

SEGURO SOCIAL DE SALUD – ESSALUD



CONCURSO:

“PREMIO KAELIN”

TITULO DE LA INVESTIGACIÓN:

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Tabebuia obscura* (tahuari negro) Y *Geranium ayavacense* (pasuchaca)
SOBRE LA GLICEMIA EN RATAS CON DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

SEUDÓNIMO: ANUNNAKI

FECHA DE REALIZACIÓN DE TRABAJO: DE ENERO 2013 A MAYO 2013

LUGAR Y FECHA DE PRESENTACIÓN:

LIMA, 31 DE MAYO 2013

i. INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	01
RESUMEN	03
CAPITULO I	
Planteamiento del problema	05
A. Problemática	05
B. Delimitación de la investigación	06
C. Justificación	06
D. Limitaciones	07
E. Objetivos	07
CAPITULO II	
Fundamentación teórica	08
CAPITULO III	
A. Hipótesis y variables	14
B. Diagrama de variables	14
C. Definición operacional de variables	14
D. Indicadores de las variables	14

CAPITULO IV

A. Metodología de la investigación	15
B. Tipo de investigación	15
C. Población y muestra	15
D. Materiales y métodos	15
E. Técnicas en la recolección de información	21
F. Resultados	22
G. Discusión de resultados	24
H. Conclusiones	27
I. Recomendaciones	27
Anexos	29
Bibliografía	44

ii. LA INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas medicinales como recurso para solucionar problemas de salud se conoce desde tiempos remotos y aún en la actualidad las plantas son una fuente importante de medicamentos, lo que justifica ampliamente la investigación en esta área. La medicina tradicional es usada globalmente y ha crecido rápidamente su importancia económica. En los países en desarrollo, la medicina tradicional es a menudo el único tratamiento accesible y asequible disponible. En Latinoamérica, la oficina regional de la OMS para las Américas (AMRO/PAHO) reportó que el 71% de la población en Chile y 40% de la población en Colombia han usado medicina tradicional (1)

La medicina tradicional está también ganando más y más respeto por los gobiernos nacionales y los proveedores de la salud, un ejemplo en el Perú es la labor que realiza el Programa Nacional de Medicina Complementaria en el Seguro Social de Salud- EsSalud. El Programa Nacional de Medicina Complementaria- EsSalud y la Organización Panamericana de Salud- OPS, realizaron el estudio de costo/efectividad de la medicina complementaria versus la medicina convencional, obteniendo una ventaja comparativa a esta entre 50 a 60%. El estudio se realizó en Centros asistenciales que operan dentro del sistema de la seguridad social peruana (EsSalud)(2)

La OMS tiene listado 21,000 plantas, las cuales son usadas para propósitos medicinales alrededor del mundo(3). En el Perú, se realizó un estudio para determinar el uso de la medicina tradicional en los pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente (denominada actualmente diabetes mellitus tipo 2), en el Servicio de Endocrinología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGHI); se realizó una encuesta en 102 pacientes atendidos en el consultorio externo del Servicio de Endocrinología, reportándose que el 68.6 % de los pacientes utilizaron alguna medicina tradicional(plantas medicinales). De estos pacientes, el 73 % utilizó 2 o más productos y el 60 % refirió efecto favorable (4).

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica, caracterizada por altos índices de glucosa en la sangre (hiperglicemia) y asociada a una deficiencia absoluta o relativa en la secreción o acción de la insulina.

Hay tres formas principales de diabetes: la diabetes tipo 1, la de tipo 2 y la diabetes gestacional. La diabetes tipo 2 es la más común; representa aproximadamente entre el 85 y 90 % de los casos, y se relaciona con factores de riesgo modificables como la obesidad o el sobrepeso, la inactividad física y los regímenes alimentarios hipercalóricos y de bajo valor nutritivo (5). En la actualidad esta patología constituye un problema de salud pública serio, común, creciente y costoso; ya que afecta a 194 millones de personas alrededor del mundo y para el año 2025, se calcula serán 333 millones las personas que desarrollarán diabetes según estadísticas de la OMS (6).

Para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, se usan las siguientes clases de hipoglicemiantes orales: biguanidas, sulfonilureas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de la alfa-glucosidasa (7). En los últimos años se están evaluando diversos tratamientos, desde combinación de dieta, educación, ejercicio físico, inmunoterapia hasta transplantes pancreáticos; pero la investigación está principalmente orientada a obtener nuevas drogas hipoglicemiantes (8). Ante esta situación, cabe señalar que las plantas medicinales con potencial actividad antidiabética, pueden ser una fuente importante de nuevos compuestos orales hipoglicemiantes, para lo cual es importante demostrar científicamente la efectividad y seguridad de estas plantas, empezando por estudios experimentales en animales.

En ese contexto, en el presente estudio, se evaluó la actividad hipoglicemiante de una de las plantas comunmente usadas en la sierra y costa, llamada Pasuchaca (*Geranium ayavacense*) y de una las plantas comunmente usadas en la selva peruana, llamada Tahuari negro (*Tabebuia obscura*). Se evaluó la dosis de uso tradicional para ambas plantas, para ello se adecuó estas dosis al peso de los animales con diabetes experimental.

iii. RESUMEN

Objetivo: Establecer el efecto de los extractos de *Tabebuia obscura* (tahuari negro) y *Geranium ayavacense* (pasuchaca) sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental.

Diseño: Experimental.

Unidades experimentales: Ratas machos albinas cepa Holtzmann del Bioterio del Instituto de Medicina Tradicional- IMET-Hospital III- Iquitos- EsSalud. Las ratas que ingresaron al estudio cumplieron con los siguientes criterios: presentar una glicemia > 200 mg/dl post-administración de aloxano y tener un peso > 200 gramos. De las ratas evaluadas 60 completaron el estudio.

Intervención: La diabetes experimental fue inducida con aloxano. Las 60 ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos (del I al VI) de 10 ratas cada uno. Grupo I recibió 3 ml de agua destilada, grupo II recibió glibenclamida 10 mg/kg, grupo III recibió *Geranium ayavacense* 6.3 mg/kg, grupo IV recibió *Geranium ayavacense* 12.7 mg/kg, grupo V recibió *Tabebuia obscura* 100 mg/kg, grupo VI recibió *Tabebuia obscura* 200 mg/kg. Se determinó el valor basal de glicemia, y el resto de controles de glicemia se realizaron a la 1, 3, 6, 12 y 24 horas, después de administrar las diferentes intervenciones.

Principales medidas de resultados: Glicemia

Análisis estadísticos: Se aplicó la prueba ANOVA de una sola vía y comparaciones múltiples de Games – Howell, entre los 6 grupos. Se comparó los promedios de glicemias entre los grupos a la 1, 3, 6, 12 y 24 horas.

Resultados: El grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg disminuyó significativamente la glicemia a la 6^{ta} ($p < 0.05$), 12^{ava} ($p < 0.01$) y 24^{ava} ($p < 0.01$) hora después de administrar el extracto, cuando se compara con el placebo. No hubo diferencia significativa entre el grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg y el grupo de la glibenclamida. El grupo de *Tabebuia* disminuyó su glicemia en 18.15 %, 34.27 % y 50.31% , a la 6^{ta}, 12^{ava} y 24^{ava} hora respectivamente; mientras que el grupo de la glibenclamida disminuyó su glicemia en 3.5 %,

24.05 % y 52.17 % , a la 6 ta, 12 ava y 24 ava hora respectivamente. El grupo de *Geranium ayavacense* 12.7 mg/kg disminuyó significativamente la glicemia ($p < 0.01$) solo a la 24 ava hora de administrar el extracto, cuando se compara con el placebo.

Conclusiones: El extracto de *Tabebuia obscura* a la dosis de 100 mg/kg tiene buen efecto hipoglicemiante equiparable a la glibenclamida.

Palabras clave: diabetes mellitus experimental, aloxano, plantas medicinales, extractos vegetales, glicemia (fuente: DeCS BIREME). *Tabebuia obscura*, *Geranium ayavacense* (palabras claves del autor).

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. PROBLEMÁTICA

La diabetes mellitus es un problema de salud pública creciente y costoso. El número de personas con diabetes en las Américas se calculó en 62,8 millones en el 2011, y se espera que alcance los 91,1 millones en 2030, por otro lado el costo de la atención de salud de las personas afectadas por la diabetes es entre dos a tres veces mayor que en las personas sin diabetes.(9). En el Perú, constituye una enfermedad muy prevalente (7.2 %), siendo Piura el departamento de más alta incidencia; el grupo etáreo más afectado es el de 65 años a más, con un incremento considerable en personas entre 20 y 49 años de edad (10 ,11). A nivel nacional en EsSalud, la diabetes mellitus ocupa el séptimo lugar en el listado de principales daños por carga de enfermedad y ocupa el mismo lugar en el listado de prioridades sanitarias programáticas, EsSalud 2012-2016 (12).

