
“Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglicemiante”*

PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES IN FOUR PLANTS WITH HYPOGLYCEMIC EFFECT

Castañeda,B; *Castro de la Mata,R; **Manrique,R; **Ibáñez, L; **Fujita, R; **Barnett, **E. Mendoza

RESUMEN

Se realizó el estudio de la acción hipoglicemiante de *Ocimum sanctus* (Albahaca morada), *Notholaena nivea* (Cuti-Cuti), *Geranium lechleri* (Pasuchaca) y *Smallantus sonchifolius* (Yacón), frente a la hiperglicemia aloxánica, tanto de los extractos atomizados, como del pool de alcaloides, de cada una de las plantas. Igualmente, se determinó la DL50 del extracto atomizado y de los alcaloides de las cuatro plantas evaluadas. La toxicidad aguda se determinó en ratones albinos, cepa nihs, cuyos pesos oscilaron entre 25 y 30 g. La acción hipoglicemiante, fue evaluada en ratas albinas cepa holtzman, de 200 a 250 g de peso. Tanto los extractos atomizados, como los alcaloides de Cuti-Cuti, Pasuchaca y hojas de Yacón, mostraron un excelente efecto hipoglicemiante, frente a la hiperglicemia inducida por aloxano. Las tres plantas poseen escasa toxicidad aguda, y según los criterios de Williams podrían considerarse como plantas prácticamente atóxicas. Sin embargo, solamente el pool de alcaloides de Albahaca a la dosis de 250 mg/kg de peso, mostró una escasa acción hipoglicemiante, no mostrando eficacia la dosis de 500mg/kg, del pool de alcaloides, ni el atomizado de la planta, a la dosis de 1000 mg/kg de peso.

Palabras claves

Hiperglicemia aloxánica, Albahaca, Cuti-Cuti, Pasuchaca, Yacón, Toxicidad Aguda.

SUMMARY

The study of the hypoglycemic action of *Ocimum sanctum* (Albahaca morada), *Notholaenanivea* (Cuti-Cuti), *Geranium lechleri* (Pasuchaca) and *Smallantus sonchifolius* (Yacón),

was performed on alloxan-induced hyperglycemic rats. In addition, atomized extracts and the pool of alkaloids, of the different plants were studied. To evaluate acute toxicity, DL50 of the atomized extract and of the alkaloids on the four plants were determined using albino mice, whose weights oscillated between 25 and 30 g. The hypoglycemic action, was evaluated in Holtzman albino rats, of 200 to 250 g of weight. The atomized extracts, as well as the alkaloids of Cuti-Cuti, Pasuchaca and leaves of Yacón, showed an excellent hypoglycemic effect in the hyperglycemic alloxan-induced rats. These three plants have little acute toxicity and according to the Williams` criteria they could be considered as practically non toxic. On the other hand only the pool of alkaloids of Albahaca, at the dose of 250 mg/kg showed little hypoglycemic action. No hypoglycemic effect was observed with the albahaca alkaloids at the dose of 500mg/kg nor with the atomized extract of the plant at the dose of 1000 mg/kg.

Key words

Alloxan-induced Hyperglycemic, Albahaca, Cuti-Cuti, Pasuchaca, Yacón, Acute Toxicity.

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 como lineamiento para orientar el desarrollo para la incorporación, sistemática, de los conocimientos científicos y tecnológicos a las actividades económicas, sociales y culturales, pues a pesar de la gran utilización de las plantas medicinales por la población, cada

Jefe del Departamento de Investigación Facultad Medicina USMP

* Estudio realizado con la subvención de CONCYTEC

** Miembros del Instituto de Investigación Facultad Medicina USMP

vez en aumento, pocas de ellas han sido estudiadas siguiendo métodos científicos válidos y atendiendo a las normas éticas establecidas internacionalmente, ya que 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. Asimismo, 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^{7,11}.

Asimismo, es necesario comprobar el potencial de toxicidad de una planta para su posible aceptación como medicamento, además de garantizar su efecto específico, evaluando la 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, 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^{4,6,9}.

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. 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, a nuestro país, entre el 5.1% y 6%, para la prevalencia de diabetes mellitus en adultos.

Según Lassus, 2005¹¹, el mercado farmacéutico mundial estima un volumen de ventas de medicamentos de US\$ 435,580 millones, de los cuales solamente EE.UU, Japón y Alemania acumularán el 80% del mercado mundial de venta de genéricos, y el restante será distribuido y consumido en el resto de países del planeta. El Perú representa aproximadamente el 0.11% del mercado farmacéutico mundial, sin embargo es necesario tener en cuenta que más del 56% de los peruanos, se ubican en el nivel de pobreza y alrededor del 20 % se encuentra en extrema pobreza, sin posibilidad de acceso a los medicamentos convencionales; lo que hace indispensable la búsqueda de medicamentos eficaces, con bajo riesgo y al alcance de las grandes mayorías^{5,12}.

La diabetes mellitus, es una enfermedad metabólica que afecta a adultos, jóvenes y niños y comprende una serie de trastornos metabólicos que comparten la característica común de la hiperglicemia, por la progresiva incapacidad de las células para utilizar la glucosa, o la incapacidad del páncreas para segregar la hormona insulina requerida². Existen 2 tipos de diabetes mellitus: I y II. Se desconoce la causa exacta de esta enfermedad; sin embargo, como en muchas otras enfermedades, dos factores son muy importantes y tienen funciones críticas: el genético y el ambiental. Asimismo, durante el estrés hay mayor secreción de 4 hormonas que influyen sobre el metabolismo de los carbohidratos: los glucocorticoides y las hormonas tiroideas, que tienden a elevar la glicemia, y el glucagón y las catecolaminas, que estimulan la formación de glucosa hepática a partir de glucógeno, aminoácidos y lactato, disminuyendo la aceptación de glucosa por los tejidos. La diabetes, es una enfermedad multifactorial, producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos, y que influye negativamente sobre la calidad de vida de las personas que la sufren. En nuestro país, y en todo el mundo, se asocia a una modificación en el estilo de vida, que lleva un cambio implícito en la alimentación del individuo y una disminución de la actividad física cotidiana; en este contexto, es importante resolver y definir el camino a seguir con nuestro propio estilo de vida, adaptándonos a los cambios inherentes a la globalización que exige competitividad, conocimiento y creatividad, sin perder nuestra identidad y conservando nuestra salud^{3,8,9}.

Las plantas medicinales con actividad antidiabética, pueden constituir una fuente importante de nuevos compuestos orales hipoglicemiantes, ya sea como compuestos de primera línea, en el tratamiento de la diabetes, o como coadyuvantes de las terapias existentes^{7,10}. Para ello es muy importante, validar científicamente la efectividad y la seguridad

(relativa inocuidad) de estas plantas para garantizar su uso, a bajo costo, por la población de pacientes diabéticos; lo que justifica, ampliamente, la realización de estudios de este tipo. Lo antes expuesto, nos ha impulsado a realizar el estudio sistemático de 4 plantas con efecto hipoglicemiante, utilizadas en la medicina tradicional y, que en estudios previos, han demostrado su eficacia como reductoras de los niveles de glicemia elevados, tales como: Cuti cuti, Pasuchaca, Yacón y Albahaca. Así mismo, queremos determinar las características genéticas de las plantas seleccionadas ya que a la fecha no se ha hecho estudios de estas plantas acerca de la variabilidad de la especie a utilizar, pues es sabido, que en todas las especies bacterianas, vegetales o animales hay variaciones fenotípicas, según su procedencia geográfica, debido tanto a componentes ambientales, como a sus componentes genéticos que posea cada uno de los especímenes, interviniendo en la producción de principios activos y metabolitos de importancia farmacológica, que pueden ser determinados por marcadores genéticos, lo cual va a servir para, ulteriormente, asociar la producción de los principios activos, con marcadores genéticos, con la idea de facilitar la selección de especímenes/variedades de plantas medicinales a utilizar. Por otro lado, podría ser interesante la recomendación de un menú que incluya a las plantas comestibles con actividad hipoglucemiante, para la prevención y control de la diabetes mellitus tipo 2. En Brasil, se usan las hojas del yacón y se prepara un té antidiabético, al respecto. En la Facultad de Medicina de la USMP, Alfaro y col¹, demostraron el efecto hipoglicemiante de las hojas (cocción) y el tubérculo de Yacón, siendo más efectivas las hojas. Igualmente, Volpato et al 1997, encontraron que las hojas de yacón, reducían los niveles de glucosa en sangre, siendo el valor alimenticio del tubérculo fresco bajo, porque contiene 69-83% de agua, 05-2,2% de proteína, 20% de azúcares, principalmente inulina (polisacáridos de fructosa).

