

Efecto hipoglicemiante y sobre la lipidemia de Notholaena Nivea, "Cuti -Cuti".

Dr. Castañeda, C. B.¹, Dr. Manrique M. R.², Ms. Sc. Ibañez V. L.³.

Resumen

Se evaluó la toxicidad aguda, oral, en ratones y el efecto metabólico sobre glicemia y lipidemia del extracto metanólico de Notholaena Nivea, "Cuti-Cuti", al 10% en modelos del CYTED.

El efecto sobre la glicemia fue evaluado en ratas normo e hiperglicémicas, frente a grupos controles a los cuales se les administró suero fisiológico. La hiperglicemia fue inducida con aloxano, administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 150 mg/kg de peso. Utilizamos 60 ratas distribuidas en tres grupos (I, II y III), de 20 ratas cada uno. Todos los animales fueron sometidos a ayuno de 24 horas, previo al inicio de los experimentos. El grupo I fue subdividido en dos subgrupos de 10 animales cada uno y recibieron suero fisiológico o extracto de Cuti-Cuti, para observar su efecto sobre la glicemia normal. El segundo grupo recibió aloxano a la dosis de 150mg/kg de peso, vía intraperitoneal, para inducir hiperglicemia experimental; los valores de glicemia y lipidemia fueron determinados a la 1, 2, 4 y 24 horas. Al tercer grupo de ratas se le administró extracto aloxano por vía intraperitoneal a la dosis de 150 mg/kg de peso;

cuando los niveles de glicemia eran superiores a 300 mg%, administramos a 10 ratas suero fisiológico y a otras 10 Cuti-Cuti a la dosis de 250 mg/kg de peso, vía oral. La determinación de la glicemia, colesterol total, HDL y triglicéridos fue realizada en el autoanalizador bioquímico Vitalab Selectra 2.

La DL50 fue de 11,099 con un límite superior e inferior al 95% de 13,009.72 y 9,470.59, respectivamente. Encontramos que la Notholaena Nivea, Cuti-Cuti, administrada por vía oral a la dosis de 250mg/kg, mostró un buen efecto hipoglicemiante frente a la hiperglicemia inducida por aloxano; asimismo, reduce los valores de triglicéridos y colesterol, inducidos por el aloxano. En la evaluación fitoquímica del extracto se encontró la presencia de: flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, leucoantocianidinas, entre otros. Observamos la presencia de Rutina y Quercetina confirmados por TLC, HPLC, IR y RMNH1, así como un principio activo al que se le ha denominado CH-2.

Palabras claves: Agentes hipoglicemiantes, Cuti-Cuti, Notholaena Nivea, Aloxano, Rutina, Quercetina.

1 Director del Instituto de Investigación de la FMH-USMP.

2 Investigador del Centro de Investigación de Medicina Tradicional A.

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

Summary

We evaluated the acute oral toxicity and the metabolic effect on glycemia and lipidemia in mice, of the metabolic extract of *Notholaena Nivea*, "Cuti-Cuti" to 10%, in CYTED models. The effect on plasma glucose was evaluated in normoglycemic and hyperglycemic rats, compared with control groups which received physiological serum. Hyperglycemia was induced with Alloxan, administered by intraperitoneal route to the dose of 150 mg/kg of weight. We used 60 rats distributed in three groups (I, II and III), of 20 rats each one. All the animals were put under 24 hours fasting, previous to the beginning of the experiments. Group I was subdivided in two sub-groups of 10 animals each one and received physiological serum or extract of Cuti-Cuti, to observe its effects on normal blood glucose. The second group received alloxan to the dose of 150mg/Kg of weight, by intraperitoneal route, to induce experimental hyperglycemia; the values of blood glucose and lipids were determined at 1, 2, 4 and 24 hours. The third group of rats received 150 mg/kg of alloxan by intraperitoneal route. When the blood glucose level was over 300 mg%, 10 of them received 250 mg/kg of Cuti-Cuti and the others 10 received physiological serum by oral route. Determination of glucose, total cholesterol, HDL and triglycerids in plasma was made in the biochemical Autoanализador Vitalab Selectra 2.

The DL50 with superior and inferior limit of 95% was 13,009 and 9,470 mg/kg of weight with an average of 11,099 mg/kg of weight. We found that the *Notholaena nivea*, "Cuti-Cuti", administered by oral route to the dose of 250mg/kg showed a good hypoglycemic effect against the hyperglycemia induced by Alloxan; additionally it also reduces the triglycerids and cholesterol values, increased by the alloxan. In the phytochemical screening of the extract we found: phenolics, flavonoids, tannins, alkaloids, leucoantocyanidines, among others. Besides we found Rutin and Quercetin confirmed by TLC, HPLC, IR y RMNH1 and an active principle that we have denominated CH-2.

Key words: Hipoglycemic agents, Cuti-Cuti, *Notholaena Nivea*, Alloxan, Rutin, Quercetin.

Introducción

La investigación en plantas, así como la utilización de los recursos del medio ambiente bajo condiciones de racionalidad, mínimo costo y alto grado de satisfacción social, se han convertido actualmente en una

premisa fundamental que debe ser considerada como lineamiento para orientar el desarrollo para la incorporación sistemática de los conocimientos científicos y tecnológicos a las actividades económicas sociales y culturales. A pesar de la gran utilización de las plantas medicinales por la población de bajo nivel económico, pocas de ellas han sido estudiadas siguiendo métodos científicos válidos y atendiendo a las normas éticas definidas internacionalmente, ya que si bien el uso popular es un indicador importante, no es garantía de la actividad terapéutica. Existe, además, un factor muy importante: las variaciones ecológicas, por las cuales, una misma especie puede presentar concentraciones diferentes de los mismos principios activos, debido a que el metabolismo secundario de los vegetales superiores es responsable de la síntesis de sustancias químicas con poca acción del propio vegetal, aunque orientadas por las características genéticas de las plantas; la síntesis química de estas sustancias es controlada por factores del ecosistema (luz, calor, temperatura, humedad y suelo), siendo importante reconocer que muchas veces no es posible encontrar la misma proporción relativa de esos constituyentes en las mismas especies recogidas en épocas y lugares diferentes (3), (17).