El control de la glicemia en la diabetes tipo 2 se deteriora progresivamente en el tiempo y después del fracaso de la dieta y los ejercicios, se necesita una nueva intervención con fármacos hipoglicemiantes cada 3 a 4 años, para obtener un control adecuado de la glicemia. Eventualmente, con las actuales combinaciones terapéuticas y/o el tratamiento con insulina, un importante grupo de pacientes no se encuentra adecuadamente controlado(13). Adicionalmente, tenemos el problema de efectos adversos serios de algunos medicamentos hipoglicemiantes, en el 2006 y 2007 se reportó que las glitazonas no solo incrementaron el riesgo de insuficiencia cardíaca, sino también de infarto de miocardio y el riesgo de fracturas óseas en mujeres (14). También hay estudios clínicos que han demostrado que los análogos de la insulina, especialmente la insulina glargina, incrementa el riesgo de cáncer de mama (15).

Según un estudio realizado en un importante Hospital de EsSalud, cerca del 70 % de pacientes con diabetes tipo 2 , que pasaron consulta por el servicio de Endocrinología del HNGAI, utilizaron alguna planta de uso tradicional para tratar su diabetes (4); sin embargo muchas de estas plantas tienen escasos o ninguna investigación científica sobre su seguridad y eficacia. Realmente pocas de ellas han

sido estudiadas respetando métodos científicos válidos y atendiendo a las normas éticas establecidas, aunque el uso popular es un parámetro importante, esto no garantiza la actividad terapéutica.

Sabemos que esta situación problemática tiene varias aristas, desde la educación de estilos de vida saludable, la política de salud hasta el laboratorio de experimentación; en esta última área el Instituto de Medicina Tradicional- IMET viene realizando un tamizaje de 50 plantas de la costa, sierra y selva del Perú para evaluar su posible actividad hipoglicemiante en animales de experimentación. Esta información proveería una fuente importante de nuevos compuestos orales hipoglicemiantes. En esta oportunidad presentamos la evaluación de dos especies según sus dosis de uso tradicional, para lo cual planteamos el siguiente problema:

¿Tiene el extracto de *Tabebuia obscura* (tahuari negro) y el *Geranium ayavacense* (pasuchaca) efecto sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental?

B. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

Respetando los pasos de la ciencia, la experimentación animal debe preceder a la evaluación de la planta medicinal en la especie humana. En ese contexto decidimos tener como unidades experimentales a ratas sometidas a un modelo experimental que se aproxime a la enfermedad denominada diabetes mellitus, considerando que esta enfermedad se caracteriza por la hiperglicemia. Es así que a un grupo de ratas del Bioterio del IMET-EsSalud se les indujo la diabetes experimental administrando aloxano. Las ratas que ingresaron al estudio cumplieron con los siguientes criterios: sexo macho, presentar una glicemia > 200 mg/dl post-administración de aloxano y tener un peso > 200 gramos.

C. JUSTIFICACIÓN.

Con lo expuesto en la problemática, están justificadas las investigaciones con plantas de uso en medicina tradicional como potencial fuente de nuevos fármacos hipoglicemiantes, ya sea como tratamiento de primer nivel, o como tratamiento complementario a las terapias existentes para los pacientes asegurados con diabetes mellitus tipo 2.

D. LIMITACIONES.

Cuando se realiza un estudio experimental con animales, la subjetividad que suele estar presente en personas de un estudio, es grandemente superado. Lo ideal hubiera sido tener como unidades experimentales a animales con diabetes mellitus genéticamente manipulados. Evaluar la actividad hipoglicemiante en ratas con diabetes experimental por un tiempo más prolongado, dado que la diabetes es una enfermedad crónica.

E. OBJETIVOS.**Objetivo General:**

Establecer el efecto de los extractos de *Tabebuia obscura* (tahuari negro) y *Geranium ayavacense* (pasuchaca) sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental.

Objetivo Específicos:

Determinar si el extracto de *Tabebuia obscura* a la dosis de 100 mg/kg disminuye la glicemia a la 1, 3, 6, 12, y 24 horas post-administración, en ratas con diabetes mellitus experimental.

Determinar si el extracto de *Tabebuia obscura* a la dosis de 200 mg/kg disminuye la glicemia a la 1, 3, 6, 12, y 24 horas post-administración, en ratas con diabetes mellitus experimental.

Determinar si el extracto de *Geranium ayavacense* a la dosis de 6.3 mg/kg disminuye la glicemia a la 1, 3, 6, 12, y 24 horas post-administración, en ratas con diabetes mellitus experimental.

Determinar si el extracto de *Geranium ayavacense* a la dosis de 12.7 mg/kg disminuye la glicemia a la 1, 3, 6, 12, y 24 horas post-administración, en ratas con diabetes mellitus experimental.

CAPITULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

El término diabetes mellitus describe un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglicemia crónica con disturbios en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas y que resulta de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. Para el diagnóstico de la diabetes mellitus se puede usar cualquiera de los siguientes criterios: a) Síntomas de diabetes más una glicemia casual medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 200 mg/dl; los síntomas clásicos de diabetes incluyen: poliurea, polidipsia y pérdida inexplicable de peso, b) Glicemia en ayunas medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 126 mg/dl, c) Glicemia medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 200 mg/dl dos horas después de una carga de glucosa durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (7).

La carga que representa la diabetes para las personas y la sociedad se relaciona principalmente con un aumento de la discapacidad y la mortalidad prematura causada por las complicaciones de esta enfermedad. En un estudio clínico realizado en seis países latinoamericanos se halló que, la frecuencia de complicaciones crónicas en personas que han padecido diabetes durante más de 20 años son del 48% para las retinopatías, 6.7% para la ceguera, 42% para las neuropatías, 1.55 para el daño renal, 6.7% para el infarto de miocardio, 3.3% para los accidentes cerebro vasculares y 7.3% para las amputaciones de los miembros inferiores (5).

El tratamiento no farmacológico y en particular la reducción de peso en el obeso, sigue siendo el único tratamiento integral capaz de controlar simultáneamente la mayoría de los problemas metabólicos de la persona con diabetes mellitus 2, incluyendo la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia y la hipertensión arterial. Se pueden lograr cambios significativos con una reducción de un 5 a 10% del peso y por consiguiente éste debe ser siempre uno de los primeros objetivos del manejo de la diabetes en el paciente con sobrepeso. El tratamiento no farmacológico comprende tres aspectos básicos: plan de alimentación, ejercicio físico y hábitos saludables (7).

Con respecto al tratamiento farmacológico, se recomienda iniciar con antidiabéticos orales en toda persona con diabetes tipo 2 que no haya logrado alcanzar las metas de control glicémico después de un período de 3

a 6 meses con cambios terapéuticos en el estilo de vida. Para seleccionar un antidiabético oral se debe tener en cuenta las características del medicamento así como la condición clínica del paciente. Esta es la lista de antidiabéticos orales disponibles en Latinoamérica: : biguanidas, sulfonilureas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de la alfa-glucosidasa. Cuando la persona tenga una glicemia igual o mayor de 270 mg/kg y además presenta cetonuria o se encuentra clinicamnte inestable, se recomienda iniciar tratamiento con insulina (7)

A pesar de disponer de guías para el manejo de esta enfermedad, en lo preventivo y recuperativo, y a pesar del desarrollo de nuevos fármacos los datos epidemiológicos globales muestran que la diabetes mellitus sigue en aumento, he aquí los datos: Publicado el 2000, en la edición inicial de el Atlas de Diabetes estimó la prevalencia global de diabetes en 4.6%, representando a 151 millones de personas, y se proyectó un incremento a 333 millones de personas para el 2025. Sobre la base de la más reciente evidencia, el Atlas de Diabetes actual ha revisado esta situación y estima una prevalencia global de 6.6% (285 millones de personas) en el 2010, y proyecta que para el 2030, el número de personas con diabetes ascenderá a 438 millones o 7.8% de la población mundial(16)

Dada esta situación, es evidente que hay que insistir en lo preventivo, a través de los cambios de estilos de vida pero considerando programas educativos de mayor eficacia. Por otro lado y desde nuestra área de investigación esperamos contribuir en algo a la solución de este problema de salud pública. Para ello nuestro objetivo es validar el efecto hipoglicemiante de plantas medicinales peruanas de uso tradicional en la diabetes, ya que constituirían una fuente potencial para futuros fármacos hipoglicemiantes. En ese contexto, se ha publicado últimamente un estudio sobre el conocimiento tradicional de plantas usadas para el tratamiento de la diabetes en el norte del Perú(1)

Con respecto a los grupos de compuestos y estructuras químicas de moléculas promisorias como fármacos antidiabéticos, ha sido publicado ampliamente por Shapiro (17), Li (18) y Jung (19). A nivel mundial, el efecto hipoglicemiante de algunas plantas usadas como remedios antidiabéticos ha sido confirmado en modelos experimentales con animales, pero los mecanismos de este efecto están siendo estudiados. En nuestro país,

se ha confirmado el efecto hipoglicemiante de algunas plantas usando como modelo a ratas con diabetes mellitus experimental inducida por aloxano (20,21) o estreptozotocina (22,23)

Ante lo expuesto y considerando que nuestro país tiene una amplia cultura en el uso tradicional de plantas medicinales, dirigimos nuestra atención en dos especies vegetales: *Tabebuia obscura* (tahuari negro) y *Geranium ayavacense* (pasuchaca). A continuación se presenta la información publicada sobre ambas especies a nivel botánico, uso tradicional, químico, toxicológico y actividades biológicas.