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- RECOLECCIÓN DE LOS PRODUCTOS VEGETALES A ESTUDIAR

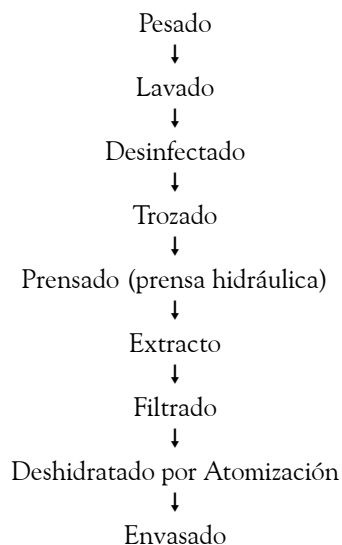
Las muestras de Albahaca, Cuti Cuti, Pasuchaca y Yacón fueron sometidas a secado, pulverizado, atomizado y extracción de los alcaloides totales. El proceso fue supervisado por el Ing. Edy Barnett de la Escuela de Ingeniería Industrial de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la USMP. La colección del material vegetal, atomizado y clasificación fue realizada por el Ingeniero agrónomo Jaime Palacios Olivos, colegiado con el N° 26487. El sistema de clasificación de las

plantas fue el de Carlos Linneo. En la colección del material se consideró la interacción genotipo-ambiente, que influye en el comportamiento fenotípico, por lo que consideramos la procedencia. Esta interacción sobre plantas, que crecen en la flora natural de un ecosistema, puede provocar, en el largo tiempo, cambios en la composición cuantitativa de alguno o de varios de los componentes bioquímicos de sus células; sin embargo, esta variabilidad dentro de una especie nativa de una región (o localidad específica), como fue la colección para el presente trabajo, no son significativamente diferentes.

Los lugares de procedencia de las muestras obtenidas para el atomizado fueron:

- Cuti-Cuti : Provincia de Leoncio Prado. Departamento de Huánuco (1500-2000 msnm).
- Pasuchaca: Provincia de Carabaya. Departamento de Puno (mayor a 3,500 msnm).
- Yacón: Provincia de Bagua. Departamento de Amazonas (2,200 msnm).
- Albahaca: Huachipa, Provincia de Lima. Departamento de Lima (400msnm).

Diagrama de flujo para obtención de deshidratados por atomización a partir de Hojas de las plantas estudiadas



2.- AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS. ANÁLISIS FITOQUÍMICO:

Las hojas de Albahaca, Cuti Cuti, Pasuchaca y Yacón fueron estabilizadas a través de un proceso de atomizado a partir del cual se procedió a la preparación de los extractos colocando la muestra en contacto con diferentes solventes de acuerdo al Método descrito por Ciulei y adaptado en el Laboratorio de Fitoquímica del Centro Pluridisciplinario de Investigaciones Químicas, Biológicas y Agrícolas de la Universidad estatal de Campinas –UNICAMP; tomado como referencia, por ofrecer mayor reproducibilidad y ser de fácil ejecución, a fin de determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, tanto libres como en la forma de glucósidos, procediéndose de la siguiente manera: Se pesaron 30g de cada muestra a investigar y se dejó macerando por 48 horas con 90 ml de éter etílico a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró, se midió el volumen y se calculó la concentración de sólidos totales, obteniéndose el primer Extracto en Éter Etílico (EEE). Luego se secó y se pesó el residuo sólido, obtenido de la extracción con éter etílico y se le agregó etanol en un volumen igual a tres veces el peso del residuo y se dejó en maceración durante 48 horas. Se filtró, se midió el volumen obtenido de la extracción y se calculó la concentración, obteniéndose el II Extracto en Alcohol Etílico (EAE). Se secó y pesó el residuo sólido extraído con alcohol; se agregó, finalmente, agua destilada en un volumen igual a tres veces el residuo sólido y se dejó en maceración durante 48 horas; se filtró, se midió el volumen y se calculó la concentración, obteniéndose el III Extracto en Agua Destilada (EAD); luego, se secó, se pesó y se desechó el residuo sólido. Posteriormente Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso fueron sometidos a la secuencia de pruebas fitoquímicas. Se utilizaron los siguientes reactivos: Acetato de plomo básico, Reactivo de Rosenhein (NaOH, 5%) y la Prueba de Shinoda para **flavonoides**; Anisaldehído -ácido sulfúrico para **azúcares, esteroides y ácidos terpénicos**; Cloruro férrico para **fenoles y ácidos hidroxámicos**; Hidróxido de sodio para **cumarinas volátiles**; Ninhidrina para **aminoácidos, sales de amonio y anilina**; Prueba de espuma para **saponinas esteroides y saponinas triterpenoides**, así como la prueba hemolítica para **saponinas**; Reactivo de Bertrand, Dragendorff, Mayer, Wagner (yodo-yoduro de potasio) para **alcaloides y aminos terciarios**; Reactivo de Bortranger para **naftoquinonas, antraquinonas, antronas o antranoles**; Reactivo de Gelatina -sal para **taninos**; Reactivo de Kedde para **g-lactonas y glicósidos cardíacos**; Reactivo de Liebermann-

Burchard para **esteroides y glicósidos triterpénicos**; Reactivo de Molish para **monosacáridos**; Vainillina -ácido clorhídrico para **catequinas**; Vainillina -ácido sulfúrico para **alcoholes superiores, fenoles esteroides y aceites etéreos.**,

3.- OBTENCIÓN DE ALCALOIDES SEGÚN EL MÉTODO DE SHARAPIN

La **primera fase**, consistió en pesar el material atomizado de la muestra vegetal, a la cual se le dejó macerando con HCl 2 N (proporción 1:4), durante 3 días (agitando por 2 horas cada día) para obtener un extracto acidulado y luego se procedió a realizar una filtración simple. Al filtrado se le adicionó diclorometano en la proporción de 1: 3, luego se procedió a agitar durante 8 horas.

La **segunda fase**, consistió en separar ambas fases: a) A la fase diclorometánica ácida se le adicionó hidróxido de sodio al 20%, se agitó por 4 horas, luego se separó la fase acuosa alcalina, y se procedió a llevar a un pH de 3.5-4 con HCL 37%, inmediatamente se adicionó diclorometano, agitándose durante 4 horas, para luego separar la fase diclorometánica. b) A la otra fase ácida se le alcalinizó adicionando amoníaco al 25% hasta llevarlo a un pH 9, luego se le adicionó diclorometano., agitándose por 8 horas; luego se separò la fase diclorometánica.

La **tercera fase** consistió en formar los cristales, para ello se preparó una mezcla de metanol/acetona en la proporción de 3:2; esta mezcla se le adicionó a la fase diclorometánica. Toda esta mezcla se somete a burbujeo de HCl gaseoso, con el cual se formó los cristales de alcaloides (el ácido clorhídrico gaseoso se generó al hacer reaccionar cloruro de sodio Q.P con ácido sulfúrico al 97%). Finalmente se recrystalizaron los alcaloides con metanol y acetona, lavándose los cristales con pequeñas cantidades de metanol y acetona, unas 10 veces.

4.- TOXICIDAD AGUDA (Método de los Probits).

Se evaluó la Toxicidad aguda de cada uno de los atomizados y el pool de alcaloides de: Albahaca, Cuti Cuti, Pasuchaca y Yacón, utilizando para ello: 200 ratones albinos cepa Nihs, distribuídos en ocho grupos de 25 animales. Estos subgrupos de 25 animales cada uno, fueron, a su vez, subdivididos en 5 grupos de 5 animales cada uno, a los cuales se les administró dosis crecientes de las sustancias, tanto de los atomizados, como del pool de los alcaloides de cada una de las plantas en estudio.

5.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE Animales Hiperglicémicos (diabetes experimental).

Se eligieron como animales de experimentación ratas albinas cepa Holtzman, provenientes del Instituto Nacional de Salud. Se formaron grupos de 5 ratas cada uno a los cuales se les provocó hiperglicemia mediante la administración, intraperitoneal, de Aloxano monohidratado marca Sigma cod. A7413-106., a la dosis de 130 mg/Kg. En total fueron 16 grupos.

Instrumentación

La glicemia fue determinada mediante tiras reactivas ACCU-CHEK® y leídas mediante el glucómetro respectivo ROCHE®. La sangre se obtuvo mediante un corte en la cola, que comprometía una de las venas marginales, evitándose la hemorragia, mediante compresión, este método permite usar muestras pequeñas de sangre, de unos pocos microlitros.

Evaluación del efecto hipoglicemiante:

Los animales fueron sometidos a las pruebas experimentales, 48 horas después de la administración de aloxano, momento en el cual se les tomó una prueba basal, de glicemia, para evaluar si el nivel de glucosa se encontraba por encima de 300 mg/dL (valor mínimo para considerar diabetes química) y, a todos aquellos animales que presentaron estos valores, se les administró las sustancias en estudio, por vía oral, mediante sonda rígida. Los controles sucesivos se efectuaron a la hora, dos, cuatro y 24 horas posteriores.

6.- ÉTICA EN EL MANEJO DE 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.