Asimismo es necesario comprobar el potencial de toxicidad de una planta para su posible aceptación como medicamento, además de la garantía de su efecto específico, evaluando su relación riesgo/beneficio en la especie humana, siguiendo las normas éticas. La experimentación animal debe preceder a la evaluación de la planta medicinal en la especie humana, aunque este sea el objetivo final de la validación. En cuanto a la especie humana, es preciso considerar la susceptibilidad individual a los fármacos, la reacción a los placebos y a la capacidad de autosugestión, para que puedan ser debidamente evaluados los efectos de una planta medicinal utilizada como medicamento. Asociando estas variables a las enfermedades, de intensidades diferentes y/o de causas diferentes, es fácil prever 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 (7), (8).

Las técnicas científicas modernas permiten la evaluación adecuada de los medicamentos en la especie humana. De modo general, los criterios son extensos y muy ceñidos a cuestionamientos de ética, pero permiten obtener resultados cuantificables, eliminando los falsos positivos o falsos negativos.

La Fitoterapia es el tratamiento médico con plantas o productos vegetales no purificados como, por ejemplo, el uso de la corteza de la Quina usada en polvo o en infusión, comparada con el sulfato de quinina y los derivados sintéticos de esta molécula. En el primer caso hay el uso basado en la observación de causa-efecto, de los productos de la corteza; en el segundo es la aplicación de una molécula antiparasitaria específica derivada de su hallazgo en la corteza del árbol de la Quina. En la actualidad existen dos formas de usar las plantas. Una es la tradicional o folklórica que sigue las líneas de la etnografía. La otra es el uso científico que se basa en los caminos usuales de la experimentación biológica siendo la seguridad de principios activos presentes en las plantas de vital importancia para su posterior uso en la clínica, por lo cual los valores obtenidos en el ensayo toxicológico (DL50) son referenciales para establecer la inocuidad de los principios activos presentes en la planta, extracto o fracción estudiada, adoptando todos los países del mundo la declaración de HELSINKI que norma los principios de experimentación en seres humanos. Los criterios actuales para la evaluación de nuevos recursos terapéuticos en la especie humana fueron elaborados a partir de esos principios. Se condena la experimentación en el hombre, sin conocimiento razonable de la actividad farmacológica y de la toxicidad preclínica en animales de laboratorio. El cumplimiento de un procedimiento de estudios preclínicos es condición para los estudios clínicos en humanos en los Centros de Investigación de clínicas, indicando dosis, efectos más probables y manifestaciones adversas importantes o efecto tóxico grave, que no recomienden pruebas en humanos (7), (8), (17).

La Diabetes Mellitus representa un problema de salud pública mundial y es considerada como una de las enfermedades crónicas con persistencia permanente por sus 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, al igual que en otras regiones en vías de desarrollo, como resultado de la evolución de envejecimiento poblacional y del estilo de vida, sobre todo en las ciudades donde el ritmo de vida es mucho más activo que en el campo, pero con una existencia casi sedentaria, pues poca gente dispone del tiempo suficiente para hacer ejercicio físico y muchas enfermedades se complican por la ingestión diaria en la dieta de alimentos procesados, refinados, bajo en fibras y otros compuestos presentes en los alimentos naturales; enlatados, conservados de manera artificial

durante largos períodos de tiempo, con sustancias como colorantes y saborizantes artificiales o sintéticos, etcétera. Recientes datos de la OPS (Boletín Epidemiológico, junio de 2001), revelan que la incidencia de diabetes tipo I en el Perú equivale al 0.4/100000 habitantes. Asimismo, estas investigaciones le asignan al Perú una tasa entre el 5.1% y 6% para la prevalencia de Diabetes Mellitus en adultos. Estas mismas estadísticas estiman que las poblaciones urbanas tienen tasas dos veces mayores que las poblaciones que viven en zonas rurales. El aumento de la prevalencia de diabetes se acentúa debido a la migración progresiva de la población del campo a la ciudad y a la incorporación de hábitos que favorecen la aparición de la obesidad.

La diabetes se caracteriza por el déficit de secreción de la insulina, así como de acción de la misma sobre su receptor, dando como resultado altos niveles de glicemia. Esta enfermedad está asociada a un incremento del riesgo de muerte, particularmente porque está vinculada a un mayor riesgo de males cardiovasculares. Las personas que presentan diabetes tienen además un mayor riesgo de padecer retinopatías, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores por fallas en la microcirculación. La diabetes aparece en dos formas: Tipo I (con mayor frecuencia durante la infancia o la adolescencia) y Tipo II (que está relacionado con la obesidad y la inactividad física). La diabetes Tipo II representa alrededor del 90% de todos los casos de diabetes y aparece con mayor frecuencia después de los 40 años (2).

El Perú logró en 1989, por Resolución Ministerial, aprobar el listado de recursos terapéuticos vegetales para ser usados en los Centros Asistenciales del antes Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS), hoy Seguro Social de Salud (EsSalud); sin embargo, no logró el impacto necesario entre los profesionales de la salud para su utilización, debido, entre muchas causas, al desconocimiento del efecto terapéutico acompañado de una experiencia clínica confiable con un soporte de control toxicológico de las plantas medicinales mencionadas que generó mucha desconfianza entre los médicos. Sin embargo, existen algunos principios activos aislados de las plantas como flavonoides y alcaloides que se encuentran en gran proporción en Cuti-Cuti, entre los cuales tenemos a los flavonoides: Rutina y Quercetina, que cuentan con investigaciones probadas de su efecto hipoglicémico. La primera, según la U.S.P, es usada para la arterioesclerosis, hipertensión y diabetes.

La Quercetina ejerce un efecto hipoglicemiante, inhibiendo a la enzima aldosa reductasa, la cual está relacionada con la producción de polioles, responsables de los efectos crónicos en la diabetes y por sus propiedades antioxidantes reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares, incluyendo las trombosis vasculares (6), (14).

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

Para el género *Notholaena* se han descrito 42 especies, los cuales son helechos distribuidos en el continente sudamericano con variedades: nivea, oblongata, tenera, flava. En el Perú se conoce a la especie *Notholaena Nivea* con los nombres de Doradilla, Cuti-Cuti, Raqui Raqui y en Bolivia como Kutu Kutu (Quechua), Chaxella Aymara, Doradilla, siendo consumida por la población en infusión para la diabetes y como vermífugo, reportándose que en algunos casos produjo temblores en el ganado ovino. Mencionándose en los estudios químicos realizados en esta especie a: 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona quercetina y ácido isonotholaénico.