Tahuari negro

Nomenclatura: Especie botánica: *Tabebuia obscura*. Familia: Bignoniaceae (24)

Descripción botánica:

Árbol de fuste ligeramente aplanado y recto, la copa es heterogénea y poco amplia. La raíz es de forma ramificada. La corteza presenta un color gris parduzco, rugosa áspera y fisurada la parte interna de la corteza es de textura laminada, flexible de color crema amarillento, ligeramente dulce. Las hojas son digitadas, compuestas, sin estipulas, decusadas y pentameras, cuyo haz de los folíolos tienen apariencia rugosa siendo el central mucho más desarrollado (29 cm x 18 cm) que los basales (16 cm x 10 cm). Las flores presentan un color amarillo, inflorescencia terminal, escorpioide y gamopétala. El fruto es dehiscente. (Comunicación personal de Ing. Juan Celidonio Ruiz Macedo- Curador del Herbarium Amazonense - AMAZ)

Uso tradicional:

No hay reportes específicos sobre el uso tradicional del *Tabebuia obscura*, pero si hay reportes del uso etnomédico del *Tabebuia impetiginosa* para : diabetes, fiebre, leishmaniasis, infecciones del tracto urinario, diarrea, gonorrea, alergias, artritis, cancer, anemia, antiinflamatorio, entre otros usos (25). También, se reporta el uso etnomédico del *Tabebuia serratifolia* para diabetes y recomiendan prepararlo en cocimiento: 25 g de corteza por litro de agua, tomarlo vía oral como agua de tiempo (26).

Composición química:

En un tamizaje fitoquímico de la *Tabebuia obscura* se halló en la fase acuosa: alcaloides, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, mucilagos, glicósidos y principios amargos y astringentes(27), también hay reportes sobre la *Tabebuia impetiginosa*, la cual tiene gran cantidad de quinoides (antraquinonas, furanonaftoquinona, lapachones y naftoquinonas) y pequeña cantidad de benzenoides y flavonoides(25). Otra especie, la *Tabebuia serratifolia* contiene: alcaloides, catequinas, esteroides, fenoles, flavonas, flavonoles, flavononas, heterósidos cianogénicos, resinas, saponinas, triterpenos, xantonas(26)

Toxicología:

Se ha publicado estudios de toxicidad de otras especies como la *tabebuia impetiginosa*: no se ha reportado toxicidad en humanos cuando se usa la decocción de la corteza o en tintura. La DL 50 para el lapachol es de 1.2 – 2.4 g/kg en ratas y 487 – 621 mg/kg en ratones. Signos de toxicidad en humanos(vómitos, diarrea) fueron reportados con dosis orales de 1500 mg/día de lapachol puro(25).

Actividades biológicas:

Con respecto a la *Tabebuia impetiginosa* se ha reportado actividades como anti-tumoral y antileucémico; compuestos químicos de esta especie demostraron una fuerte actividad in vitro contra bacterias y hongos(25).

Pasuchaca

Nomenclatura: Especie botánica: *Geranium ayavacense Willd.* Familia: Geraniaceae(28)

Descripción botánica:

Hierbas perennes de raíces delgadas o demasiado ramificadas, que están unidas a las hojas basales y numerosas ramificaciones ascendentes difusamente geniculadas. Tallos procumbentes, de varios decímetros de longitud; entrenudos de aproximadamente 15 cm de longitud, filosos, puberulentos. Hojas con muy fino indumento, orbiculares, palmadamente 7-partidas, generalmente hacia la base, lóbulos irregulares, bi o triaciniados; las secciones laterales iguales en longitud, lineales, submucronados; hojas caulinares

cortamente pecioladas con estípulas triangular- lanceoladas. Flores solitarias, axilares de 3-10 mm de longitud, pubescente. Sépalos ovados-oblongos, ligeramente acuminados, puberulentos y largamente ciliados. Pétalos obovados, blanquesinos; 5 estambres. Fruto esquizocárpico de hasta 18 mm de longitud (28).

Uso tradicional:

Específicamente para esta especie se ha reportado que la flor y raíz, tienen efecto como hipoglicemiante y astringente, así también es útil en el tratamiento de estomatitis ulcerosa, gastritis, gingivitis y lesiones gástricas(29). Para su uso en pacientes diabéticos se recomienda: 3 g de la planta total en 1 litro de agua, cocimiento por 10 minutos y tomar 3 veces al día(30). Otras especies como el *Geranium lechleri*, *Geranium sessiliflorum*(28) y *Geranium dielsiaum* (31), son usadas en la medicina tradicional como antidiabético.

Composición química:

En esta especie se ha determinado la presencia de: taninos, esteroides, flavonoides, antocianinas, antracenos, compuestos reductores, celulosa y almidón (29). El tamizaje fitoquímico de esta especie determinó en la fase acuosa la presencia de: alcaloides, azúcares reductoras, saponinas, fenoles, taninos, mucílagos y principios amargos y astringentes (27). Con respecto al *Geranium lechleri*, se ha reportado la presencia de alcaloides y según este estudio los alcaloides constituyen los principios activos responsables del efecto hipoglicemiante(21).

Toxicología:

Datos específicos sobre la toxicidad de esta especie no se han reportado, pero si se dispone de información sobre la toxicidad aguda del *Geranium lechleri*: según los criterios de Williams, se ubica dentro de las plantas ligeramente tóxicas, siendo la DL50 del atomizado de 3367.69 mg/kg; mientras que la DL50 de los alcaloides extraídos de esta especie fue de 1160.65 mg/kg(21)

Actividades biológicas:

Se realizó un estudio sobre la actividad hipoglicemiante del *Geranium ayavacense* en ratones machos en los cuales se ensayó extracto etanólico a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg administrados via oral. Se comparó con la glibenclamida, concluyendo que las dosis de 250 y 500 mg reducen la glicemia experimental en 25.35% y 64.62% a las 3 y 2 horas respectivamente. En otro estudio, se concluye que el extracto liofilizado de *Geranium ayavacense* a dosis de 0.416 g/kg(416 mg/kg), exhibe una actividad hipoglicemiante en ratas con hiperglicemia experimental inducida con estreptozotocina, extendiendose el efecto hasta las 24 horas(29). Hay otros estudios que confirman la actividad hipoglicemiante del *Geranium ayavacense*, realizado en conejos (29).

Sobre la especie *Geranium lechleri*, se informó que tanto el extracto atomizado como el pool de alcaloides totales extraídos de esta planta, son eficaces para reducir la hiperglicemia inducida por aloxano en ratas, llegando a normalizar la glicemia, hasta por un periodo de 24 horas. La dosis de 250 mg/kg de alcaloides produjo una disminución significativa de la glicemia, al elevar a 500 mg/kg las cifras de glicemia alcanzaron niveles muy bajos(21).

CAPITULO III

A. HIPOTESIS Y VARIABLES

Hipótesis: Los extractos de *Tabebuia obscura* (tahuari negro) y *Geranium ayavacense* (pasuchaca) disminuyen la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental.

Variables:

Independiente: Extracto de *Tabebuia obscura*

Extracto de *Geranium ayavacense*

Dependiente: Glicemia

B-C. DIAGRAMA DE VARIABLES, DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES.

Variable	Valores finales	Criterios	Instrumento de medición
Extracto de <i>Tabebuia obscura</i>	Si recibe	100 mg/Kg. Dosis única 200 mg/Kg. Dosis única	Ficha de registro de las dosis usadas- Dpto. de Farmacología
	No recibe	3 ml agua destilada	
Extracto de <i>Geranium ayavacense</i>	Si recibe	6.3 mg/Kg. Dosis única 12.7 mg/Kg. Dosis única	Ficha de registro de las dosis usadas- Dpto. de Farmacología
	No recibe	3 ml agua destilada	
Glicemia	No	Normal: 70 – 115 mg/dl en ratas estudiadas	Ficha de registro de las glicemias. Método GOD – PAP. Prueba enzimática calorimétrica para glucosa. Método con desproteinización
	Sí	> 200 mg/dl	

A. INDICADORES DE LAS VARIABLES:

Variable

Indicador

Glicemia

Niveles de glucosa > 200 mg/dl

CAPITULO IV

A. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

B. TIPO DE INVESTIGACIÓN: Experimental

C. **POBLACIÓN:** estuvo conformada por la ratas albinas cepa Holtzmann provenientes del Centro Nacional de Producción Biológica del Instituto Nacional de Salud- INS- Lima, las cuales fueron aclimatadas en el Bioterio del IMET – EsSalud. De un total de 100 ratas machos nos quedamos con 60 ratas para el presente estudio, es decir aquellas que hicieron hiperglicemia al administrarles aloxano y estaban vivas para iniciar la administración de las diferentes intervenciones. Se consideró formar 6 grupos con 10 ratas cada uno.

D. MATERIAL Y METODO

MATERIAL

Material vegetal:

Muestras del árbol denominado tahuari negro procedente del Jardín botánico del IMET- EsSalud, localizado en Iquitos- Loreto, fueron identificadas en el Herbarium Amazonense- AMAZ con el nombre científico de *Tabebuia obscura* (Bureau & Schumann), y se registró con el número de herbarium: 34119. La parte de esta especie que se utilizó fue la corteza.