7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico, se utilizaron diversos procedimientos con el objeto de seleccionar el más adecuado para la presentación de los resultados. Dado el número de animales y el tiempo de observación, se prefirió la determinación de la correlación tiempo contra nivel de glicemia y la determinación de la ecuación de regresión correspondiente. El programa usado fue: **Vassae Stats, Richard Lowry, Vassar collage, Poughkeepsie, NY, USA.** Se eligió la relación lineal que, aunque no corresponde al ajuste más exacto, tiene pocas posibilidades de inducir a error. También se utilizó ANOVA y prueba t de Student.

8.- ESTUDIO GENÉTICO

El estudio propuesto fue determinar variaciones geográficas de los especímenes por medio del estudio de marcadores polimórficos del DNA. Para ello se utilizó la técnica llamada RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) que en teoría es una forma rápida de obtener segmentos de DNA que sirvan como marcadores de cada espécimen, escogiendo plantas medicinales obtenidas del circuito comercial, de distintos orígenes geográficos y tomando explantes de partes de la planta que se encuentran en pleno desarrollo. Para la determinación genómica se usó DNA, pues no es necesario tener el tejido específico relacionado a la producción de principios activos, sino cualquier parte de la planta. Nosotros hemos escogido meristemas para facilitar la obtención de mayor cantidad de células/peso, pues las células no están muy diferenciadas evitando mayor cantidades de metabolitos que puedan estorbar la extracción del DNA y porque, generalmente, son tejidos que están renovándose rápidamente, por lo tanto menos expuestas a contaminación.

Para la extracción de DNA se usaron muestras previamente atomizadas (usadas anteriormente para la marcha fitoquímica) así como muestras obtenidas de presentación comercial en mercados.

Las plantas usadas son:

- Albahaca: atomizado, mercado Ceres, Huachipa.
- Cuti-cuti: atomizado, Junín, Pasco.
- Pasuchaca: atomizado, Pasco, Cajamarca.
- Yacón: atomizado, Bagua, Carhuaz.

Extracción de ADN vegetal mediante el kit Genomic Wizard Promega

Para facilitar la extracción del DNA, las muestras previamente fueron congeladas a -20°C por una hora o más y luego fueron trituradas. Luego se usó el kit de extracción de DNA Genomic Wizard de Promega.

Procedimiento:

- Pesaje de 40 mg de muestra.
- Agregado de 600 ul de Solución de Lisis Nuclear y mezclado con vortex por algunos segundos.
- Incubación a 65°C por 30 minutos.
- Agregado de 3 ul de Solución de RNAsa, mezclando por inversión (2-5 veces).
- Incubación a 37°C por 30 minutos.
- Enfriamiento a temperatura ambiente. (aprox. 5 min.)
- Adición de 200 ul de Solución de Precipitación de Proteínas y se mezcló con vortex por 20 segundos.

- Centrifugación a 13,000 rpm. por 3 minutos.
- Transferencia del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. y se agregó 600 ml de isopropanol a temperatura ambiente.
- Mezclado por inversión.
- Centrifugación a 13,000 rpm por 1 minutos.
- Descarte del sobrenadante (Isopropanol).
- Adición de 600 ul de alcohol 70 % por inversión.
- Centrifugación a 13,000 rpm por 1 minutos.
- Eliminación del alcohol cuidadosamente, evitando remover el precipitado.
- Secado del precipitado al medio ambiente.
- Adición de 100 ul de Solución de Rehidratación de ADN e incubar a 65 °C por 1 hora.
- Alternativamente se puede rehidratar la mezcla a 4 °C toda la noche.

RESULTADOS

Los resultados constan en las tablas y gráficas que presentamos a continuación.

Tabla N° 1.- Identificación Taxonómica de las Plantas estudiadas.

Reino	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
FILO	Pteridophyta	Magnoliophyta	Angiospermas	Angiospermas
CLASE	Filices	Magnoliosida	Dicotyledonae	Magnoliopsida
ORDEN	Pteridales	Geraniales	Asterales	Lamiales
FAMILIA	Sinopteridaceae	Geraniaceae	Astereaceae	Lamiaceae
GÉNERO	Natholaena	Geranium	Smallanthus/ Polymna	Ocimum
ESPECIE	Natholaena nivea (Poir) Desv	Geranium lechleri Knuth	Smallanthus sonchifolius Polimniasonchifolius	Ocimum sanctum
NOMBRE común	Cuti-Cuti	Pasuchaca	Yacón, bacón., llakuma	Albahaca, Albaca

TABLA N° 2.- Estudio fitoquímico

Nombre Científico	Nombre Común	Tipo de Muestra	Proyecto
<i>Ocimum</i>	“Albahaca”	Atomizado	CONCYTEC
	“Pasuchaca”	Atomizado	CONCYTEC
<i>Notholaena nivea</i>	“Cuti-Cuti”	Atomizado	CONCYTEC
<i>Smallanthus sonchifolia</i>	“Yacón”	Atomizado	CONCYTEC

Item	Rvo/Ensayo	Albahaca	Pasuchaca	Cuti-Cuti	Yacón
01	GRASAS Y ACEITES	-	+	++	++
02	ALCALOIDES	+	+	+	+
03	LACTONAS Y COUMARINAS	+	++	+	+
04	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	+	-	-	-
05	CATEQUINAS	+	+	+++	+
06	RESINAS	+	-	+++	+
07	AZUCARES REDUCTORES	+	-	+	+
08	SAPONINAS DE TIPO ESTEROIDAL Y TRITERPENOIDES	-	+	+	+
09	FENOLES Y TANINOS	+	+	++	++
10	AMINOACIDOS LIBRES O AMINAS	+	-	-	+
11	QUINONAS	-	-	-	-
12	FLAVONOIDES	+	+	++	+
13	ANTOCIANIDINAS	+	+	+++	+
14	PRINCIPIOS AMARGOS	+	+	+	+
15	MUCILAGOS	+	+	-	+

TOXICIDAD AGUDA.

Albahaca.

En las tablas 3 y 4 y la gráfica N° 1, consignamos los datos correspondientes a la toxicidad aguda del Atomizado y el pool de alcaloides de la Albaca; apreciamos que el Atomizado de albaca, es atóxica en las dosis probadas, que según los criterios establecidos por Williams, para determinar la

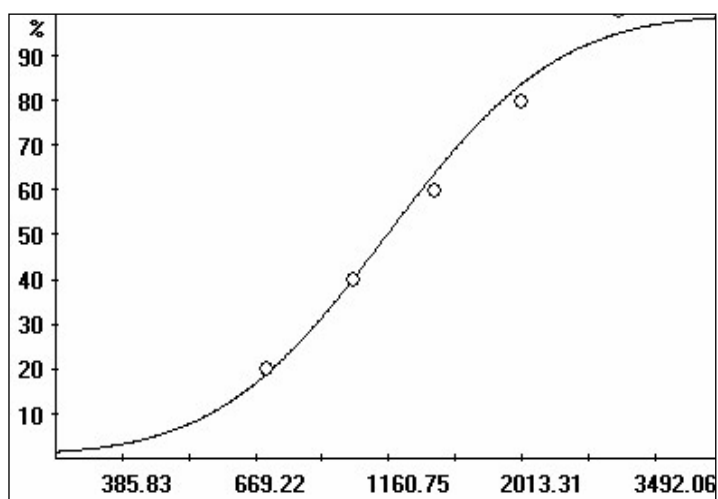
toxicidad de las plantas, la califica como relativamente inócua. La DL50 de los alcaloides de Albahaca, corresponde a 1,160.76 mg/kg. Con límites superior e inferior, al 95 %, de: 1593.81 y 845.36 mg/kg, respectivamente.

Tabla Nº 3.- Dosis Letal-50 del atomizado de Albahaca

DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
2000 mg/Kg	5	5	0	0/5
4000 mg/Kg	5	5	0	0/5
6000 mg/Kg	5	5	0	0/5
8000 mg/Kg	5	5	0	0/5
10000 mg/Kg	5	5	0	0/5

Tabla Nº 4.- Dosis Letal-50 de los Alcaloides de Albahaca

DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
700 mg/Kg	5	4	1	1/5
1000 mg/Kg	5	3	2	2/5
1400 mg/Kg	5	2	3	3/5
2000 mg/Kg	5	1	4	4/5
3000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. Nº 1

DL50=1160.7579
Lim. Sup. 1593.81
Lim. Inf. 845.36
Al 95 %

Dosis letal media de los alcaloides de albahaca

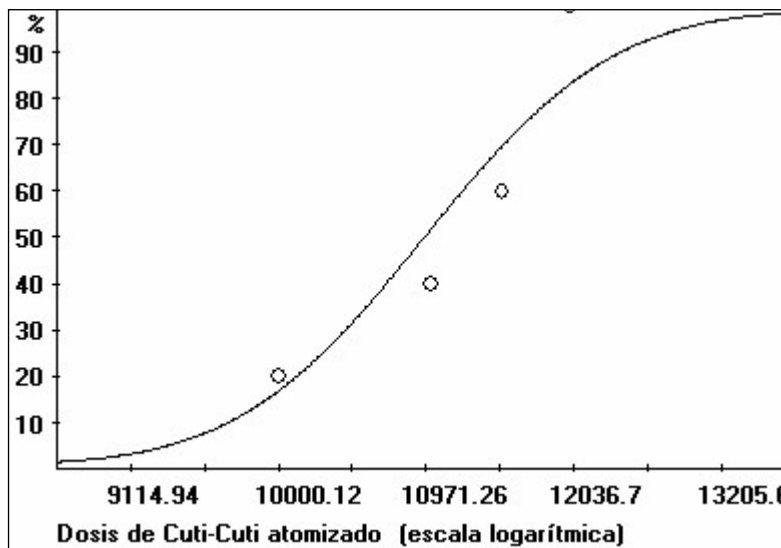
Cuti-Cuti

Los datos correspondientes a la toxicidad aguda del Atomizado y los alcaloides del Cuti-Cuti, son consignados en las tablas N° 5 y 6 y gráficas 2 y 3. Apreciamos que la DL50, del Atomizado, corresponde a 10,971.26 mg/kg, con límites superior e inferior, al 95 %, de: 11,574.87 y 10.399.13

mg/kg, respectivamente, lo que le confiere el carácter, a la planta, de prácticamente no tóxica, según los criterios de Williams. Los alcaloides son, aproximadamente, tres veces más tóxicos que el Atomizado.