En el Perú se están realizando trabajos en plantas medicinales con efecto sobre la glicemia. Diversos estudios han encontrado efectos sobre la glicemia de *Geranium Ayavacense* (Apumayta 2000, Dávila 2000) en ratas diabéticas, en el año 2001 Cáceres, Ibáñez y colaboradores realizan una investigación preliminar sobre el efecto hipoglicemiante de *Notholaena Nivea*, Cuti-Cuti, y *Geranium Lechleri* en ratas hiperglicémicas, utilizando el glucómetro como instrumento de medición de glucosa, observando una significativa disminución de la glicemia por parte de los extractos metanólicos de *Geranium Lechleri* proveniente de Cajamarca y *Notholaena Nivea* proveniente de Ancash con respecto al control (suero fisiológico), a partir de la primera hora de

administrado el extracto por vía oral, siendo *Geranium Lechleri* más significativa durante la primera y segunda hora y *Notholaena Nivea* más efectiva desde la segunda hasta la duodécima hora, planteándose que el efecto hipoglicemiante podría deberse a una mejor utilización de la glucosa por los tejidos periféricos y un aumento de la sensibilidad de los receptores de insulina (1), (4), (24).

Asimismo, encontramos diversas plantas medicinales de uso popular que manifiestan un efecto hipoglicemiante, por ejemplo: Ortiga, Chanca Piedra, Yacón (autóctona del Perú, que ha sido muy estudiada por japoneses que ahora la cultivan y exportan), quienes en su mayoría no cuentan con estudios preclínicos ni clínicos demostrados. Por ello, en el presente trabajo se evaluó el efecto hipoglicemiante y sobre la lipidemia del Cuti-Cuti, en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional Andina del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina de la USMP, en el periodo comprendido entre marzo del 2001 y diciembre del 2003, por un equipo multidisciplinario.

Materiales y métodos

Obtención del Material Botánico

Para la obtención del material biológico se solicitó al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Illary, la muestra de *Notholaena Nivea* de la zona de Cañete, la cual fue identificada taxonómicamente, preparándose el extracto metanólico al 10% p/v por maceración durante 7 días, utilizando Metanol Q.P, el cual fue filtrado y la solución fue evaporada hasta la total eliminación del solvente y secado en una campana de extracción hasta obtener un residuo seco verdoso.

Screening Fitoquímico

Se realizó de acuerdo al método descrito por Ciulei (Fig. N° 1) (5). Se extrae la droga seca y molida con éter, utilizando un Soxhlet. El residuo se seca, extrayéndose en el Soxhlet con alcohol. Finalmente, el resto se extrae con agua, bajo reflujo. Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso se sometieron a una secuencia de pruebas químicas de coloración y precipitación para la detección de compuestos orgánicos:

Acetato de plomo básico para flavonoides

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

Cloruro férrico para fenoles y ácidos hidroxámicos

Los fenoles reaccionan con el tricloruro de hierro (FeCl₃)

para dar sales férricas fenoxídicas coloreadas (azul-verde-violeta). Los ácidos hidroxámicos presentan coloración roja.

Hidróxido de sodio para cumarinas volátiles

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

Ninhidrina para aminoácidos, sales de amonio y anilina

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

Prueba de espuma para saponinas esteroides y saponinas triterpenoides

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

Prueba de Shinoda para flavonoides

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

Reactivo de Bortranger para naftoquinonas, antraquinonas, antronas o antranoles

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

Reactivo de Dragendorff para alcaloides y aminas terciarias

Formación de yoduro doble colorido y en algunos casos insoluble, de fórmula general $BiI_3B.HI$ donde B es la molécula de alcaloide.

Reactivo de Gelatina-sal para taninos

Ocurre la hidrólisis del tanino dando un compuesto fenólico y un azúcar.

Reactivo de Kedde para g-lactonas y glicósidos cardíacos

En medio alcalino se forma un intermediario de ion cardenólido, que se acondiciona nucleofílicamente en

la posición orto a los grupo nitro del aromático; se forma un anión de color rojo violeta estabilizado por mesomería (Complejo Meisenheimer).

Reactivo de Liebermann - Burchard para esteroides y glicósidos triterpénicos

Ocurre una deshidratación con formación de un doble enlace conjugado a un segundo doble enlace, lo que da un producto coloreado.

Reactivo de Mayer para alcaloides

Precipitación con un ión grande, formación de un yoduro doble, de fórmula general $HgI_2 \cdot B.HI$, donde B es la molécula de alcaloide (precipitado blanco).

Reactivo de Molish para Monosacáridos

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

Reactivo de Rosenheim (NaOH 5%) para flavonoides

Las sales de oxonio de todas las antocianinas y antocianidinas se disocian hidrolíticamente cuando están en soluciones diluidas, formándose la base libre de oxonio (II) que se isomeriza formando la pseudobase incolora (I).

Reactivo de Wagner (yodo-yoduro de potasio) para alcaloides

Formación de yoduro doble de alcaloide (precipitado café).

Vainillina-ácido clorhídrico para catequinas

Formación de un derivado coloreado que se intensifica por la presencia del ácido.

Vainillina-ácido sulfúrico para alcoholes superiores, fenoles esteroides y aceites etéreos

Formación de derivados coloreados. Este reactivo detecta desde hidrocarburos hasta esteroides sustituidos. El rango de coloraciones que se presenta es muy amplio y aparecen coloraciones de todo el espectro.

