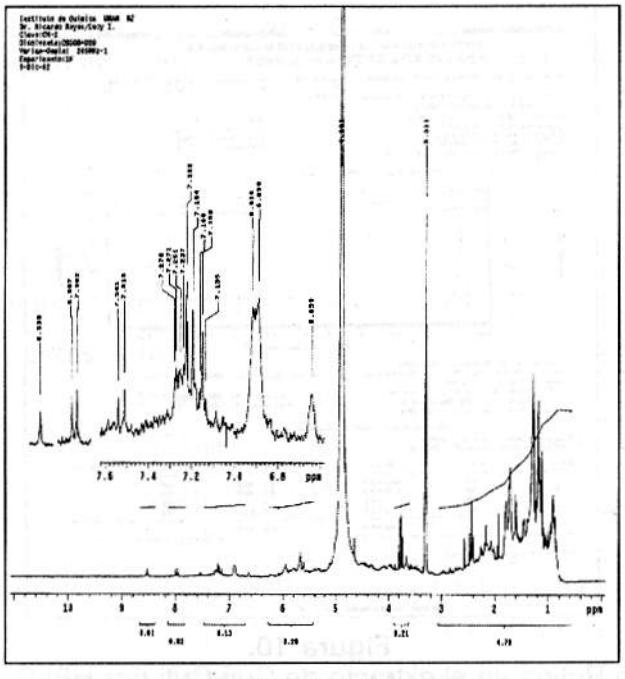

Figura 12.
Análisis de CH-2 por Resonancia Magnética Nuclear de H1, realizado en el Instituto de Química de la UNAM, México.

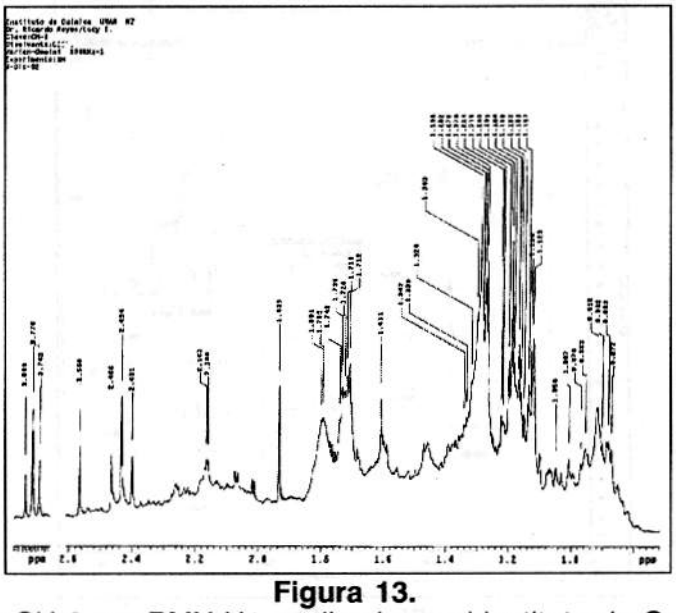

Figura 13.
Análisis de CH-2 por RMN-H1, realizado en el Instituto de Química de la UNAM, México.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el diseño experimental fue válido para establecer el efecto hipoglicemiante del extracto metanólico de *Notholaena nivea*, *Geranium lechleri* y *Smallanthus sonchofilius*, en las dosis empleadas.