Tabla N° 5.- Dosis Letal-50 del Atomizado de Cuti Cuti

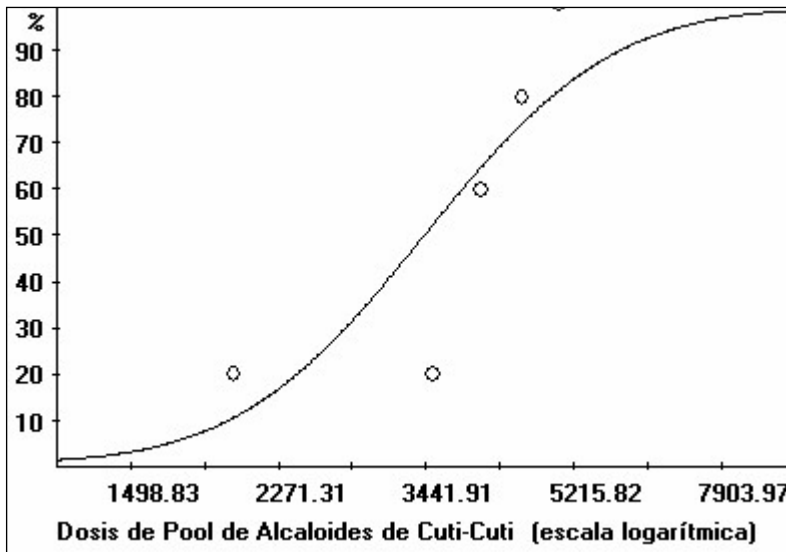
DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
8000 mg/Kg	5	5	0	0/5
10000 mg/Kg	5	4	1	1/5
11000 mg/Kg	5	3	2	2/5
11500 mg/Kg	5	2	3	3/5
12000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. N° 2
DL50=10971.26
Lim. Sup. 11574.87
Lim. Inf. 10399.13
Al 95 %

Tabla Nº 6.- Dosis Letal-50 del Pool de Alcaloides de Cuti- Cuti

DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
2000 mg/Kg	5	5	0	0/5
3500 mg/Kg	5	4	1	1/5
4000 mg/Kg	5	2	3	3/5
4500 mg/Kg	5	1	4	4/5
5000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. Nº 3
DL50= 3910.73
Lim Sup.4282.81
Lim. Inf. 3570.98
Al 95 %

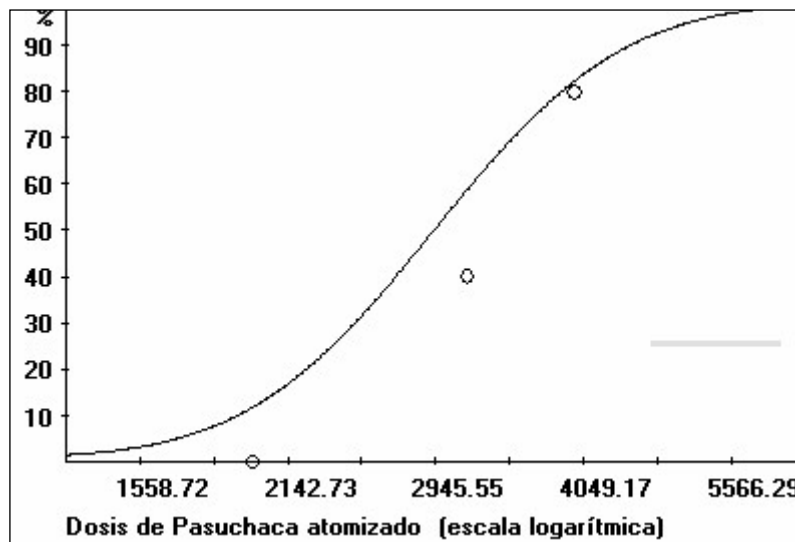
Pasuchaca.

Los datos correspondientes a la toxicidad aguda de la Pasuchaca, son consignados en las tablas 7 y 8 y las gráficas 4 y 5; podemos apreciar que la Pasuchaca, según los criterios de Williams, se ubica dentro de las plantas ligeramente tóxicas, siendo la DL50 del Atomizado, de:3367.69

kg, con límites superior e inferior, al 95 %, de 3794.78 y 2988.66 mg/kg, respectivamente. La DL50 de los alcaloides, de: 1160.65 mg/kg, con límites superior e inferior, al 95 %, de 1593.81 y 875.36 mg/kg, respectivamente.

Tabla N° 7.- Dosis Letal-50 del Atomizado de Pasuchaca

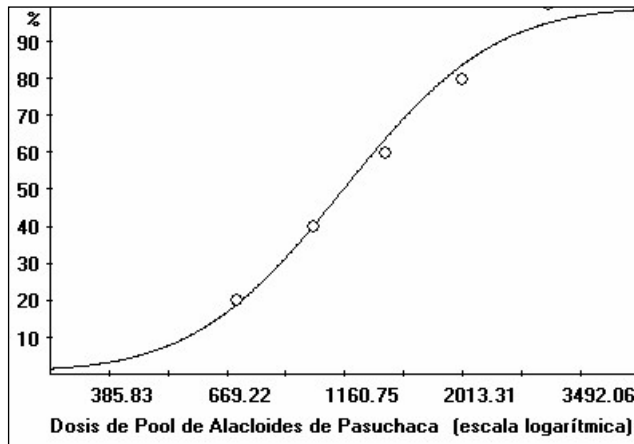
DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
1984 mg/Kg	5	5	0	0/5
2500 mg/Kg	5	4	1	1/5
3149 mg/Kg	5	3	2	2/5
3967 mg/Kg	5	1	4	4/5
5000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. N° 4
DL50: 3367.69
Lim Sup. 3794.78
Lim. Inf. 2988.66
Al 95 %

Tabla N° 8.- Dosis Letal-50 del Pool de Alcaloides de Pasuchaca

DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
700 mg/Kg	5	4	1	1/5
1000 mg/Kg	5	3	2	2/5
1400 mg/Kg	5	2	3	3/5
2000 mg/Kg	5	1	4	4/5
3000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. N° 5
DL50: 1160.65
Lim. Sup. 1593.81
Lim. Inf. 845.36
Al 95 %

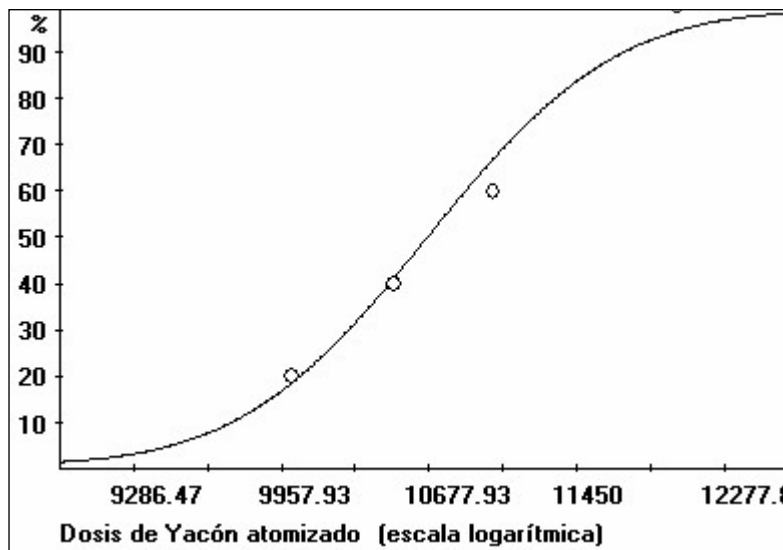
Yacón

Los datos correspondientes a la toxicidad aguda del Yacón, son consignados en las tablas 9 y 10 y en las gráficas 6 y 7; apreciamos que la planta puede ser catalogada como prácticamente no tóxica, según los criterios establecidos por Williams. La DL50 del Atomizado, corresponde a: 10,677.94 mg/kg, con límites superior e inferior, al 95 %, de:

11,145.12 y 10,280.34 mg/kg, respectivamente. La DL50 de los alcaloides, corresponde a: 1,589.19 mg/kg, con límites superior e inferior, al 95 %, de: 1,907.40 y 1324.92 mg/kg, respectivamente. Como en todas las plantas estudiadas, los alcaloides poseen mayor toxicidad que los extractos totales de las plantas.