La planta denominada pasuchaca procedente de Huaraz- Ancash, fue identificada en el Herbarium Amazonense- AMAZ con el nombre científico de *Geranium ayavacense* Willd. Ex Kunth, y se registró con el número de herbarium: 41033. En este caso se utilizó la planta total.

El Departamento de Etnobotánica se encargó de la recolección de la materia vegetal y preparó las excicatas de ambas especies para ser llevadas al Herbarium. Ver certificación del Herbarium Amazonense – AMAZ, de ambas especies en Anexo 1.

Material animal:

Se utilizaron 100 ratas machos albinas cepa Holtzman. Las ratas que ingresaron al estudio cumplieron con los siguientes criterios: tener un peso > 200 gramos y presentar una glicemia > 200 mg/dl post-administración de aloxano. De las ratas evaluadas 60 completaron el estudio. Las ratas tuvieron una edad entre 13 a 17 semanas. Los animales fueron aclimatados durante 7 días en el Bioterio del IMET –EsSalud, a una temperatura entre 26-29°C, con una humedad entre 45 - 75% y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Se les mantuvo con libre acceso al agua y alimentos. El Departamento de Farmacología del IMET, se encargó de supervizar este proceso.

Equipos, reactivos y otros materiales:

Espectrofotómetro "jenway 6400"

Baño maría "nüve bat 20"

Centrifuga: Microhematocrit centrifuge "Kert lab" modelo: SH120-1

Equipo Shell Frezer

Liofilizador: FreezerDry Sistem/ Freezone LAB CONCO

Balanza digital – Cavory.

Refrigerador

Reactivo para prueba enzimática colorimétrica para glucosa – Lab Human

Agua destilada

Alcohol al 95%

Tabletas de glibenclamida 5 mg

Aloxano 5%.

Cánula intragástrica

Algodón hidrófilo

Hoja de bisturí # 22

Tubos capilares heparinizados

Cubetas espectrofotométricas

Micropipetas de 10 y 1000 ul, Tips de 10 y 1000 ul

Marcador de vidrio, plastilina

Tubos de ensayo

Gradilla metálica

Mortero, pilón

Bandejas de plástico con tapa de malla metálica

Vasos de precipitado 25 ml

Jeringas de 1 ml, con aguja de 0.5 mm x 16 mm

Guantes estériles

Mascarillas estériles.

METODO:

Obtención de los extractos acuosos liofilizados de ambas especies vegetales:

Se utilizó la corteza de *Tabebuia obscura* y la planta total del *Geranium ayavacense*, las cuales fueron limpiadas, cortadas y acondicionadas en el cuarto de secado a temperatura entre 37 - 40°C y se utilizó un equipo deshumidificador durante 72 horas. Los trozos de corteza de

tahuarí negro y la planta total de pasuchaca, previo molido se sometieron al proceso de cocción, llevándose a sequedad las $\frac{3}{4}$ partes del contenido de agua a temperatura de 60 a 70°C, para posterior filtrado y congelación en equipo Shell Frezer a temperatura de -35°C. El producto congelado se llevó a liofilizar a una temperatura de -40°C con una presión de 1.33×10^{-3} MBARR durante 120 horas.

Para el presente estudio, el Departamento de Farmacognosia del IMET- EsSalud, realizó un tamizaje fitoquímico para ambas especies, determinándose una listade metabolitos secundarios a través de los extractos etéreo, etanólico y acuoso. Ver Anexo 2.

Obtención de las dosis de los extractos a ensayar:

Se consideró como referencia el dato etnomédico de la especie *Tabebuia serratifolia*: 25 g de corteza para 1 litro de agua(26), nosotros asumimos trabajar con la dosis de 20 g de la corteza de *Tabebuia obscura* para 1 litro de agua en cocimiento de 10 minutos, para un día y para una persona adulta(asumiendo un peso de 60 kg). Apartir de esta información se obtuvo los sólidos totales, de la dosis de 20 g de corteza/litro de agua se obtuvo 6.12 g de sólidos totales, es decir una persona de 60 kg ingeriría en un día 6.12 g de sólidos totales de tahuarí negro. De esto deducimos que la dosis por kg de peso fue de 102 mg, para fines del estudio se trabajó con 100 mg/kg y se asumió como segunda dosis, el doble de la primera dosis es decir: 200 mg/kg, estas dosis fueron extrapoladas al peso de las ratas con diabetes mellitus experimental. Esto fue la base para las dosis de 100 y 200 mg de liofilizado del extracto acuoso de tahuarí negro por kg de peso.

En el caso del *Geranium ayavacense* se tomó como referencia el dato etnomédico (30): 3 g de la planta total seca en 1 litro de agua en cocimiento de 10 minutos, para un día y para una persona adulta(asumiendo un peso de 60 kg). A partir de este dato se obtuvo los sólidos totales, de la dosis de 3 g/litro de agua se obtuvo 0.38 g de sólidos totales, es decir una persona de 60 kg ingeriría en un día 0.38 g de sólidos totales de pasuchaca. Deduciendose que la dosis por kg de peso fue de 6.3 mg y se asumió como otra dosis al doble de esta, es decir: 12.7

mg/kg; estas dosis fueron extrapoladas al peso de las ratas con diabetes experimental. Se asumió estas dosis en la presentación de extractos acuosos liofilizados, para fines del presente estudio.

Evaluación de la actividad hipoglicemiante (ver fluxograma en Anexo 3)

Inducción de la diabetes mellitus experimental

Las ratas seleccionadas tuvieron un peso entre 214 - 305 g y sus valores de glicemia (denominada basal normal) antes de la inducción fueron entre 72.32 – 113.88 mg/dl, estos valores están dentro del rango de normalidad para estas ratas machos albinas cepa Holtzman según nuestra base datos de los animales que están en el Bioterio del IMET-EsSalud (rango de normalidad de la glicemia en ayunas: 70- 115 mg/dl). A estas ratas se les indujo la diabetes experimental (hiperglicemia) mediante la administración vía intraperitoneal de aloxano al 5% a una dosis de 135 mg/kg, luego de esta administración se esperó 48 horas, momento en el cual se les tomó una prueba basal de glicemia para evaluar si el nivel de glicemia se encontraba por encima de 200 mg/dl(criterio de inclusión que asumimos para considerar diabetes experimental) y a todas las ratas que presentaron estos valores fueron incluidos en el estudio. Los valores de glicemia(basal hiperglicémico) de las ratas con diabetes experimental fueron entre 202.96 – 315.75 mg/dl.

Diseño experimental

Las 60 ratas que cumplieron los criterios de selección, fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos , de 10 ratas por cada grupo. Todas las sustancias administradas fueron vía oral mediante cánula intragástrica. Los grupos fueron:

Grupo I : Agua destilada 3ml (control negativo)

Grupo II: Glibenclamida 10 mg/kg (control positivo)

Grupo III: *Geranium ayavacense* 6.3 mg/kg

Grupo IV: *Geranium ayavacense* 12.7 mg/kg

Grupo V: *Tabebuia obscura* 100 mg/kg

Grupo VI: *Tabebuia obscura* 200 mg/kg

Teniendo ya los basales hiperglicémicos y habiendoles administrados las sustancias de estudio, se efectuaron controles a la hora, tres, seis, doce y veinticuatro horas posteriores.

Proceso para la determinación de la glicemia en las ratas de estudio

Se desinfectó el área de la cola donde se realizó una pequeña incisión(a nivel de la vena caudal), se colocó el capilar en el corte para que se llene de sangre, luego se retiró el capilar y se puso algodón en el área del corte. El capilar se agitó para homogenizar la muestra con el anticoagulante, se selló con plastilina y se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm. Luego, se rompe el capilar en el nivel del suero para su procesamiento: 1000 ul del reactivo para la prueba enzimática colorimétrica para glucosa + 10 ul de suero, se mezclan y se incuban en baño maría por 5 minutos a 37°C. El método específico usado para determinar la glicemia se llamó: Método GOD-PAP, Prueba enzimática colorimétrica para la glucosa- método con desproteización. El reactivo es de la marca Human.

Terminada la incubación se determinó la lectura de absorbancia a 500 nm de longitud de onda, llevando a 0 el espectrofotómetro con el blanco del reactivo, luego se procedió con la lectura del estándar y después de las muestras. El cálculo de la concentración de glucosa se midió con esta fórmula:

$$C = 100 \times \frac{\text{Absorbancia de la Muestra}}{\text{Absorbancia del Estándar}} \text{ (mg/dl)}$$

Absorbancia del Estándar

Ver evidencia fotográfica del proceso de evaluación de la actividad hipoglicemiante, **Anexo 4**.

Etica en el manejo de los animales

El manejo de los animales de laboratorio se hizo cumpliendo estrictamente con las normas establecidas para el uso de animales en trabajos de laboratorio, respetando los derechos universales de los mismos.

Análisis estadístico

Los datos(promedios de glicemias) se analizaron mediante el análisis de varianza(ANOVA) de una vía, utilizando el programa estadístico SPSS, versión 20 en español. Se consideró significativo $p < 0.05$. Cuando se observó significancia en esta prueba se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Games – Howell entre los grupos, fueron considerados estadísticamente significativos a $p < 0.05$ y altamente significativo a $p < 0.01$. Se usó Microsoft excel 2010, para calcular las diferencias porcentuales y elaborar el grafico respectivo.