La estreptozotocina es una opción como agente hiperglicemiante, pero su alto costo constituye una limitante entre nosotros (Maeda & Fernández, 1995). El Aloxano es un producto químico empleado en la inducción de hiperglicemia experimental, desde 1941 (De Mello & Luciane, 1995) siendo el que nosotros preferimos, y su mecanismo de acción diabetogénico es muy parecido al de la estreptozotocina, según Okamoto (1942). El Aloxano o sus metabolitos, interactúan con el zinc pancreático provocando una destrucción de las células beta de los Islotes de Langhergans (Maeda & Fernández, 1995). Sin embargo, otras observaciones dan sustento a la teoría de la formación de radicales de oxígeno que desempeñan una función significativa en la acción diabetógena de esta sustancia. En trabajos anteriores realizados por Fleitas y colaboradores, en 1988, se estableció un modelo de diabetes experimental en ratas, con buenos resultados, sin embargo, se puede afirmar que el tratamiento aplicado con aloxano fue efectivo para convertir a los animales en hiperglicémicos (CYTED, 1995; Fernand *et al.*, 1995; Bayley & Day, 1989; Kim & Lee, 1992; Hossen *et al.*, 2000). Según se observa en la Tabla 2, los niveles de glicemia de todos los animales para los diferentes momentos de las determinaciones, están elevados en el grupo tratado con aloxano y suero fisiológico, afirmándose que los animales mantuvieron la condición de hiperglicémicos durante este período. En las Tablas 2 y 4 se observan los valores promedios de glucosa, colesterol total, HDL colesterol y triglicéridos así como porcentajes de inhibición de hiperglicemia y triglicéridos frente al control a la 1, 2, 4 y 24 horas, respectivamente, observándose resultados estadísticamente significativos de valores de glucosa y triglicéridos.

Teniendo en cuenta que la diabetes, en el Perú, tiene una frecuencia de 3,8-4% y que es una enfermedad crónica que sólo puede ser controlada con dieta, hipoglicemiantes orales e insulina; creemos que el aporte de la presente investigación realizada en tres plantas, a las que se atribuye efecto beneficioso en el tratamiento empírico de la diabetes, resulta interesante por la posibilidad de ser usada por la población, siendo muy importante profundizar las investigaciones en los diferentes principios activos, presentes en los extractos, y que pudieran tener efectos normalizadores de la glicemia.

En la Figura 2, representamos las variaciones de la glicemia como consecuencia del efecto de las plantas estudiadas. Es importante señalar que tanto el cuti cuti, como la pasuchaca y las hojas de yacón muestran un significativo efecto hiopoglicemiante frente a la hiperglicemia inducida

por aloxano; mientras que el tubérculo del yacón, en extracto metabólico, carece de efecto hipoglicemiante.

En las Figuras 3, 4 y 5 representamos el efecto del cuti cuti sobre la glicemia. Encontramos que no modifica la glicemia post prandial; sin embargo, impide el incremento de la glicemia por efecto del aloxano (Figura 4) y reduce los niveles de glucosa sanguínea, elevados por el aloxano (Figura 5). Para dilucidar el mecanismo del efecto hipoglicemiante de las diferentes plantas estudiadas, se requiere de estudios más minuciosos, y es probable que pudieran tener mecanismos diferentes. En el caso del yacón, se sugiere que podría disminuir la absorción de glucosa desde el intestino, aunque ello no nos explicaría porqué disminuye la glicemia de las ratas hiperglicémicas, Por otro lado, autores cubanos han encontrado que la albahaca posee un efecto lipolítico, parecido a la insulina, y que es probable que favorezca la utilización de la glucosa por las células. En el caso del cuti cuti, existe la posibilidad que impida la acción del aloxano sobre las células beta del páncreas o incremente el consumo de glucosa a nivel periférico. Con posteriores investigaciones trataremos de dilucidar este planteamiento, determinando niveles de insulina en sangre, conjuntamente con un estudio histopatológico del páncreas para ver el grado de daño celular. Existe, también, la posibilidad de que el aloxano no haya dañado a todas las células beta del páncreas y que el cuti cuti estimule la liberación de insulina a partir de las células beta que no hayan sido afectadas por el aloxano.

Evidentemente, el cuti cuti no sólo modifica el metabolismo de la glucosa, sino que, además, reduce los niveles de colesterol y triglicéridos e impide su alteración por el aloxano.