Tabla Nº 9.- Dosis Letal-50 del Atomizado de Yacón

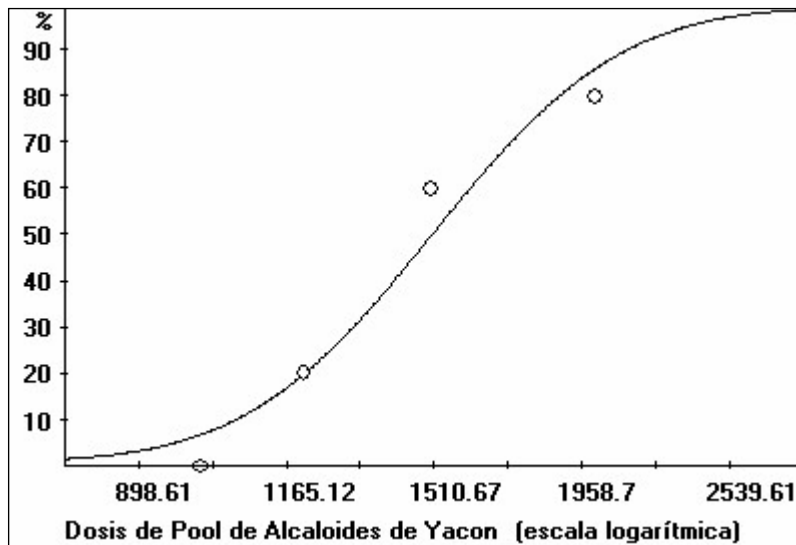
DOSIS	Nº de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
8000 mg/Kg	5	5	0	0/5
10000 mg/Kg	5	4	1	1/5
10500 mg/Kg	5	3	2	2/5
11000 mg/Kg	5	2	3	3/5
12000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. Nº 6
DL50: 10677.94
Lim. Sup. 11145.12
Lim. Inf. 10280.34
Al 95 %

Tabla N° 10.- Dosis Letal-50 del Pool de Alcaloides de Yacón

DOSIS	N° de animales	Vivos (24 h)	Muertos (24h)	Total
1000 mg/Kg	5	5	0	0/5
1200 mg/Kg	5	4	1	1/5
1500 mg/Kg	5	2	3	3/5
2000 mg/Kg	5	1	4	4/5
3000 mg/Kg	5	0	5	5/5



Gráf. N° 7
DL50: 1589.70
Lim. Sup.1907.40
Lim. Inf. 1324.92
Al 95 %

**Tabla N° 11.- Grupo Control: Agua destilada 3ml/Kg
Valores de Glicemia, según tiempo**

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, por tiempo en horas				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	585	600	600	600	600
Cabeza	600	495	600	600	600
Lomo	600	490	600	600	600
Cola	600	530	560	450	480
Pata	538	530	587	486	417
Promedio	584.6	529	589.4	547.2	539.4

Correlación $r = -0.183$ $p > 0.10$

Regresión $y = 565 - 1.14x$

Conclusión: En el grupo control no hay variaciones significativas en la glicemia durante las 24 horas de observación.

Tabla N° 12.- Variaciones de Glicemia por Acción de Atomizado-1000,

de Albahaca, Según Tiempo	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo en horas				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	+600	286	202	140	400
Cabeza	343	316	305	301	+600
Lomo	+600	310	250	200	300
Cola	+600	416	391	396	315
Pata	+600	402	351	285	330
Promedio	548.6	346	299.8	264.4	389

Correlación $r = -0.019$ $p > 0.10$

Regresión $y = 371.32 - 0.272 x$

Conclusión: No hay modificaciones significativas de la glicemia desde la primera hora y durante las 24 horas de observación, por acción del Atomizado de Albahaca.

Tabla N° 13.- Variación de Glicemia por Acción del Pool de Alcaloides-250, de Albahaca, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	600	525	500	389	283
Cabeza	600	500	432	300	190
Lomo	352	200	179	153	114
Cola	500	350	320	300	120
Pata	520	359	299	270	135
Promedio	514.4	386.8	346	282.4	168.4

Correlación $r=-0.642$ $p<0.001$

Regresión $y= 405 -10.56x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, que persiste durante las 24 horas de observación.

Tabla N° 14.- Variación de Glicemia por Acción del Pool de Alcaloides-500, de Albahaca, Según tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	590	490	430	400	380
Cabeza	570	446	358	290	471
Lomo	493	570	600	600	329
Cola	558	600	460	440	430
Pata	600	460	455	544	600
Promedio	562.2	513.2	460.6	454.8	442

Correlación $r=-0.297$ $p>0.10$

Regresión $y= 505.27 -3.018x$

Conclusión: No se aprecia disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, hasta las 24 horas de observación

Comparación de los grupos Alcaloides-250 y Alcaloides-500 y éstos con el extracto atomizado, para la albahaca. No se ha podido demostrar un efecto claro sobre la glicemia. Ya que sólo con los alcaloides totales a la dosis de 250 mg/Kg, se pudo apreciar algún efecto, que no se repitió con dosis mayores ni tampoco con el extracto atomizado.

Tabla N° 15.-Variación porcentual de la Hiperglicemia Aloxánica, por acción de Albahaca

Tiempo	CONTROL	Atomizado	Alcaloides-250	Alcaloides-500
0 H	100	100	100	100
1 HORA	90.48	63.06	75.19	91.28
2 HORA	101.16	54.64	67.26	81.92
4 HORA	93.60	48.19	54.89	80.89
24 Hs	92.26	70.98	32.73	78.61

Tabla N° 16.- Variación de la Hiperglicemia por Acción de la Albahaca

Grupo	Tiempo en horas				
	Basal (0)	1	2	4	24
Control	585	529	591.4	547.2	539.4
Atomizado	548.6	346	299.8	264.4	389.4
Alc-250	514.4	386.8	346	282	168.4
Alc.500	562.2	513.2	460.6	454.8	442

Tabla N° 17.- Variaciones de Hiperglicemia por Acción del Atomizado, de Cuti Cuti, Según tiempo

<i>Ratas</i>	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo				
	<i>Basal con Aloxano</i>	<i>1H</i>	<i>2H</i>	<i>4H</i>	<i>24H</i>
Blanco	380	311	230	124	61
Cabeza	520	403	252	145	92
Lomo	484	402	375	215	114
Cola	509	336	282	173	91
Pata	425	228	203	151	105
Promedio	463.8	336	268.4	161.6	92.6

Correlación $r=-0.712$ $p<0.001$

Regresión $y= 332.68 -11.008 x$

Conclusión: Hay una disminución significativa de los niveles de glicemia, desde la primera hora y durante las 24 horas de observación.

Tabla N° 18.- Variaciones de Hiperglicemia Aloxánica por Acción del pool de alcaloides-250 de Cuti-Cuti

<i>Ratas</i>	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo				
	<i>Basal con Aloxano</i>	<i>1H</i>	<i>2H</i>	<i>4H</i>	<i>24H</i>
Blanco	451	337	136	125	90
Cabeza	600	600	310	293	239
Lomo	600	490	281	220	120
Cola	600	510	220	215	132
Pata	600	383	230	180	110
Promedio	570.2	464	235.4	206.6	138.2

Correlación $r=-0.617$ $p<0.001$

Regresión $y= 398.4 -12.282x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, y que persiste durante las 24 horas de observación.

Tabla Nº 19.- Variaciones de Hiperglicemia por Acción del Pool de alcaloides-500 de Cuti Cuti, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	600	300	225	200	82
Cabeza	389	180	172	120	102
Lomo	520	215	193	153	95
Cola	375	166	176	120	97
Pata	600	570	458	342	111
Promedio	496.8	286.2	244.8	187	97.4

Correlación $r=-0.588$ $p<0.001$

Regresión $y= 324.7 -10.434x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, y que persiste durante las 24 horas de observación momento en el cual todos los animales habían alcanzado valores normales.