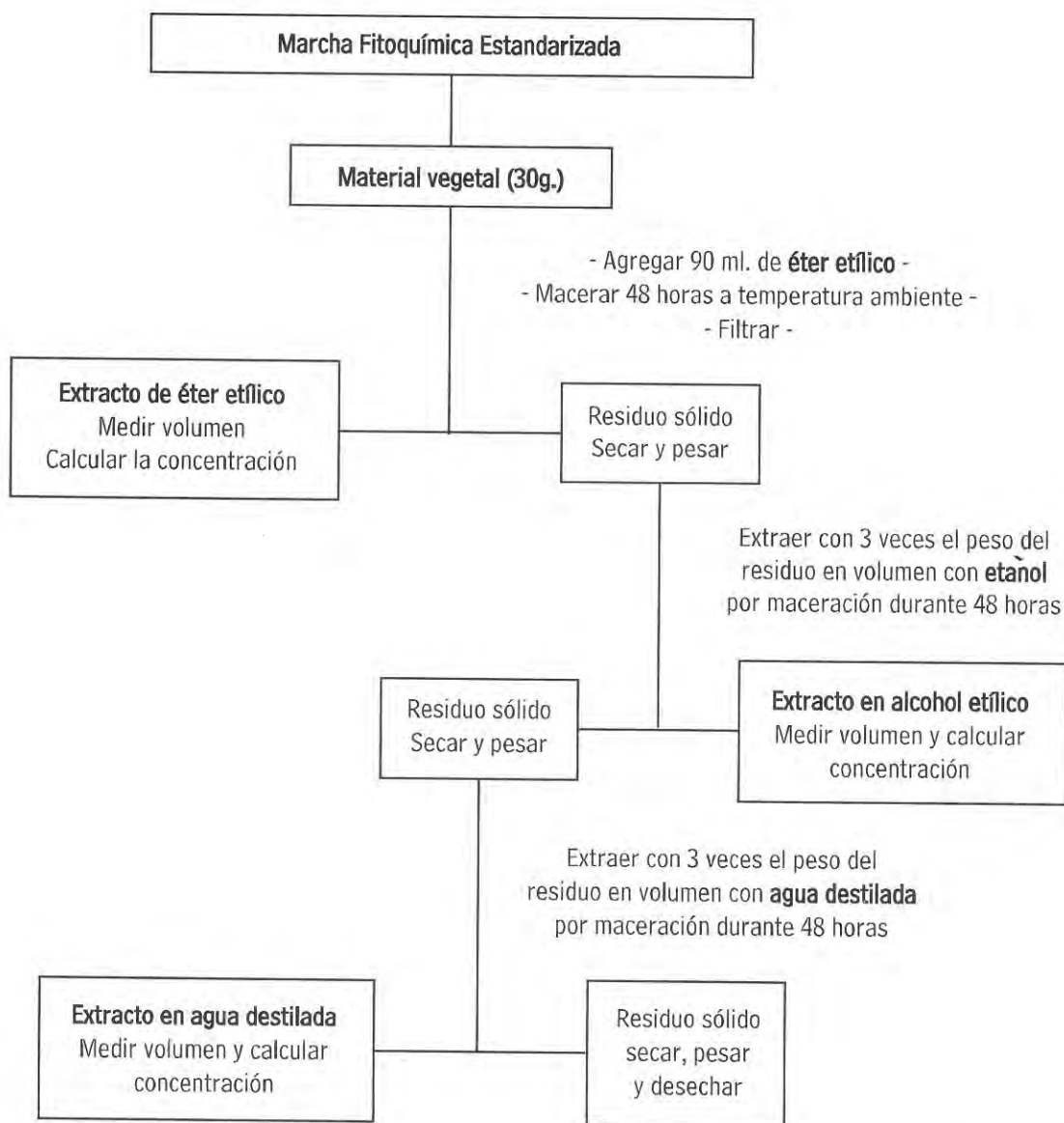
Aislamiento de principios activos

Del extracto metanólico se procedió a la separación de los principios activos por métodos convencionales de cromatografía en columna, obteniéndose: Rutina, Quercetina y un compuesto al que se ha denominado CH-2, los cuales han sido analizados utilizando técnicas de TLC, HPLC, IR, RMN¹H. En la separación cromatográfica se ha utilizado como adsorbente Gel de Sílice 60 (Merck) y como eluyentes solventes orgánicos. Para realizar la c.c.f. se ha empleado cromato-

folios de Silica Gel de 0.25 mm de espesor (Merck), mientras que para realizar ccfp se ha empleado cromatoplasmas de Silica Gel de 2.0 mm de espesor (Merck). La pureza de los compuestos, así como el curso de las reacciones ha sido observada por cromatografía en capa fina. Como reveladores se utilizó Luz Ultravioleta y una solución de Sulfato Cérico al

1% en ácido sulfúrico 2N y cloruro férrico. Los datos espectroscópicos de IR, que se presentan han sido obtenidos en los espectrofotómetros Perkin Elmer 283-B y Nicolet FT-JR 5 SX. En el caso de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNH1) se realizaron en el espectrómetro Varian Gemini 2000 (200 MHz).

Centro de Investigación de Medicina Tradicional Gráfico 1



Metodología de la evaluación de la Toxicidad Aguda Oral

Se utilizaron 36 ratones divididos en seis grupos, de ambos sexos, provenientes del Ministerio de Salud, con un peso de 25 y 30 gr, los cuales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio y separados en jaulas, identificados individualmente mediante un sistema de marcado con Violeta de Genciana. El extracto se administró en dosis de 2,000, 4,000, 8,000, 10,000, 12,000 y 16,000 mg/kg. La observación se realizó en forma minuciosa durante las primeras 24 horas y se continuó con una diaria hasta concluir las 72 horas. La dosis letal media se estimó mediante el método estadístico de los Probits (10).

Evaluación de la actividad hipoglicemiante y sobre la lipidemia (10):

Se utilizaron 60 ratas, las cuales se distribuyeron en tres grandes grupos I, II y III de 20 ratas cada uno. Todos los animales fueron sometidos a ayuno de 24 horas previo a la realización de los experimentos. Para observar los efectos del Cuti-Cuti sobre la glicemia normal, el primer grupo de 20 ratas fue dividido en dos subgrupos de diez animales cada uno, a los que no se les trató con Aloxano; el segundo grupo de 20 ratas recibió 150mg/kg de Aloxano por vía intraperitoneal para inducir hiperglicemia experimental, evaluándose el nivel de glucosa en sangre previa canalización del seno venoso del ojo de cada una de ellas, por medio del método de la glucosa oxidada en el Autoanalizador Bioquímico Vitalab Selectra 2, a partir de las 72 horas y además Colesterol total, HDL-colesterol y Triglicéridos a la 1, 2, 4 y 24 horas después de la administración de Cuti-Cuti, a la dosis de 250 mg/kg de peso.