E. TÉCNICAS APLICADAS EN LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Los datos de pesos y glicemias de las unidades experimentales(ratas) fueron registrados en una ficha digital en excel, ver ficha de registro en **Anexo 5**.

El instrumento de medición de la glicemia, fue el Método GOD-PAP Prueba enzimática colorimétrica para glucosa-método con desproteinización, para lo cual se usó el Espectrofotómetro "jenway 6400".

F. RESULTADOS

El grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg disminuyó significativamente la glicemia a la 6 ta ($p < 0.05$), 12 ava ($p < 0.01$) y 24 ava ($p < 0.01$) hora después de administrar el extracto, cuando se compara con el grupo que recibió agua destilada (control negativo). El grupo de *Geranium ayavacense* 12.7 mg/kg disminuyó significativamente la glicemia ($p < 0.01$) sólo a la 24 ava hora de administrar el extracto, cuando se compara con el placebo. No hubo diferencia significativa entre el grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg y el grupo de la glibenclamida 10 mg/kg. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de *Geranium ayavacense* 6.3 mg/kg y el grupo de agua destilada, a pesar que se observa una leve disminución de la glicemia a partir de la 6 ta hora a favor del grupo de *Geranium*; así también, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de *Tabebuia obscura* 200 mg/kg y el grupo de agua destilada a pesar que se observa una leve disminución de la glicemia a partir de la 6 ta hora a favor del grupo de *Tabebuia*, ver Tabla I.

Tabla I. Promedios de glicemia (mg/dl) basal y post administración de agua destilada, glibenclamida, *Geranium ayavacense* y *Tabebuia obscura* en ratas con diabetes mellitus experimental.

Grupo de tratamiento	Dosis	Tiempo					
		Basal	1 H	3 H	6 H	12 H	24 H
Agua destilada	3ml	256.7	262.9	254.7	262.8	262.2	252.2
Glibenclamida	10 mg/kg	263.8	274.1	263.3	254.5	200.3	126.2
<i>Geranium ayavacense</i>	6.3 mg/Kg	272.9	285.0	275.5	264.5	261.3	245.8
<i>Geranium ayavacense</i>	12.7mg/Kg	283.2	275.0	258.3	253.7	238.3	208.4**
<i>Tabebuia obscura</i>	100 mg/Kg	234.1	236.7	209.4	191.6*	153.8**	116.3**
<i>Tabebuia obscura</i>	200 mg/Kg	234.1	236.7	209.4	191.6	153.8	116.3

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: con respecto al grupo de agua de destilada (control negativo)

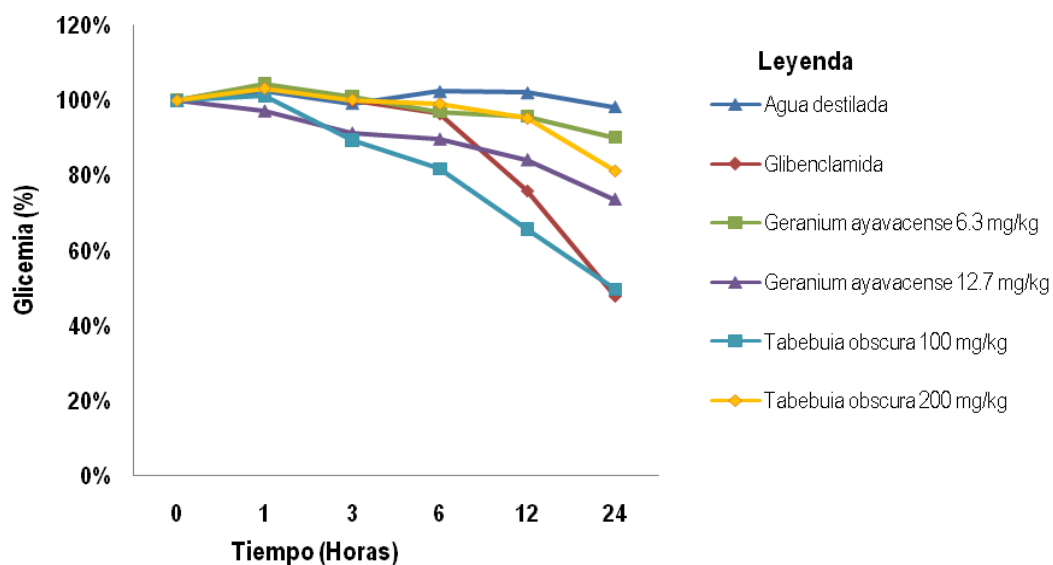
El grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg disminuyó su glicemia en 18.15 %, 34.27 % y 50.31% con respecto a su valor basal (100%), a la 6 ta, 12 ava y 24 ava hora respectivamente; mientras que el grupo de la glibenclamida disminuyó su glicemia en 3.5 %, 24.05 % y 52.17 % con respecto a su valor basal (100%), a la 6 ta, 12 ava y 24 ava hora respectivamente, ver la variación porcentual de

las glicemias en cada grupo en Tabla II. En la figura 1, apreciamos que el extracto de *Tabebuia obscura* de 100 mg/kg, disminuye progresiva y sostenidamente la glicemia a partir de la 3ra hora, hasta finalizar el estudio.

Tabla II. Variación porcentual de la glicemia (%) basal y post administración de agua destilada, glibenclamida, *Geranium ayavacense* y *Tabebuia obscura* en ratas con diabetes mellitus experimental.

Grupo de tratamiento	Dosis	Tiempo					
		Basal	1 H	3 H	6 H	12 H	24 H
Agua destilada	3 ml	100.0	102.4	99.2	102.4	102.1	98.2
Glibenclamida	10 mg/kg	100.0	103.9	99.8	96.5	75.9	47.8
<i>Geranium ayavacense</i>	6.3 mg/Kg	100.0	104.4	101.0	96.9	95.7	90.1
<i>Geranium ayavacense</i>	12.7mg/Kg	100.0	97.1	91.2	89.6	84.1	73.6
<i>Tabebuia obscura</i>	100 mg/Kg	100.0	101.1	89.4	81.8	65.7	49.7
<i>Tabebuia obscura</i>	200 mg/Kg	100.0	103.2	100.2	99.1	95.3	81.3

Figura 1. Variación porcentual de la glicemia (%) basal y post administración de agua destilada, glibenclamida, *Geranium ayavacense* y *Tabebuia obscura* en ratas con diabetes mellitus experimental.



G. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, se puso en evidencia que el extracto acuoso liofilizado de *Tabebuia obscura* a la dosis de 100 mg/kg tiene buen efecto hipoglicemiante en ratas macho albinas con diabetes mellitus experimental. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg y el grupo que recibió glibenclamida 10 mg/kg, es decir es lo mismo que dar uno u el otro para observar un buen efecto hipoglicemiante. Ambas sustancias empiezan su acción hipoglicemiante a partir de la 3ra hora; sin embargo en la 3ra, 6ta y 12ava hora, el efecto hipoglicemiante del extracto de *Tabebuia obscura* superó al de la glibenclamida.

También es importante señalar que el extracto de *Tabebuia obscura* de 100 mg/kg, redujo la hiperglicemia basal hasta prácticamente normalizarla (116.31 mg/kg), si consideramos que el rango de normalidad, según base de datos del Bioterio del IMET, para ratas sanas machos albinas cepa Holtzman fue establecido entre 70 – 115 mg/kg, mientras que la glibenclamida no logró normalizar los valores de hiperglicemia. Con la dosis de 200 mg/kg de *Tabebuia obscura* no se presentó el efecto dosis-respuesta, aunque hay una leve tendencia a disminuir la glicemia, no es suficiente para establecer una diferencia estadísticamente significativa con respecto al placebo, esto se explica por la alta variabilidad de los valores de glicemia para este grupo de datos.

No se dispone de estudios en la literatura especializada sobre la administración de extractos de *Tabebuia obscura* en ratas con diabetes experimental, por lo que los resultados obtenidos constituyen información inicial para posteriores estudios comparativos. Sin embargo, se ha publicado que la familia Bignoniaceae es una de las familias botánicas que contribuyen con más especies antidiabéticas en todos los países(32), la *Tabebuia obscura* pertenece a esta familia. Así tenemos como ejemplo a la *Jacaranda caucana*, *Jacaranda mimosifolia*(33) y a la *Tecoma stans*(28) que son usados tradicionalmente para tratar la diabetes y pertenecen a esta familia.

Con respecto al extracto de *Geranium ayavacense* de 12,7 mg/kg, empezó su efecto hipoglicemiante desde la 1ra hora post-administración de la sustancia y así fue disminuyendo la glicemia discreta y progresivamente durante el resto de horas, llegando a mostrar un efecto

hipoglicémico altamente significativo ($p < 0.01$) a las 24 horas, con respecto al grupo placebo. El otro grupo que recibió *Geranium ayavacense* a la dosis de 6.3 mg/kg, no presentó diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las horas de estudio. Cabe recordar que las dosis ensayadas en el presente estudio, para ambas especies son dosis de uso tradicional que hemos extrapolado y adaptado al peso de las ratas. Estos pobres resultados pueden explicarse por que la dosis de *Geranium ayavacense* evaluada fue muy pequeña, comparada con la dosis ensayadas en otros estudios con ratas con diabetes experimental, por ejemplo en una investigación se usó la dosis de 416 mg/kg de extracto liofilizado logrando mostrar buen efecto hipoglicemiante(29).