Tabla Nº 20.- Variación porcentual de la Glicemia por Acción de Cuti-Cuti

Tiempo	CONTROL	Atomizado	Alcaloides-250	Alcaloides-500
0H	100	100	100	100
1 HORA	90.48	72.47	81.37	57.60
2 HORA	101.16	57.89	41.28	49.27
4 HORA	93.60	34.85	36.23	37.64
24 Hs	92.26	19.97	24.23	19.60

Tabla Nº 21.- Variaciones de Hiperglicemia por Acción del Cuti cuti, Por Grupos, Según Tiempo

Grupo	Tiempo en horas				
	Basal (0)	1	2	4	24
Control	585	529	591.4	547.2	539.4
Atomizado	463.6	336	268.4	161.6	92.6
Alc-250	570.2	464	235.4	206.6	138.2
Alc-500	496.8	286.2	244.8	187	97.4

Comparación de los grupos Alc-250 y Alc-500 mg/Kg)

La variación de la glicemia a las 24 horas alcanzó una diferencia de 40.8 mg% entre las dos dosis. La significación estadística de $p= 0.081$ es explicable por el pequeño número de animales y por que ya la mayoría se había estabilizado en los valores normales de glicemia. Puede estimarse que la dosis de 500 mg/Kg por vía oral representa un efecto cercano al máximo y puede servir para estudiar el mecanismo de acción y apreciar el perfil farmacodinámico de los alcaloides.

Grafica Nº 9. VARIACION DE LA GLICEMIA POR ACCION DE CUTI CUTI

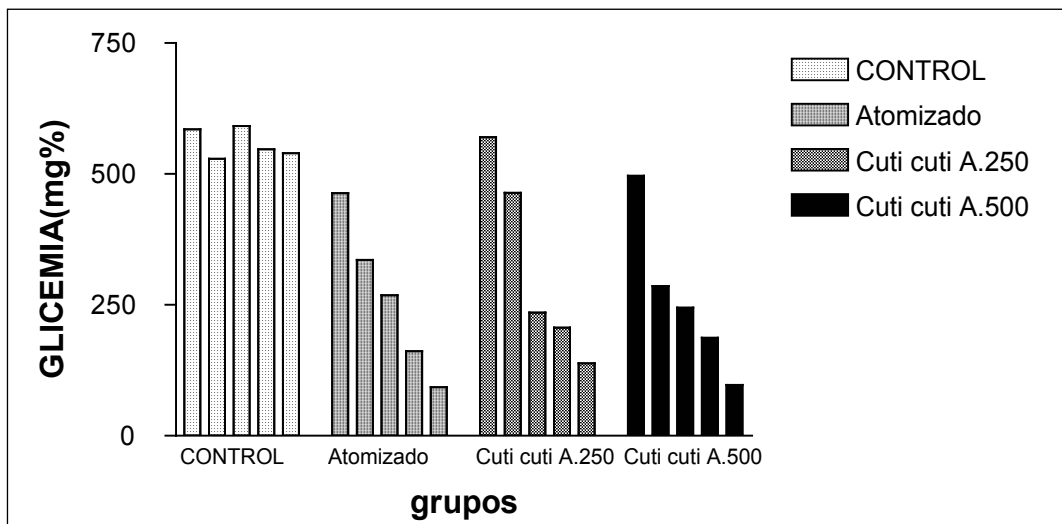


Tabla Nº 22.- Variación de Hiperglicemia por Acción del Atomizado de Pasuchaca, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	435	232	71	78	121
Cabeza	330	187	137	145	87
Lomo	522	313	79	78	119
Cola	600	472	88	80	101
Pata	600	303	94	89	128
Promedio	497.4	301.4	93.8	94	111.2

Correlación $r = -0.422$ $p = 0.018$

Regresión $y = 269.68 - 8.08x$

Conclusión: Hay una disminución significativa de los niveles de glicemia, desde la primera hora y durante las 24 horas de observación pero no se observa que sigan una correlación lineal. La comparación entre los valores inicial y después de las 24 horas da una disminución de la glicemia -386.2 ± 107.33 estadísticamente significativa.

Tabla Nº 23.- Variación de Hiperglicemia por Acción del Pool de alcaloides-250 de Pasuchaca, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo en horas				
	Basal con Aloxano	1	2	4	24
Blanco	600	323	293	231	110
Cabeza	600	495	204	105	114
Lomo	493	377	315	108	129
Cola	600	401	402	253	152
Pata	513	430	298	145	80
Promedio	561.2	405.2	302.4	168.4	117

Correlación $r = -0.675$ $p < 0.001$

Regresión $y = 389.63 - 12.709x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, y que persiste durante las 24 horas de observación.

Tabla N° 24.- Variación de Hiperglicemia por Acción de pool de Alcaloides-500 de Pasuchaca, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo en horas					
	Basal con Aloxano	1	2	4	24	OBS
Blanco	309	205	190	51	46	Murio 48 h
Cabeza	492	450	420	310	600	Murio 48 h
Lomo	600	282	192	64	52	
Cola	315	200	123	83	74	
Pata	336	254	230	150	280	
Promedio	410.4	278.2	231	131.6	210.4	

Correlación $r=-0.208$ $p=0.154$

Regresión $y= 275.38 -3.72x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, pero a las 24 horas la glicemia alcanza valores muy bajos con excepción de un caso y se produce mortalidad de 40 %.. lo que hace que la correlación y la regresión pierdan significación estadística para el número de animales empleado. Con relación a la curva de probits, para mortalidad en ratones se esperaba que con la dosis de 500 mg/kg se produjera, en las ratas, una mortalidad cercana al 5% o mayor, por tratarse de animales intoxicados con aloxano.

Tabla N° 25.- Variación porcentual de la Glicemia por acción de Pasuchaca

Tiempo	CONTROL	Atomizado	Alcaloides- 250	Alcaloides- 500
0 H	100	100	100	100
1 HORA	90.48	60.6	72.2	67.78
2 HORA	101.16	18.85	53.88	56.28
4 HORA	93.60	18.9	30	32
24 Hs	92.26	22.35	20.8	51.26

Tabla N° 26.- Variación de Hiperglicemia por Acción de Pasuchaca, Por Grupos, Según Tiempo

Grupo	Tiempo en horas				
	Basal (0)	1	2	4	24
Control	585	529	591.4	547.2	539.4
Atomizado	497.4	301.4	93.8	94	111.2
Alc-250	561.2	405.2	302.4	168.4	117
Alc-500	410.4	278.2	231	131.6	210.4

Comparación de los grupos Alc-250 y Alc-500

La dosis de 250 mg por Kg produjo una disminución significativa de la glicemia. Al elevar la dosis a 500 mg/Kg, las cifras de glicemia alcanzaron niveles muy bajos (salvo un caso en que aumentó) y se produjo mortalidad de 40%, antes de las 48 horas.. Puede estimarse que la dosis de 250 mg/Kg por vía oral, representa un efecto cercano al máximo, y puede servir para estudiar el mecanismo de acción y apreciar el perfil farmacodinámico de los alcaloides

Grafica N° 10 .VARIACION DE LA GLICEMIA POR ACCION DE PASUCHACA

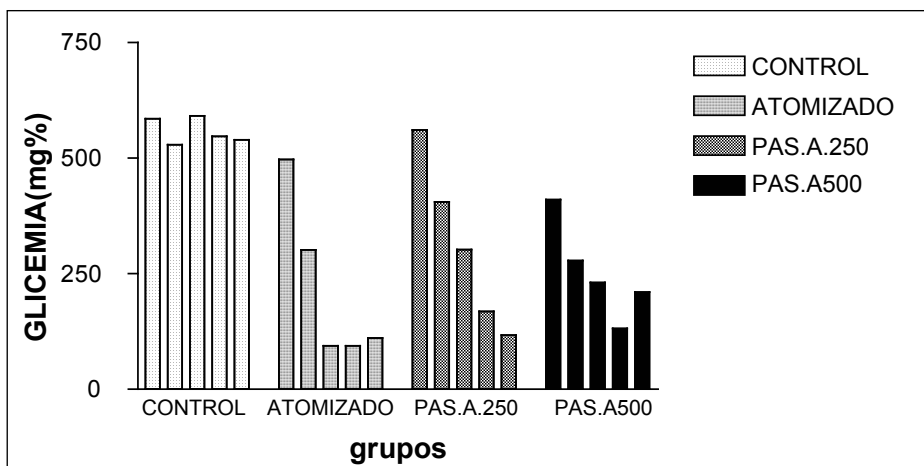


Tabla N° 27.- Variación de Hiperglicemia por Acción de Atomizado-1000 de Yacón, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo en horas				
	Basal con Aloxano	1	2	4	24
Blanco	425	320	143	72	104
Cabeza	357	289	132	49	92
Lomo	484	303	98	60	61
Cola	509	408	73	98	102
Pata	416	310	89	101	70
Promedio	438.2	326	107	76	85.8

Correlación $r = -0.512$ $p < 0.01$

Regresión $y = 260.22 - 8.65x$

Conclusión: Hay una disminución significativa de los niveles de glicemia, desde la primera hora y durante las 24 horas de observación.

Tabla N° 28.- Variación de Hiperglicemia por Acción de Pool de Alcaloides-250 de Yacón, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo en horas				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	600	430	209	190	110
Cabeza	600	320	160	150	101
Lomo	529	298	189	181	134
Cola	485	250	220	189	120
Pata	581	232	201	192	95
Promedio	561	306	195.8	180.4	112

Correlación $r = -0.588$ $p < 0.001$

Regresión $y = 336.23 - 10.58x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, y que persiste durante las 24 horas de observación.