Creemos que el aporte de la presente investigación, especialmente con *Notholaena nivea*, resulta interesante en el sentido de poder sugerir su uso por la población diabética, toda vez que tiende a modificar los parámetros alterados por esta enfermedad crónica, de alta incidencia nacional y mundial. Igualmente, creemos importante profundizar las investigaciones, no sólo para dilucidar los posibles mecanismos de acción, sino, además, para determinar los principios activos presentes en el extracto, responsables de los efectos mencionados.

Asimismo, según la OPS (1991) y OMS (1993), las muertes por problemas cardiovasculares en el Perú representan el 15,1%. La Asociación Americana de Corazón y su programa nacional de educación como tratamiento para la hipercolesterolemia, recomiendan la reducción del sobrepeso corporal, un consumo de grasa en la dieta menor al 30% de las calorías totales y un colesterol menor de 300 mg/día en la alimentación (DHHS, 1988). Sin embargo, estas dietas disminuyen el colesterol plasmático en un 5-7%, evidenciándose que existen muchos fármacos capaces de disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, pero a las dosis que ejercen un buen efecto farmacológico, presentan

efectos secundarios adversos, por ello Cuti-Cuti, pasuchaca y yacón, se presentan como una buena alternativa para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, con baja toxicidad, como demostramos con la determinación de la DL50 cuyo valor permite que, según los criterios de Williams, la planta puede ser considerada como *prácticamente atóxica*. Lo que nos lleva a sostener que el cuti cuti puede constituir una parte importantísima del arsenal terapéutico de la diabetes mellitus.

CONCLUSIONES

1. La *Notholaena nivea*, cuti-cuti, el *Geranium lechleri*, pasuchaca y el *Smallanthus sonchifolius*, yacón, redujeron los niveles de glucosa, alterados por el aloxano.
2. El extracto metanólico de *Notholaena nivea* mostró un buen efecto hipoglicemiante y reductor de los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos; además, previno la hiperglicemia inducida por aloxano.
3. En la evaluación fitoquímica de los extractos metanólicos de las tres plantas, predominan los alcaloides, compuestos fenólicos y esteroides. En el cuti cuti, se detectó la presencia de Rutina y Quercetina.
4. De *Notholaena nivea* se aisló un principio activo, el CH-2, con el cual se siguen realizando investigaciones para elucidar su estructura química por medio de técnicas especiales y evaluar su actividad farmacológica.

AGRADECIMIENTO.

Expresamos nuestro reconocimiento y agradecimiento al Dr. Ricardo Reyes Chilpa de la Universidad Autónoma de México por el apoyo prestado para realizar los análisis de IR, RMNH1; a la Msc. Anamaría Muñoz y al Tec. M. Edwin Zarzosa Norabuena, por los análisis bioquímicos realizados, y a los alumnos del tercer año de estudios que colaboraron en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apumayta, U.; Jurupe, H.; Mateo, A. *et al.* (2000). Estudio fitofarmacològico (hipoglicemiante) y de toxicidad del extracto de *Geranium ayavacense* Hill (Pasuchaca) en animales de experimentación. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Congreso FITO 2000.

Asociación Latinoamericana de Diabetes. (2000). *Guías ALAD 2000 para el control, diagnóstico y manejo de Diabetes Mellitus Tipo 2 con medida basada en evidencias*.

Bayley, C. J. & Day, C. (1989). Tradicional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care, 12*, 553-561.

Cáceres. M.L.; Ibáñez, V. L. *et al*. (2002). Estudio comparativo de *Geranium lechleri* «Pasuchaca» y *Notholaena nivea* «Cuti-Cuti» en ratas diabéticas. Facultad de Medicina. USMP. *Resúmenes del IV Congreso Mundial de Medicina Tradicional Andina*. Lima- Perú, pág 34.

Ciulei, I. (1982) *Metodología D'Analyse des Produit Vegetaux*. Mimeografadoi Bucarest: Facultade de Farmacia de Bucareste.