Se ha reportado más estudios sobre la efectividad del *Geranium ayavacense* para disminuir la glicemia en ratones, esta vez usando su extracto etanólico a las dosis de 50, 250 y 500 mg/kg administrados vía oral(29). Así también, se ha ensayado dosis de 300 mg/kg de extracto crudo y acuoso de la raíz del *Geranium ayavacense*, observandose una significativa actividad hipoglicémica.

La presencia de flavonoides en el extracto acuoso del *Tabebuia obscura*, podría ser la causa de su efecto hipoglicemiante, ya que existen estudios sobre un tipo de glicósido de flavona (derivados de flavonoide) que demostró actividad hipoglicemiante debido a que estaría ligado a los receptores proliferadores de peroxisoma (PPAR) o antagonistas de receptores de glucagón, inhibidor dipeptidil peptidasa IV y activador de los receptores de insulina(34). El PPAR esta relacionado con la regulación y maduración del adipocito, siendo el sitio de acción para los fármacos sensibilizadores a la acción de la insulina, como la troglitazona, pioglitazona y rosiglitazona, los que conllevan a la reducción de la glicemia(35,36).

Este blanco molecular podría ser el área de acción donde probablemente actuarían los flavonoides presentes en la *Tabebuia obscura*. Además, se ha demostrado que los flavonoides tales como la quercetina, ejercen buen efecto hipoglicemiante, a través de la acción sobre la alfa-glucosinasa que favorece la fosforilación de la glucosa, para formar glucosa-6 fosfato, paso limitante para la glucólisis y la regulación de la glicemia(22). Otro metabolito secundario presente en el tahuari

negro, son los alcaloides los cuales estarían coadyuvando con el efecto hipoglicémico, por que inducen la secreción de insulina solo en concentraciones altas de glucosa(37).

Aunque en nuestro estudio no se ha observado un gran efecto hipoglicemiante del *Geranium ayavacense* a la dosis estudiadas, no podemos ser indiferentes a su efecto hipoglicemiante reportado en otros estudios, lo cual sería explicado por el efecto sinérgico de sus alcaloides y flavonoides. Cabe señalar que en un estudio del *Geranium lechleri*, concluyeron que los alcaloides constituyen los principios activos responsables del efecto hipoglicemiante(21).

Es importante señalar que este estudio es un aporte más a la serie de investigaciones nacionales que se vienen realizando con la finalidad de demostrar la actividad hipoglicemiante de nuestras plantas medicinales. El presente estudio corrobora el gran potencial existente en nuestra medicina tradicional, como fuente de nuevos medicamentos para el tratamiento de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

H. CONCLUSIONES:

El extracto acuoso liofilizado de la *Tabebuia obscura* a la dosis de 100 mg/kg, tiene buen efecto hipoglicemiante en ratas con diabetes experimental. Su efecto es equiparable al medicamento de síntesis: glibenclamida a la dosis de 10 mg/kg. Presentó su efecto hipoglicemiante a partir de la 3ra hora, pero dicho efecto fue estadísticamente significativo a la 6ta, 12ava y 24ava hora. Su efecto es equiparable al de la glibenclamida. El grupo de *Geranium ayavacense* 12,7 mg/kg disminuyó significativamente a glicemia sólo a las 24 horas.

I. RECOMENDACIONES

Realizar estudios con un mayor número de unidades experimentales (ratas). Evaluar la actividad hipoglicemiante usando un modelo crónico de diabetes experimental, considerando que la diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica. Sugerimos que además de evaluar la glicemia se debería evaluar los niveles de insulina para tratar de dilucidar el posible mecanismo de acción de las sustancias a ensayar.

AGRADECIMIENTOS

- A los internos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana- UNAP-Iquitos-Loreto que están brindando su apoyo voluntario al Dpto. de farmacología:
 - Nerio Pelegrino, Pantaleón Del Aguila
 - Romel, Tuesta Villacorta
 - Charles Frank, Domínguez Sangama
 - Jaime Luis Alberto, Neves Saavedra
 - Ramon El Grande Ampudia Guerrero
 - Teddy Americo, Torrejón Ríos
- Agradecimiento a la secretaria Patricia Laulate Tamayo, por su colaboración en la redacción del artículo.
- Agradecimiento al Q.F. Henry Delgado Wong, por su colaboración en la preparación de los extractos y supervisar la administración de los mismos a los animales de experimentación.

ANEXOS

Foto 1: Fachada del Instituto de Medicina Tradicional –Hospital III – Iquitos – Essalud – Loreto



ANEXO 1

Certificación del Herbarium Amazonense – AMAZ, de que las plantas estudiadas corresponden al género y especie correcto.



UNAP

Herbarium Amazonense - AMAZ
Centro de Investigación de Recursos Naturales

CONSTANCIA Nº 15

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

CERTIFICA:

Que, las muestras botánicas presentadas por el Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD; fueron verificados e identificados en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Nº de Herbarium	Nombre común	Nombre Científico	Familia
41033	“pasuchaca”	<i>Geranium ayavacense</i> Willd. ex Kunth	GERANIACEAE
34119	“Tahuari”	<i>Tabebuia obscura</i> (Bureau & Schumann) Sandiwith	BIGNONACEAE

Se expide el presente certificado al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 28 de Mayo del 2013

Atentamente,

Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA M.Sc.
Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP



ANEXO 2

Determinación de los metabolitos secundarios en las especies de *Tabebuia obscura* y *Geranium ayavacense*

TABLA III.: Tamizaje Fitoquímico de *Tabebuia obscura* y *Geranium ayavacense*.

Metabolitos	<i>Tabebuia obscura</i>			<i>Geranium ayavacense</i>		
	éter	etanol	agua	éter	etanol	agua
Alcaloides	+	+++	+++	+	++	++
Triterpenos y esteroides	+++	-	-	-	-	-
Quinonas	-	+	-	-	+	-
Cumarinas	-	+	-	-	-	-
Carotenos	-	-	-	-	-	-
Aceites esenciales – grasas	+++	-	-	++	-	-
Azúcares reductores	-	-	+++	-	-	+++
Saponinas	-	-	++	-	-	+++
Fenoles y taninos	-	+++	+++	-	+++	+++
Aminoácidos y aminas	-	+	-	-	-	-
Glicosidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	+	++	-	+	++
Mucilagos	-	-	++	-	-	++
Princ. Amargos y astringentes	-	-	+	-	-	+++
Glicosidos	-	-	++	-	-	-

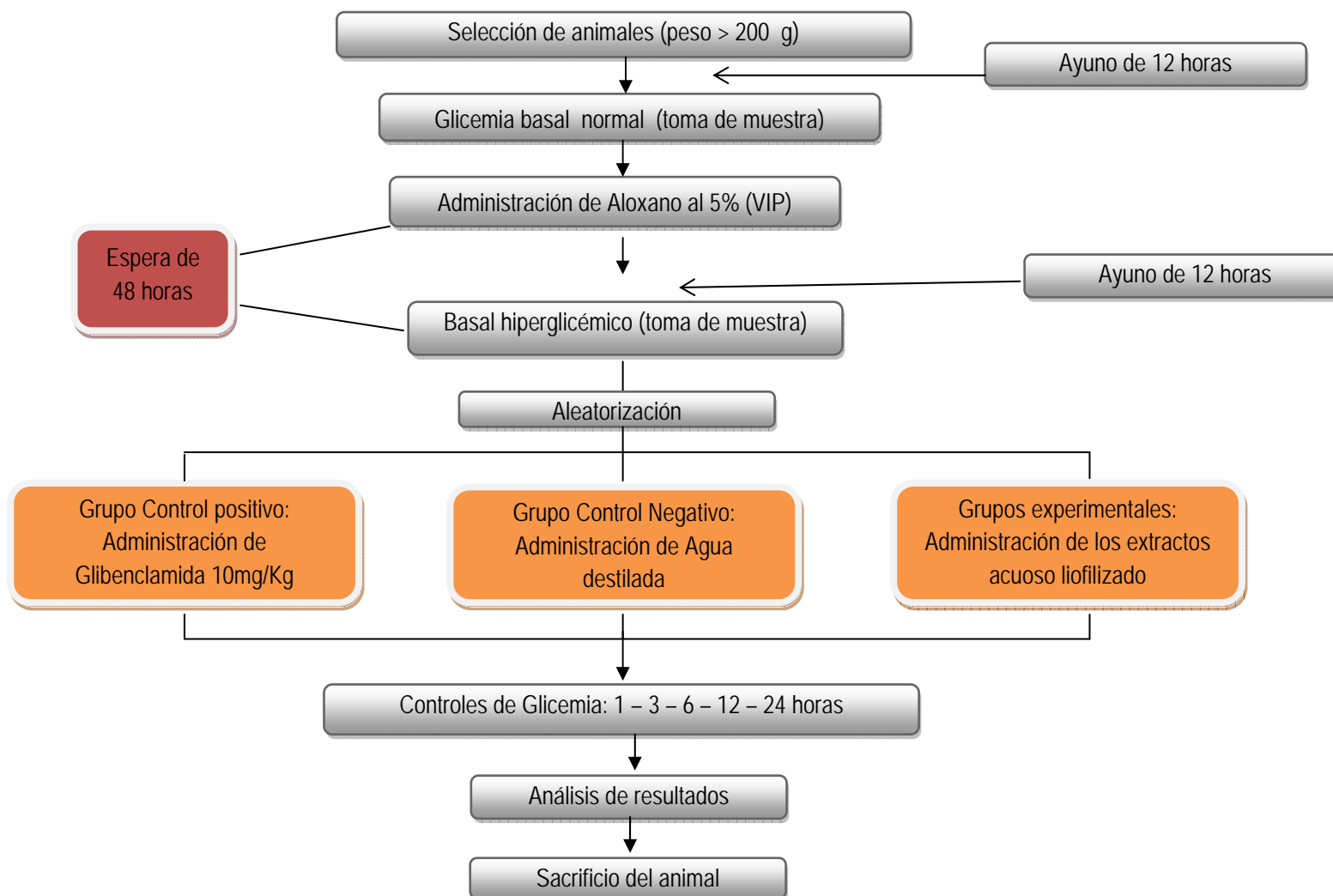
(+++) Abundante (++) Moderado (+) Leve (-) Ausente

Fuente: IMET- EsSalud. Departamento de Farmacognosia, 2012.