El grupo II fue subdividido en dos subgrupos de diez animales cada uno. Uno de ellos recibió suero fisiológico y el otro, Cuti-Cuti a la dosis de 250 mg/kg de peso y sirvieron para evaluar el efecto de éste sobre la glicemia y lipidemia normales. Se realizó control de glicemia, colesterol, triglicéridos y HDL a 1, 2, 4 y 24 horas.

El tercer grupo estuvo constituido por 20 ratas a las que se les produjo hiperglicemia por Aloxano; posteriormente, 10 animales con glicemia superior a 300 mg%, recibió suero fisiológico (control) y los 10 restantes Cuti-Cuti, a la dosis antes indicada, controlándose la glicemia a la 1, 2, 4 y 12 horas posteriores.

Resultados

Clasificación taxonómica

El material vegetal fue identificado taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la siguiente manera:

Reino: Plantae
Filo: Pteridophyta
Clase: Filices
Orden: Pteridales
Familia: Sinopteridaceae
Genero: Notholaena
Especie: Notholaena nivea (Poir) Desv.
Nombre: Cuti-Cuti

Tabla N° 1

Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50) de Notholaena Nivea, Cuti-Cuti.

Grupo	Dosis	n° Muertos 24 h	n° Muertos 48 h	n° Muertos 72 h
1	2000	0/6	0/6	0/6
2	4000	0/6	0/6	0/6
3	8000	1/6	1/6	1/6
4	10000	2/6	2/6	2/6
5	12000	3/6	3/6	3/6
6	16000	6/6	6/6	6/6

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

Extremadamente tóxico	DL50 < a	1 mg/kg
Altamente tóxico	DL50 < a	50 mg/kg
Moderadamente tóxico	DL50 < a	500 mg/kg
Ligeramente tóxico	DL50 < a	5 000 mg/kg
Prácticamente no tóxico	DL50 < a	15 000 mg/kg
Relativamente inocuo	DL50 > a	15 000 mg/kg

De acuerdo a este criterio y a las clases de toxicidad de la Comunidad Europea, el extracto metanólico de Notholaena Nivea, Cuti-Cuti se puede clasificar como prácticamente no tóxico ya que tiene una DL50 mayor a 5000 mg/kg, presentando una DL50 = 11,099 con un límite superior al 95% de 13,009.721 y un límite inferior al 95% de 9,470.5949.

De la evaluación del efecto hipoglicemiante y sobre el colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos en ratas normoglicémicas y diabéticas inducidas por Aloxano.

Los resultados se presentan en la Tabla N° 2, siendo

el Grupo I, los animales a los cuales no se les aplicó Aloxano y el Grupo II, a los cuales se les indujo diabetes experimental con Aloxano.

Tabla N° 2

Valores promedio de Glucosa, Colesterol total, HDL- Colesterol y Triglicéridos, según grupos de tratamiento.

Grupos de Tratamiento	Horas	Glucosa		Colesterol		HDL-Colesterol		Triglicéridos	
		Control	Cuti-Cuti	Control	Cuti-cuti	Control	Cuti-Cuti	Control	Cuti-Cuti
I	Basal	59	70.4	75	80.2	37.3	42.0	69	60.2
	1H	61	65	59	68	29.4	33.6	50	44.8
	2H	87	87.8	55	61.5	26	27.0	57	43.9
	4H	162	160	51	59.7	22	25.7	67	51.7
	24H	162	160	65	59.0	30	29.7	112	86.6
II	Basal	58	55	76	74	37.3	42.0	69	60.2
	1H	538	157	66	66	26	31.7	242	90
	2H	597	149	108	63	27	27.6	453	67
	4H	486	167	62	58	27	27.2	206	60
	24H	417	158	59	57	24	24.3	155	59
III	Basal	120	120						
I	ALOXANO	503.5	501						
	1H	512	402						
	2H	455	350						
	4H	353	205						
	12H	251	90						

Valores expresados en mg//dl.

Fuente: Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina. Proyecto Cuti-Cuti. Centro de Investigación de Medicina Tradicional. USMP. 2001-2003

Tabla N° 3

Porcentaje de Inhibición de la hiperglicemia por efecto de Cuti-Cuti frente a Grupo Control en ratas diabéticas.

HORAS	% de Inhibición de la hiperglicemia
1H	70.8
2H	83 %
4H	65.63
24H	62.11

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto hipoglicemiante de Notholaena Nivea, Cuti-Cuti, sobre los niveles de Glucosa en ratas normoglicémicas no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, sí se evidenció un buen efecto hipoglicemiante en los grupos tratados con Aloxano, el cual fue aplicado intraperitonealmente a la dosis de 150 mg/kg, observándose una disminución en la hiperglicemia de 70.8%, 83.0%, 65.63% y 62.11% a la 1, 2, 4 y 24 horas, respectivamente, frente al grupo control.

Tabla N° 4

Porcentaje de inhibición del aumento de Triglicéridos por efecto de Cuti-Cuti frente a Grupo Control en ratas diabéticas.

HORAS	% de Inhibición de aumento de Triglicéridos
1H	62.80
2H	85.20
4H	70.87
24H	61.93

Con respecto a los valores de triglicéridos, se observó un descenso, sobre todo a la segunda hora de tratamiento, obteniéndose un 85.20% de reducción, no hallándose cifras importantes de reducción significativamente estadísticas entre los grupos tratados, con respecto a los valores obtenidos de HDL-Colesterol.

De la Evaluación Fitoquímica

Los hallazgos del estudio fitoquímico cualitativo del extracto metanólico se presentan en la Tabla N° 5. Dentro del grupo de flavonoides se observó principalmente la presencia de Rutina y Quercetina confirmados por TLC, HPLC e IR y un compuesto puro al que se le ha denominado CH-2, con el cual se están realizando estudios para la elucidación estructural y para evaluar su actividad farmacológica.

Tabla N° 5

Marcha Fotoquímica del Extracto Metanólico de Notholaena Nivea, Cuti-Cuti.