Cody. V.; Meddleton, E.; Harborne, J. & Beretz, A. (1987) *Plant flavonoids in biology and medicine II*. Nueva York: Alan R. Liss, Inc.

Comission of the European Communities. (1992). Annex to Comission Directive 92/69/EEC of 31 July 1992 adapting to technical progress for the seventheenth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. B. 1 Acute toxicity (oral). *Off. J. Eur. Comm.; L 383 A) 35*: 110-2.

Corbin Winslow, L. & Kroll, D. (1998). Herbs as medicines. *Arch. Intern. Med., 158*, 9.

CYTED. (1995). *Manual de técnicas de investigación*. Colombia.

CYTED. (2000) *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia.

De la Cruz, J.; Moreno, A.; Muñoz, M.; García Campos, J. & Sánchez De La Cuesta, F. (1997). Effect of Aspirin plus Dipyridamole on the retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280, 454-459.

De Mello, M. & Luciane, E. (1995). Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan induced diabetes. *Med. Biol. Res., 28*(4), 467-70.

Department of Health and Human Services. (1988). *The surgeon general report nutrition and health*. Washington DC: Government Printing Office. DHHS publication (PHS), 88-50210.

Duke, J. A . (2000) *CRC Handbook of medicinal herbs*. Library of Congress Cataloging in Publication Data.

Fernand, N.; Astesano, A.; Phan, H. H.; Lelong, C. & Rosselin, G. (1995). Dynamic of pancreatic cell growth and differentiation during diabetes reversion in ST2-treated newborn rats. *Am. J. Physiol., 28*, 269-72.

Hossen, A.; Pereyra, V. & Bustamente, Z. (2000) *Evaluación in vivo de la actividad hipoglicemiante de plantas de los valles altos y bajos de Cochabamba*. Cochabamba, Bolivia: Universidad Nacional Mayor de San Simón. Facultad de Farmacia y Bioquímica de Cochabamba.

Ibáñez, V. L. (2002) Importancia de la investigación en plantas medicinales. *Folium*, Año XII, Nº34. México: Instituto de Química, UNAM.

Ishibashi, F. (1981). Alloxan action on glucose metabolism in cultured fibroblast:2. Effects on pentose-mono phosphate shunt and tricarboxilic acid pathways. *Am. J. Physiol., 240*(6), E 645-E648.

Islam. M.; Zacaria, M.; Radhkrisnan, R.; Ismael, A.; Liu, X.; Chan, K. *et al.* (1999). Preliminary studies on the antidiabetic effect of *Teucrium stocksianum* Boiss (Fam Labiatae) in streptozotocin diabetic mice. *J. Pharm. Pharmacol., 51,* (suppl): 342.

Kim, O. K. & Lee, E. B. (1992). The screening of plants for hypoglycemic. Action in normal and alloxan-induced hiperglycemic rats. *Korean J. Pharmacog. 23*(2), 117-9.

Maeda, C. & Fernández, T. (1995). Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflexs insitivity in rats. *J. Med. Biol. Res., 28*(4), 497-501.

Ministerio de Salud Pública de Cuba (1993). *Regulaciones metodológicas para la evaluación preclínica de medicamentos.* La Habana: Editorial Ciencias Médicas.

Okamoto, K. T. (1942). Diabetes experimental. *Sec. Pathol. Ispan. 32*, 99-105.

Sharma, S.; Dwivedi, S.; & Swarup, D. (1997). Hypoglycemic, antihiperglycemic and hypolipodemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. *J. Ethnopharmacol*. 39-44.

Talla, O.; Villegas, L. & Fernández, I. (2000) Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de *Geranium ayavacense* en ratas tratadas con Streptozotocin. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Ciencias y Filosofía. Congreso FITO 2000.

Valdivia, F. & Hidalgo, M. (1996). Uso de medicina tradicional en Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente. *Anales de la Facultad de Medicina*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.