ANEXO 3

Fluxograma de la evaluación de la actividad hipoglicemiante

Figura 2. Pasos de la Evaluación de la Actividad Hipoglicemiante



ANEXO 4

Evidencia fotográfica del proceso de evaluación de la actividad hipoglicemiante

Foto 2: Ratas machos albinas cepa Holtzman en bioterio del IMET-EsSalud, en proceso de aclimatación



Foto 3: Selección de Ratas machos albinas cepa Holtzman



Foto 4: Pesado de las ratas albinas cepa Holtzman (uno de los criterios de selección: peso >200 g)

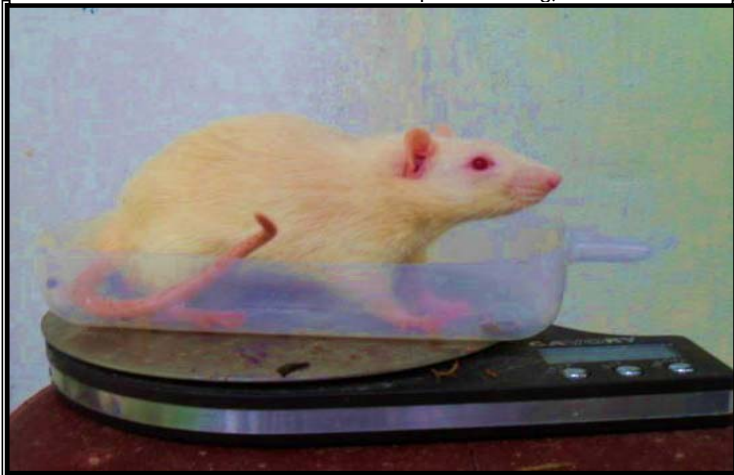


Foto 5: Marcaje de ratas albinas cepa Holtzman.



Foto 6: Corte en la Cola de las ratas machos albinas y extracción de la sangre con capilares heparinizados



Foto 7: Centrifugación para separación de suero



Foto 8: Reactivo para prueba enzimática colorimétrica para glucosa



Foto 9: Preparación de muestra: 1 ml. de reactivo para prueba enzimática colorimétrica para glucosa + 10 ul. de suero



Foto 10: Incubación en baño maría a 37°C



Foto 12: Reactivo de aloxano 5% para la inducción de la diabetes mellitus (hiperglicemia) experimental



Foto 11: Lectura de absorbancia usando espectrofotómetro para luego hacer el cálculo de la glicemia



Foto 13: Administración vía intraperitoneal del aloxano a las ratas machos albinas- esperar 48 hrs para instalación de hiperglicemia



Foto 14: Proceso de liofilización de los extractos acuosos.



Foto 15: Proceso de liofilización de los extractos acuosos.



Foto 16: Extractos acuosos liofilizados de *Tabebuia obscura* y *Geranium ayavacense*



Foto 17: Administración de los extractos acuosos a las ratas con diabetes experimental, luego se realizara los controles de glicemia a la 1, 3, 6,12 y 24 hrs.



ANEXO 6

Base de datos del estudio

Tabla IV. Promedios de peso, glicemias (basales normales e hiperglicemicos) de ratas con diabetes experimental que recibieron Glibenclamida 10mg/Kg.

GLIBENCLAMIDA 10mg/Kg.

U.E	PESO	BASAL NORMAL	BASAL HIPERGLICÉMICO	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
	gramo	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	230	86.30	260.49	261.11	262.96	248.46	239.20	241.67
2	232	97.95	231.79	260.19	265.43	241.67	238.89	171.91
3	240	96.23	248.46	262.65	253.70	250.00	245.06	193.52
4	264	96.13	208.56	213.36	158.90	142.12	134.59	65.41
5	282	88.03	232.88	255.82	236.30	202.40	153.08	93.84
6	246	106.64	304.76	299.27	299.27	297.07	189.01	77.29
7	242	101.41	305.86	315.02	313.19	271.79	264.47	106.96
8	234	113.29	256.41	281.32	249.82	296.70	145.05	80.95
9	241	80.42	290.84	298.17	302.56	293.04	224.18	141.03
10	253	100.70	297.44	294.14	290.84	301.83	169.60	89.01
PROMEDIO	246.4	96.71	263.75	274.10	263.30	254.51	200.31	126.16
DS	16.13	9.79	34.39	29.55	44.71	50.75	47.57	58.79

Tabla V. Promedios de peso, glicemias (basales normales e hiperglicemicos) de ratas con diabetes experimental que recibieron agua destilada.

CONTROL NEGATIVO: AGUA DESTILADA 3 ml.

U.E	PESO	BASAL NORMAL	BASAL HIPERGLICÉMICO	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
	gramo	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	298	95.94	233.43	243.36	245.72	255.16	249.56	240.00
2	305	98.15	232.04	247.20	241.00	253.10	248.38	234.86
3	303	109.59	218.51	233.04	234.51	247.79	246.31	222.57
4	280	107.01	228.73	242.18	239.53	244.84	247.20	226.86
5	283	108.12	214.64	232.74	232.74	233.04	229.50	220.29
6	282	107.01	211.60	222.42	223.01	225.37	236.58	234.29
7	301	96.85	311.36	318.32	299.65	299.30	298.95	303.85
8	293	111.89	306.96	295.24	270.98	293.36	295.10	276.22
9	278	100.7	315.75	319.05	297.55	291.61	302.80	306.29
10	282	94.41	294.14	275.46	261.89	284.27	267.83	256.99
PROMEDIO	290.5	102.97	256.72	262.90	254.66	262.78	262.22	252.22
DS	10.58	6.42	44.22	36.40	27.01	26.97	27.22	32.49

Tabla VI. Promedios de peso, glicemias (basales normales e hiperglicemicos) de ratas con diabetes experimental que recibieron *Geranium ayavacense* 6.3mg/Kg

***Geranium ayavacense* Willd. 6.3mg/Kg**

U.E	PESO	BASAL NORMAL	BASAL HIPERGLICÉMICO	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
	gramo	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	256	112.30	277.36	271.96	262.50	251.01	189.19	136.49
2	247	100.40	275.34	298.65	285.81	279.73	276.01	271.28
3	241	89.68	270.27	289.19	283.11	271.28	275.34	262.16
4	246	92.06	272.97	289.53	290.88	276.01	268.24	273.31
5	245	102.38	270.27	293.24	281.08	277.70	283.45	269.93
6	253	92.86	274.66	285.81	265.20	264.86	276.01	270.27
7	243	95.63	270.27	291.55	283.45	275.68	285.47	269.93
8	249	103.57	281.08	269.26	270.27	248.99	244.93	228.04
9	250	97.62	267.57	267.23	262.84	234.12	246.96	217.57
10	260	100.40	268.92	293.92	270.27	265.54	267.23	259.12
PROMEDIO	249	98.69	272.87	285.03	275.54	264.49	261.28	245.81
DS	5.93	6.65	4.23	11.30	10.46	15.12	28.79	43.04

Tabla VII. Promedios de peso, glicemias (basales normales e hiperglicemicos) de ratas con diabetes experimental que recibieron *Geranium ayavacense* 12.7mg/Kg

***Geranium ayavacense* Willd. 12.7mg/Kg.**

U.E	PESO	BASAL NORMAL	BASAL HIPERGLICÉMICO	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
	gramo	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	251	80.56	291.22	285.47	276.69	276.35	273.99	267.91
2	245	102.38	289.86	295.61	286.49	269.26	280.74	279.73
3	253	85.32	285.81	254.39	253.72	248.65	238.85	254.73
4	255	106.75	288.85	267.91	250.34	247.64	252.03	193.24
5	242	96.83	285.14	284.80	244.93	262.84	247.64	179.39
6	243	86.11	259.46	291.89	244.93	269.26	280.41	264.53
7	245	98.02	278.72	264.86	255.07	257.43	265.20	240.54
8	285	113.88	276.74	243.06	233.33	198.61	107.99	111.46
9	273	91.84	278.82	260.76	249.31	254.51	166.32	108.68
10	278	111.02	297.22	301.39	288.54	252.43	270.14	183.68
PROMEDIO	257	97.27	283.18	275.01	258.33	253.70	238.33	208.39
DS	15.80	11.34	10.50	19.47	18.87	21.59	56.79	63.23

Tabla VIII. Promedios de peso, glicemias (basales normales e hiperglicemicos) de ratas con diabetes experimental que recibieron *Tabebuia obscura* 100mg/Kg.