Metabolito	Prueba o Reacción	Resultado
Lípidos	LIEBERMANN	++
Coumarinas y Lactonas	BALJET	----
Aminoácidos Libres	NINHIDRINA	++
Compuestos Fenólicos	TRICLORURO FÉRRICO	++
Taninos	DICROMATO DE POTASIO	++
	GELATINA	++
Flavonoides	ACETATO DE PLOMO	++
Alcaloides	SHINODA	+++
	R. DRAGENDORFF	+++
	R. MAYER	+++
	R. POPOFF	+++
Esteroides	R. BERTRAND	+++
Azúcares Reductores	LIEBERMANN	++
	FEHLING	+
Oximas	TOLLENS	+
Alcoholes	HIDROXILAMINA	+
Glucósidos	NITRATO DE CERIO AMONICAL	+
	R. ANTRONA	+
	VAINILLINA SULFÚRICA	+
	MOLISH	+
Saponinas	BENEDICT	+
	INDICE AFROSIMÉTRICO	-

Leyenda: Presencia Leve (+), Moderada (++), Intensa (+++)

Gráfico 2

Presencia de Rutina en el extracto de Cuti-Cuti por HPLC realizado en el Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana, USMP.

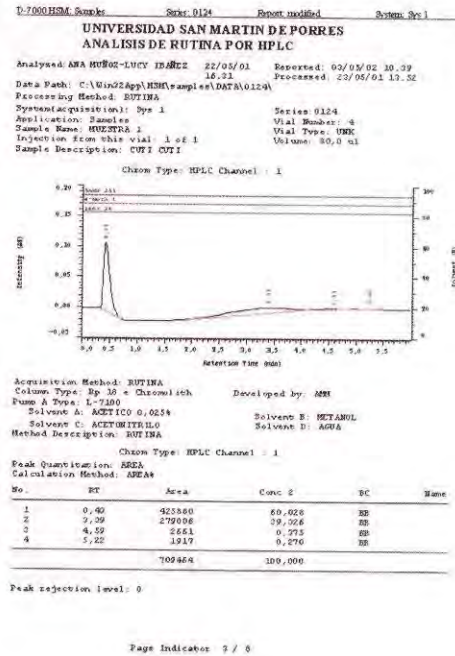


Gráfico 3

Presencia de Quercetina en el extracto de Cuti-Cuti por IR. Instituto de Química, UNAM - México.

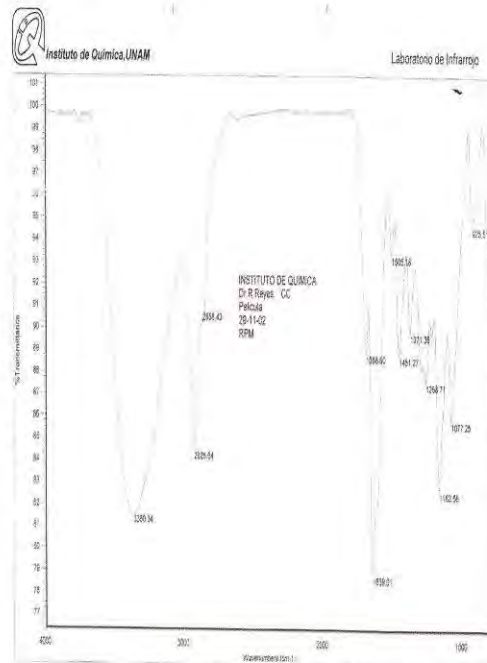


Gráfico 4

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

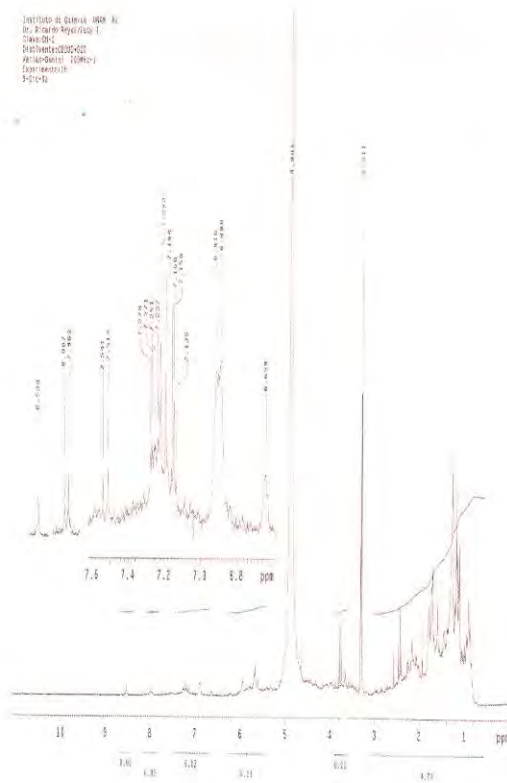


Gráfico 5

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

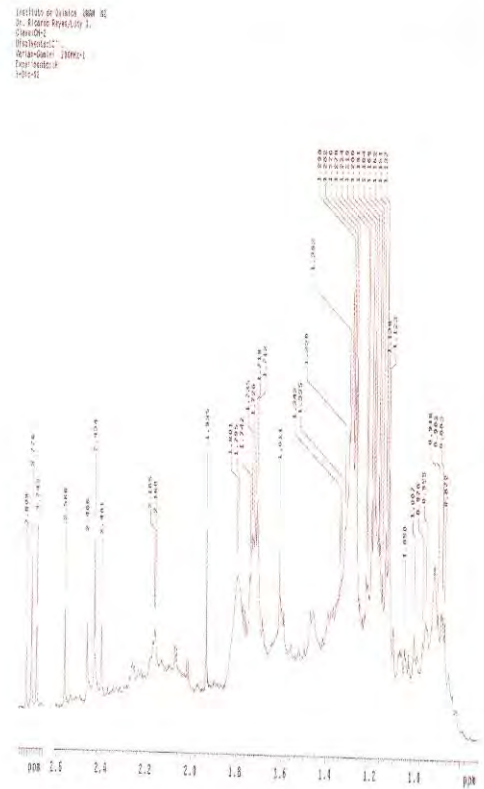


Gráfico 6

Evaluación del efecto del extracto de Cuti-Cuti sobre los niveles de glucosa en sangre, en ratas normales frente a grupo control con suero fisiológico