Tabla N° 29.- Variación de la Hiperglicemia por Acción del Pool de alcaloides-500 de Yacón, Según Tiempo

Ratas	Glicemia en mg/100 ml, según tiempo en horas				
	Basal con Aloxano	1H	2H	4H	24H
Blanco	420	400	403	314	367
Cabeza	600	301	312	115	86
Lomo	600	425	292	210	103
Cola	600	400	391	295	120
Pata	580	510	401	200	101
Promedio	560	407.2	359.8	226.8	155.4

Correlación $r = -0.671$ $p < 0.001$

Regresión $y = 416.39 - 11.961x$

Conclusión: Hay disminución significativa de la glicemia desde la primera hora, y que persiste durante las 24 horas de observación momento en el cual cuatro de los cinco animales habían alcanzado valores normales.

Tabla N° 30.- Variación porcentual de la Glicemia por acción de Yacón

Tiempo	CONTROL	Atomizado	Alcaloides 250	Alcaloides 500
0H	100	100	100	100
1 HORA	90.48	74.39	54.74	72.71
2 HORA	101.16	24.41	35.02	64.25
4 HORA	93.60	17.34	32.27	40.5
24 Hs	92.26	19.58	20.03	27.75

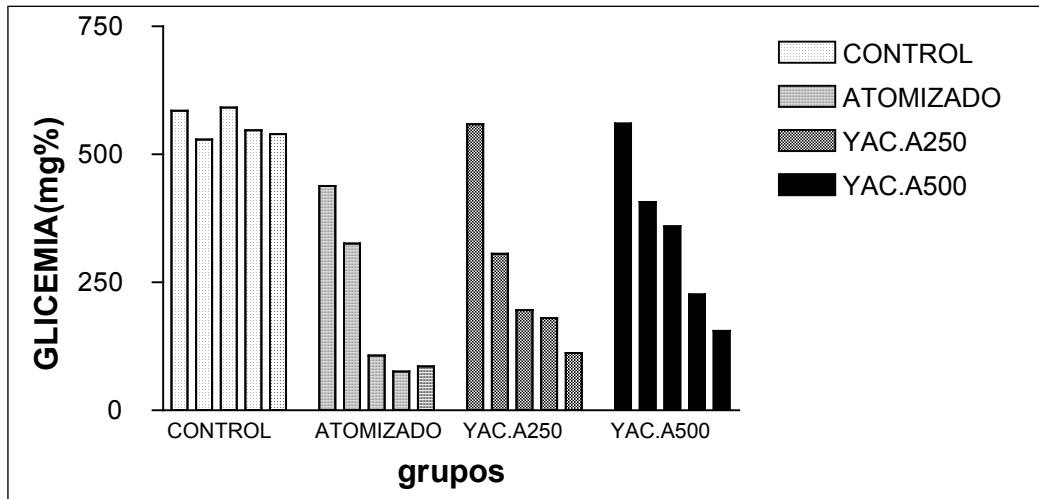
Tabla Nº 31.- Variaciones de Hiperglicemia por Acción del Yacón, por Grupos, Según Tiempo

Grupo	Tiempo en horas				
	Basal (0)	1	2	4	24
Control	585	529	591.4	547.2	539.4
Atomizado	438.2	326	107	76	85.8
Alc-250	559	306	195.8	180.4	112
Alc-500	560	407.2	359.8	226.8	155.4

Comparación de los grupos Alc-250 y Alc-500

La variación de la glicemia a las 24 horas no alcanzó una diferencia significativa entre las dos dosis. El resultado es explicable por el pequeño número de animales y por que en ambos casos ya la mayoría se había estabilizado en los valores normales de glicemia. Puede estimarse que la dosis de 500 mg/Kg por vía oral representa un efecto cercano al máximo y puede servir para estudiar el mecanismo de acción y apreciar el perfil farmacodinámico de los alcaloides.

Gráfica Nº11.-VARIACION DE LA GLICEMIA POR ACCION DE YACON (HOJAS)

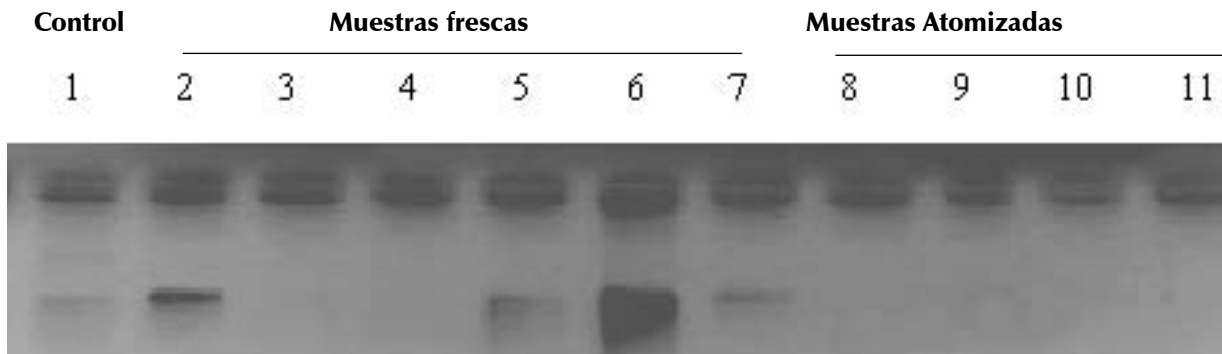


4.- Estudio genético:

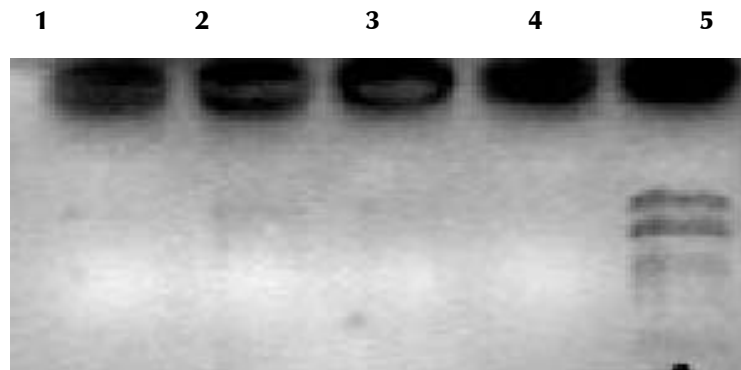
Resultados

A) Obtención de DNA de diferentes plantas medicinales. Electroforegrama de 10 µl de DNA teñido con bromuro de etidio, luego de la utilización de 40 mg de tejido con el kit de extracción Genome Wizard™, los resultados fueron:

1) DNA Control 240 ng, 2) Pasuchaca de cerro de Pasco (500 ng), 3) Pasuchaca de Cajamarca 1 (imperceptible), 4) Cuti-cuti de Junín, (imperceptible), 5) Albahaca de Ceres (300 ng), 6) Albahaca de Huachipa (1 ng), 7) Cuti-cuti de Pasco (250 ng), 8) Albahaca atomizado, (imperceptible), 9) Cuti-cuti, atomizado, (imperceptible), 10) Pasuchaca, atomizado, (imperceptible), 11) Yacón atomizado (imperceptible).



B) Obtención de DNA de diferentes plantas medicinales. Electroforegrama de 10 ml de producto (DNA) teñido con bromuro de etidio, luego de la utilización de 40 mg de tejido con el kit de extracción Genome Wizard™. 1) Cuti-cuti de Junín (20 ng), 2) Pasuchaca de Cajamarca 2 (50 ng), 3) Yacón de Bagua (20 ng), 4) Yacón de Carhuaz (imperceptible), y 5) Control (500 ng)



Lista de explantes tratados para DNA (producto total

estimado de los 100 µl finales)

Albahaca, Mercado Ceres (total 3 µg)
 Albahaca, Huachipa (total 10 µg)
 Albahaca atomizado, (imperceptible)
 Cuti-cuti, Junín 1 (imperceptible)

Cuti-cuti, Junín 2 (total 200 ng)
 Cuti-cuti, Cerro de Pasco (total 2.5 µg)
 Cuticuti atomizado, (imperceptible)
 Pasuchaca, Cerro de Pasco (total 5 µg)
 Pasuchaca, Cajamarca 1 (imperceptible)
 Pasuchaca, Cajamarca 2 (total 500 ng)
 Yacón atomizado, (imperceptible)
 Yacón, de Bagua (total 200 ng)
 Yacón, Carhuaz (imperceptible)

DISCUSIÓN

Los estudios, efectuados con las plantas con acción hipoglicemiante, confirman y amplían los resultados obtenidos, anteriormente, y que fueron motivo de la presentación del proyecto a CONCYTEC.