***Tabebuia obscura* 100mg/Kg.**

U.E	PESO	BASAL NORMAL	BASAL HIPERGLICÉMICO	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
	gramo	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	222	95.20	216.96	210.38	195.50	152.25	107.96	111.44
2	234	90.77	215.92	231.49	139.45	107.61	73.01	97.05
3	231	106.64	252.60	261.94	231.83	213.15	137.02	109.59
4	238	106.64	218.69	222.84	189.97	161.25	121.11	107.01
5	222	100.74	253.98	249.83	245.67	228.03	93.77	101.11
6	235	105.90	207.27	188.93	157.79	120.76	114.88	83.76
7	231	92.99	258.82	259.86	253.98	237.72	251.56	159.04
8	227	85.61	222.15	235.29	214.88	196.89	156.75	103.69
9	243	98.89	249.48	256.40	218.69	233.91	243.25	149.08
10	238	97.05	244.64	249.83	246.71	264.01	239.10	141.33
PROMEDIO	232.1	98.04	234.05	236.68	209.45	191.56	153.84	116.31
DS	6.94	7.15	19.50	23.81	38.65	53.25	66.62	24.72

Tabla IX. Promedios de peso, glicemias (basales normales e hiperglicemicos) de ratas con diabetes experimental que recibieron *Tabebuia obscura* 200mg/Kg.

Tabebuia obscura 200 mg/Kg.

U.E	PESO	BASAL NORMAL	BASAL HIPERGLICÉMICO	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
	gramo	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	218	73.80	261.59	261.25	247.40	241.87	223.53	92.73
2	226	75.65	217.65	204.15	147.75	167.13	98.27	88.93
3	214	72.32	285.81	301.04	286.51	283.04	295.85	287.20
4	230	89.30	260.90	279.93	275.09	260.21	255.36	236.68
5	216	81.55	257.79	257.09	252.25	251.90	259.86	178.20
6	216	83.39	281.18	269.55	256.75	253.29	268.86	220.76
7	254	94.07	309.63	306.30	313.33	304.81	292.22	304.81
8	250	90.74	282.22	300.74	299.26	275.19	239.26	239.63
9	254	102.96	311.85	307.78	314.81	320.37	330.37	315.93
10	261	105.19	202.96	268.52	283.7	290.74	281.11	207.41
PROM	233.9	86.90	267.16	275.64	267.68	264.85	254.47	217.23
DS	18.76	11.62	35.44	31.65	48.44	42.41	62.74	79.43

BIBLIOGRAFIA

- 1 . Bussmann RW, Glenn A. Traditional knowledge for modern ailments – plants used for the treatment of diabetes and cancer in Northern Perú. *J Med Plants Res.* 2011; 5(31): 6916 – 6930.
- 2 . Seguro Social de Salud/Organización Panamericana de Salud. Estudio costo – efectividad: Programa Nacional de Medicina Complementaria. Lima: EsSalud – OPS; 2000.
- 3 . Modak M, Dixit P, Londhe J, Ghaskadbi S, Devasagayam TP. Indian herbs and herbal drugs used for treatment of diabetes. *J Clin Biochem Nutr.* 2007; 40(3): 163 – 173.
- 4 . Valdivia F, Hidalgo M. Uso de medicina tradicional en diabetes mellitus no insulino dependiente. *An Fac Med.* 1996; 57(3): 180 – 183.
- 5 . Organización Panamericana de la Salud. Acerca de diabetes: ¿Qué es diabetes? [Internet]. Washington DC, USA [actualizado el 27 de abril de 2012, citado el 28 de mayo de 2013]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6717&Itemid=39447&lang=es
- 6 . Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of diabetes: estimates for 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5): 1047 – 1053.
- 7 . Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 2009.
- 8 . Nathan D, Buse J, Davidson M, Heine R. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care.* 2006; 29(8): 1963 – 1972.
- 9 . Organización Panamericana de la Salud. Nueva “Notas descriptivas: Diabetes en las Américas” [Internet]. Washington DC, USA [actualizado el 24 de abril de 2012, citado el 28 de mayo de 2013]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6678&Itemid=259&lang=es

10. Calderon J, Solis J, Castillo O, Cornejo P, Figueroa V, et al. Efecto de la educación en el control metabólico de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 del Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Rev Soc Peru Med Interna*. 2003; 16(1): 17-25.
11. Seclén S, Villena A, Leey J. Prevalence of diabetes and risk factors for coronary heart disease and stroke in Peruvian mestizo population. *Diabetología*. 1997; 40: A290.
12. Seguro Social de Salud – EsSalud. Plan Estratégico Institucional 2012-2016. Lima: Seguro Social de Salud; 2012.
13. Arroyo J, Martínez J, Ronceros G, Palomino R, Villareal A, et al. Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento con glibenclamida. *An Fac med*. 2009; 70(3): 163 – 167.
14. Nissen S, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *NEJM*. 2007; 356: 2457 – 2471.
15. Smith U, Gale EAM (2009). Does diabetes therapy influence the risk of cancer?. *Diabetología* doi: 10.1007/s00125-009-1441-5.
16. Colagiuri R. Diabetes : a pandemic, a development issue or both ?. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010; 8(3): 305 – 309.
17. Shapiro K, Gong WC. Use of herbal products for diabetes by latinos. *J Am Pharm Assoc*. 2002; 42(2): 278 – 279.
18. Li WL, Zhen HC, Bukuru J, De Kimpe N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharm*. 2004; 92: 1 – 21.
19. Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, et al. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*. 2006; 13(10): 1203 – 1218.

- 20 . Castañeda B, Manrique M, Ibañez L. Efecto hipoglicemiante y sobre la lipemia de *Notholaena nivea*, "cuti-cuti". *Horizonte Médico*. 2004; 4(1): 9-22.
- 21 . Castañeda B, Castro de la Mata R, Manrique R, Ibañez L, Fujita R, et al. Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 plantas con efecto hipoglicemiante. *Horizonte Médico*. 2008; 8(1):6-34.
- 22 . Castañeda B, Castro R, Puebla P, Ibañez L. Efecto del extracto atomizado de las hojas de *Calophyllum brasiliense* "lagarto caspi" sobre la glicemia. *Horizonte Médico*. 2011; 11(1): 7-14.
- 23 . Rodrigo M, Valdivieso R, Suárez S, Oriondo R, Oré R. Disminución del daño oxidativo y efecto hipoglicemiante de la maca (*Lepidium meyenii* Walp) en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. *An Fac med*. 2011; 72(1):7-11.
- 24 . Brako L, Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Perú. Missouri: Missouri Botanical Garden; 1993: 210.
- 25 . Taylor L. The healing power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals. New York: Square One Publishers; 2005: 383-389.
- 26 . Instituto de Medicina Tradicional. Plantas medicinales de la Amazonía peruana. Iquitos: Instituto Peruano de Seguridad Social – IPSS; 1995: 216 -217.
- 27 . IMET-EsSalud. Tamizaje fitoquímico del *Tabebuia obscura* y el *Geranium ayavacense*. Informe del Departamento de Farmacognosia- IMET- EsSalud. 2012; 001-DF.
- 28 . Mostacero J, Castillo F, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, et al. Plantas medicinales del Perú: Taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica. Lima: Asamblea Nacional de Rectores; 2011: 291-294.
- 29 . Mendocilla M, Villar M. Monografía de plantas medicinales. En : Villar M, Villavicencio O, editors. Manual de fitoterapia. Lima: Seguro Social de Salud- EsSalud; 2001: 265-267.

- 30 . IMET- EsSalud. Plantas de uso tradicional en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2. Informe del Departamento de Etnobotánica – IMET –EsSalud.2012; 001 – DEB.
- 31 . Karato M, Yamaguchi K, Takei S, Kino T, Yazawa K. Inhibitory effects of pasuchaca(*Geranium dielsiaum*) extract on alfa-glucosidasa in mouse. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70(6): 1482-1484.
- 32 . Esquivel-Gutiérrez E, Noriega-Cisneros R, Bello-Gonzales M, Saavedra-Molina A, Salgado-Garciglia R. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*. 2012; 14(1): 45-52.
- 33 . Fonnegra R, Jiménez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2da ed. Medellín: Universidad de Antioquía; 2007: 129.
- 34 . Arroyo J, Martínez J, Ronceros G, Palomino R, Villareal A, et al. Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. *An Fac med*. 2009; 70(3): 163-167.
- 35 . Asgary S, Naderi Gh, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, et al. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharm Acta Helvetiae*. 1999;73: 223-226.
- 36 . Feinstein D, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, et al. Receptor independent actions PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? . *Bioch Pharmacol*. 2005;70: 177-188.
- 37 . Constantino L, Raimondi L, Pirisino R, Brunetti T, Pessotto P, et al. Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. *Pharmacy Res*. 2003; 58: 781- 785.