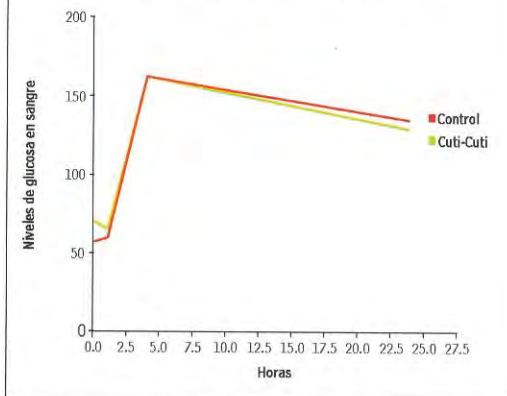


Gráfico 7

Valores de los niveles de glucosa en sangre, en ratas hiperglicémicas tratadas con extracto de Cuti-Cuti frente a grupo control con suero fisiológico (autoanalizador bioquímico)

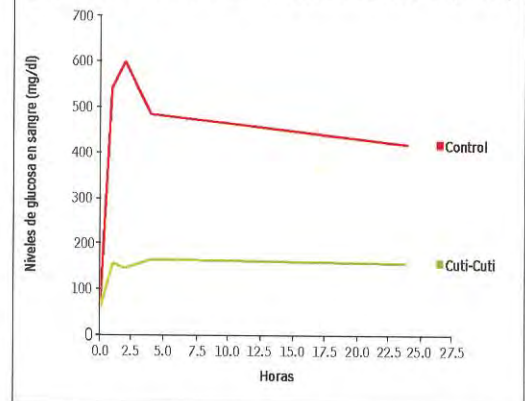


Gráfico 8

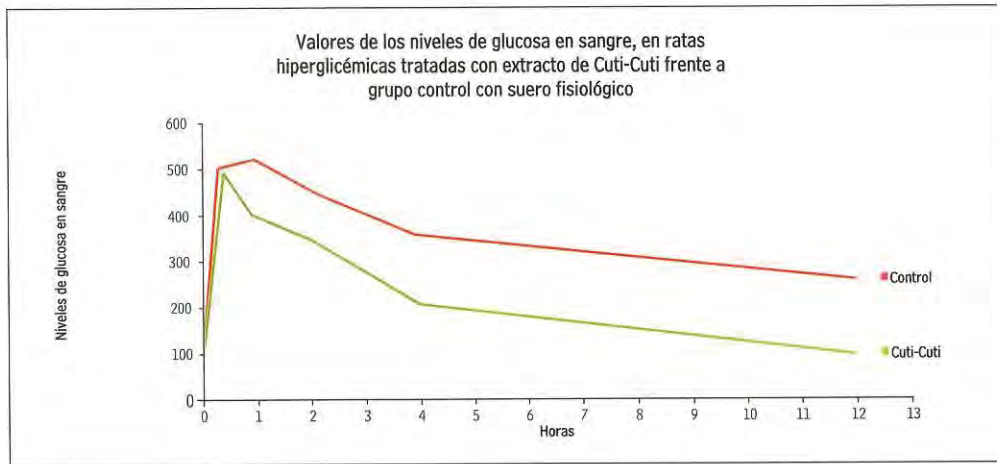


Gráfico 9

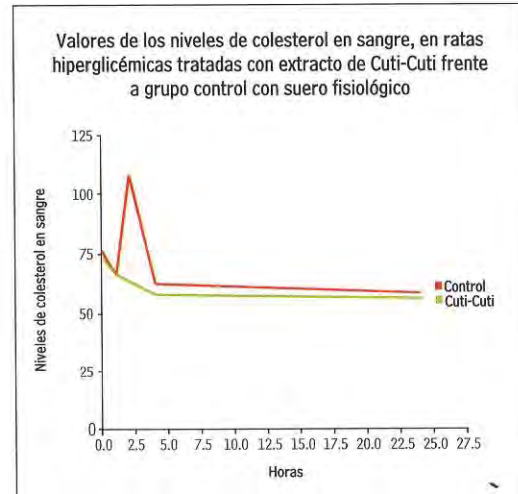
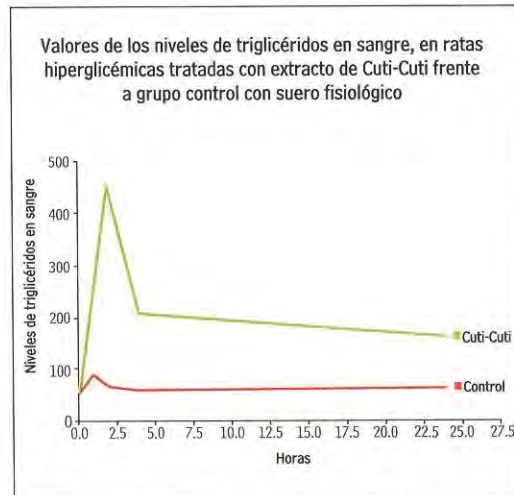


Gráfico 11



Gráfico 12



Discusión

Estos resultados muestran que el diseño experimental fue válido para establecer el efecto hipoglicémico del extracto metanólico de *Notholaena nivea*, Cuti-Cuti, a la dosis estudiada.

La estreptozotocina es el producto preferido como agente hiperglicémico en la actualidad; sin embargo, esto presenta el inconveniente de tener un elevado costo en el mercado (Maeda, 1995) (21). El Aloxano es otro producto químico empleado en la inducción de hiperglicemia experimental desde 1941 (De Mello, 1995) (12), siendo el más utilizado, teniendo en cuenta que el mecanismo de acción diabetogénico de ambos es muy parecido. Según Okamoto (1942) (22), el Aloxano o sus metabolitos interactúan con el zinc pancreático, provocando una destrucción de las células beta de los Islotes de Langerhans pancreático (Maeda y Fernand, 1995). No obstante, otras observaciones dan sustento a la teoría de la formación de radicales de oxígeno que desempeñan una función significativa en la acción diabetogénica de esta sustancia. En trabajos anteriores realizados por Fleitas y colaboradores en 1988 se establece un modelo de diabetes experimental en ratas, con buenos resultados, pero se puede afirmar que el tratamiento aplicado con aloxano fue efectivo para convertir a los animales en hiperglicémicos (3), (10), (15), (16), (20). Según se observa en la Tabla N° 2, los niveles de glicemia de todos los animales para los diferentes momentos de las determinaciones, están elevados en el grupo tratado con aloxano y suero fisiológico, afirmándose que los animales mantuvieron la condición de hiperglicémicos durante este período. En las tablas 2, 3 y 4 se observan los valores promedios de glucosa, colesterol total, HDL colesterol y triglicéridos, así como porcentajes de inhibición de hiperglicemia y triglicéridos frente al control a la 1, 2, 4 y 24 horas, respectivamente, observándose resultados estadísticamente significativos de valores de glucosa y triglicéridos.