Los estudios de toxicología, confirman la poca toxicidad aguda de las plantas, objeto del presente estudio. Igualmente, nos muestran la mayor toxicidad de los alcaloides en relación al atomizado respectivo; siendo 3 a 5 veces más tóxicos los alcaloides. Con la excepción de la Albahaca, que resultó poco efectiva en la reducción de la hiperglicemia provocada por el aloxano, los extractos atomizados parecen ser más efectivos que el pool de alcaloides totales, para reducir la hiperglicemia aloxánica, efecto que persistió las 24 horas, tiempo máximo del control de la glicemia, realizado en laboratorio. Es importante recalcar que tanto los extractos atomizados como el pool de alcaloides de Pasuchaca, Cuti-cuti y Yacón, redujeron la hiperglicemia hasta normalizarla, equivalente al 20 % del valor inicial de la glicemia. Nos llama la atención, los pobres resultados que hemos encontrado con la Albahaca morada, hecho que contrasta con los resultados obtenidos por los estudios realizados en Cuba (8); en nuestro caso, como puede verse en las gráficas presentadas, sólo encontramos un discreto efecto hipoglicemiante, con los alcaloides a la dosis de 250 mg/kg de peso, sin que los valores de la glicemia lleguen a normalizarse; también, debemos indicar que los estudios realizados en Cuba, fueron hechos en ratones, en tanto que los nuestros fueron realizados en ratas. De todas maneras, creemos que se requiere mayores estudios al respecto. Los resultados del presente trabajo, ratifican la necesidad de profundizar los estudios, en busca de los mecanismos de acción y del perfil farmacológico y toxicológico de las plantas evaluadas. Si consideramos que el modelo de producción de hiperglicemia, utilizado por nosotros, es el de diabetes química por aloxano, sustancia que destruye las células beta del páncreas, encargadas de producir insulina, a priori, podríamos inferir que estas plantas protegen al páncreas de la acción tóxica del aloxano; sin embargo, en estudios anteriores realizados, por nosotros, con Cuti Cuti (3), encontramos que esta planta previene la hiperglicemia aloxánica y recupera, hasta límites normales, la glicemia incrementada por acción del aloxano, cuando suponemos que las células beta ya fueron destruidas, como sería el caso del presente trabajo. Lo expuesto, nos hace plantear la hipótesis de que estas plantas favorecerían la utilización de la glucosa por parte de las células del organismo, con un efecto parecido a la insulina. Nos proponemos, en trabajos posteriores, dilucidar este mecanismo, realizando,

simultáneamente, dosaje de insulina, conjuntamente con estudio histopatológico del páncreas de los animales de experimentación.

De las plantas estudiadas, los resultados para la ALBAHACA no han confirmado la presencia de un compuesto de efecto hipoglicemiante seguro. La variedad para la cual, en la literatura se ha reportado, el efecto, no se encuentra con facilidad entre nosotros y no se pudo demostrar efecto concluyente para el extracto atomizado ni para los alcaloides. Sin embargo, éstos demostraron un efecto a la dosis de 250 mg/Kg, no confirmados con la dosis mayor. Estos resultados contradictorios pueden deberse a la presencia de principio activo muy lábil lo que obliga a un replanteamiento de la metodología utilizada.

Para la PASUCHACA, el CUTICUTI y el YACÓN se ha confirmado la presencia de principios hipoglicemiantes, que actúan a dosis alejadas de las tóxicas, que se pueden extraer y conservar con el método de la atomización y purificar con los métodos empleados para los alcaloides.

Si bien todavía falta avanzar en los estudios, contamos con información suficiente para identificar los principios activos, completar el estudio del perfil farmacológico, con sustancias ya purificadas y con los datos suficientes para plantear el estudio de los mecanismos de acción y, eventualmente, los estudios clínicos de fase 1.

Nuestro protocolo para este primer ensayo exploratorio, del estudio genético, ha rendido diferentes cantidades, que evidentemente dependen del explante usado para la extracción de DNA de cada especie. Debemos comentar que no se ha seguido el protocolo exacto de Promega, que recomienda el uso de hojas frescas y luego se les introduce dentro de nitrógeno líquido durante algunos minutos. La única planta fresca que tuvimos fue la albahaca.

Podemos ver que la forma atomizada de las 4 plantas, en ningún caso produjo DNA en cantidades perceptibles, lo que nos indica que esta presentación no es apropiada para extraer DNA. La forma comercial de Pasuchaca y cuti-cuti que procesamos, era seca, mientras que el yacón usado era de tubérculo. En estas plantas no era posible tener hojas, que es un tejido de fácil obtención de DNA, comparado con otros explantes de tubérculo, tallo o segmentos de briofitas. Esto redundo en la baja obtención de DNA para pasuchaca, cuti-cuti y yacón. La alternativa propuesta para el nitrógeno líquido para poder romper las paredes celulares fue un ciclo de congelación /calentamiento.

La cantidad de DNA para algunas plantas sería suficiente para proseguir el proceso de determinación genética usando marcadores RAPD con la tecnología de PCR (2-20 ng). Sin embargo, para tener mayores cantidades de DNA y mejor repetitividad vamos, en lo posible, a obtener como explantes de hojas frescas que, como vemos en albahaca, es la que produce mayor DNA. Igualmente se buscará utilizar nitrógeno líquido debido que se asume contribuye a la mejor eficiencia de ruptura celular, junto con tratamiento de proteinasa K y celulasa.

Hemos obtenido primero (series OP y AM de la compañía Operon Technologies Inc, Huntsville, Alabama, USA) para experimentos de RAPD, generosamente donados por el Centro Internacional de la Papa, los que serán utilizados para buscar la diferenciación genotípica mediante esta técnica.

CONCLUSIONES

El presente estudio, realizado sobre cuatro plantas con efecto hipoglicemiante, nos permite arribar a las siguientes conclusiones:

1. El método utilizado para inducir hiperglicemia con Alozano, es eficaz y adecuado para evaluar plantas medicinales con acción hipoglicemiante
2. Tanto los extractos atomizados como el pool de alcaloides totales de Cuti cuti, Pasuchaca y hojas de Yacón, son eficaces para reducir la hiperglicemia inducida por Alozano, en ratas, llegando a normalizar la glicemia, hasta por un período de 24 horas (tiempo máximo controlado)
3. La Albahaca morada, el Cuti Cuti, la Pasuchaca y el Yacón, son plantas, prácticamente atóxicas, según los criterios de Williams
4. Es necesario dirigir la investigación farmacológica y química al aislamiento e identificación de las sustancias responsables de la actividad hipoglucemiante, así como a la elucidación del o de los mecanismos de dicha actividad en estas plantas.
5. Los alcaloides constituyen los principios activos responsables del efecto hipoglicemiante de las 4 plantas estudiadas.

AGRADECIMIENTO

A Concytec, por haber subvencionado el presente trabajo y a la Universidad de San Martín de Porres, sin cuyo aporte no hubiera sido posible la realización de la presente investigación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Alfaro L, C; Ugarte R,K; Belsuzari P,I.- Efecto normoglicemiante del tubérculo y la hoja de yacón (*Smallantus sonchifolius*) en pacientes diabéticos Tipo 2.- "Horizonte Médico, 2004, vol 4 (1):54-65.
- 2) Asociación Latinoamericana de Diabetes. Guías ALAD 2000 para el Control, diagnóstico y manejo de Diabetes Mellitus Tipo 2 con medida basada en evidencias.2000
- 3) Castañeda,B; Manrique,R; Ibáñez,L. Efecto Hipoglicemiante y sobre la lipidemia de *Notholaena nivea*, "Cuti-Cuti" . Horizonte Médico, 2004, vol 4 (1): 9-22. ISSN 1727-558X.
- 4) Comisión of the European Communities. Annex to Comission Directive 92/69/EEC of 31 July 1992 adapting to technical progress for the seventeenth 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 1992; L 383 A) 35: 110-2; 1992.
- 5) CUBA. Ministerio de Salud Pública. Regulaciones metodológicas para la evaluación preclínica de medicamentos. La Habana. Editorial Ciencias Médicas: 3-4 1993.
- 6) CYTED. Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos . Colombia. (2000)
- 7) Day C. Bailey CJ. Hypoglycaemic agents from traditional plant treatments for diabetes. Int Ind Biotech 1988;8(3). 5-8
- 8) Déas R, M; Seuc J, A; González S, R.- Estudio del efecto hipoglicemiante del *Ocimum sanctus* L. (albahaca morada) con el uso de un ensayo biológico en ratones. Rev Cubanade Plant Med 1997; (1): 15-18
- 9) Ibáñez V. L Importancia de la Investigación en Plantas Medicinales. FOLIUM Año XII N°34 . Instituto de Química. UNAM –MÉXICO; 2002.
- 10) 3- Kim OK. Lee EB. The screening of plants for hypoglycemic Action in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats. Korean J Pharmacog 1992; 23 (2): 117-9
- 11) Lassùs Carlos. Vademecum Farmacoterapeutico Biblioteca nacional del Perú Lima 2005.
- 12) San Feliciano Martín Arturo, 1990. Iatroquímica La creación de sustancias para la Medicina. Ediciones Universidad de Salamanca . ISBN: 84-7481-548-7 Impreso en España.
- 13) Sánchez G, E; Leal L, I; Fuentes H, L; Rodríguez F, C.- Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca).- Rev Cubana Farm v 34 n 3 Ciudad de la Habana sep-dic 2000.