Teniendo en cuenta que la diabetes en el Perú tiene una frecuencia de 3.8-4% y que es una enfermedad crónica que sólo puede ser controlada con dieta, hipoglicémicos orales e insulina; creemos que el aporte de la presente investigación realizada en *Notholaena nivea* resulta interesante en el sentido de poder ser usada por la población, siendo muy importante profundizar las investigaciones en los principios activos presentes en el extracto que pudieran tener efectos normalizadores de la glicemia.

En las gráficas 6, 7 y 8 representamos el efecto del Cuti-Cuti sobre la glicemia; encontramos que no modifica la glicemia post prandial; sin embargo, impide el incremento de la glicemia por efecto del aloxano (Gráfico N° 7) y reduce los niveles de glucosa sanguínea, elevados por el aloxano (Gráfico N° 8). En cuanto al mecanismo del efecto hipoglicémico, existe la posibilidad de que impida la acción del aloxano sobre las células beta del páncreas o incremente el consumo de glucosa a nivel periférico. Con posteriores investigaciones trataremos de dilucidar este planteamiento, dosando niveles de insulina en sangre, conjuntamente con un estudio histopatológico del páncreas para ver el grado de daño celular. Existe también, la posibilidad de que el aloxano no haya dañado a todas las células beta del páncreas y que el Cuti-Cuti estimule la liberación de insulina a partir de las células beta que no hayan sido afectadas por el aloxano.

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

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

Asimismo, según la OPS (1991) y la OMS (1993), las muertes por problemas cardiovasculares en el Perú representan el 15.1%, recomendando la Asociación Americana de Corazón y su Programa Nacional de Educación como tratamiento para la hipercolesterolemia, la reducción del sobrepeso corporal, un consumo de grasa en la dieta menor al 30% de las calorías totales y un colesterol menor de 300 mg/día en la alimentación (DHHS, 1988) (13); mas, estas dietas disminuyen el colesterol plasmático en un 5 ó 7%, evidenciándose que existen muchos fármacos capaces de disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, pero a las dosis que ejercen un buen efecto farmacológico, presentan efectos secundarios adversos, por ello Cuti-Cuti se presenta como una buena alternativa para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, con baja toxicidad, como demostramos con la determinación de la DL50 y que según los criterios de Williams,

la planta puede ser considerada como prácticamente atóxica. Lo que nos lleva a sostener que el Cuti-Cuti puede constituir una parte importantísima del arsenal terapéutico de la diabetes mellitus.

Conclusiones

- 1) La *Notholaena Nivea*, Cuti-Cuti, es una planta prácticamente atóxica (según nuestros estudios de toxicidad aguda evaluados), siguiendo los criterios de Williams.
- 2) El extracto metanólico de *Notholaena Nivea*, Cuti-Cuti, mostró un buen efecto hipoglicémico y preventivo de la hiperglicemia inducida por aloxano.
- 3) El extracto metanólico de *Notholaena Nivea*, Cuti-Cuti, mostró un buen efecto reductor de los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos, incrementados por el aloxano.
- 4) En la evaluación fitoquímica de este extracto se encontró la presencia de: flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, leucoantocianidinas. Observándose la presencia de Rutina y Quercetina confirmados por TLC, HPLC e IR, en el extracto metanólico de Cuti-Cuti, los cuales podrían ejercer un efecto hipoglicémico, no descartándose la participación de otros principios activos presentes.
- 5) De *Notholaena Nivea* se aisló un principio activo CH-2, con el cual se siguen realizando investigaciones para elucidar su estructura química por medio de técnicas especiales y evaluar su actividad farmacológica.

Benjamín Castañeda C.
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres

Agradecimiento

Expresamos nuestro reconocimiento y agradecimiento al Dr. Ricardo Reyes Chilpa de la Universidad Autónoma de México, por el apoyo prestado para realizar los análisis de IR, RMN¹H; a la Msc. Anamaria Muñoz y al Tec. M. Edwin Zarzosa Norabuena, por los análisis bioquímicos realizados.

Referencias bibliográficas

1. APUMAYTA, U.; JURUPE H.; MATEO, A. et al. Estudio fitofarmacológico (hipoglicémico) y de toxicidad del extracto de *Geranium Ayavacense* Hill (Pasuchaca) en animales de experimentación. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Congreso FITO, 2000.
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. BAYLEY, C. J.; DAY, C. Tradicional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-561; 1989.
4. CÁCERES, M. L.; IBÁÑEZ, V. L. y col. "Estudio comparativo de *Geranium Lechleri* "Pasuchaca" y *Notholaena nivea* "Cuti-Cuti" en ratas diabéticas. Facultad de Medicina . USMP. Resúmenes del IV Congreso Mundial de Medicina Tradicional Andina. Lima-Perú. Pág 34; 2002.
5. CIULEI, I. Metodología D'Analyse des Produits Vegetaux. Mimeografiadoi Facultade de Farma-cia, Bucarest; 1982.
6. CODY, V.; MEDDLETON, E.; HARBORNE, J.; BERETZ, A. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II*. Alan R. Liss. INC, New York; 1987.
7. Comision of the European Communities Annex to Comision 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.
8. CUBA. Ministerio de Salud Pública. Regulaciones metodológicas para la evaluación preclínica de medicamentos. La Habana. Editorial Ciencias Médicas: 3-4, 1993.
9. CYTED. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Colombia, 2000.
10. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación; 1995.
11. DE LA CRUZ, J.; MORENO, A.; MUÑOZ, M.; GARCÍA CAMPOS, J.; SÁNCHEZ DE LA CUESTA, F. Effect of Aspirin plus Dipyridamole on the retinal vas-

- cular pattern in experimental diabetes mellitus. *J Pharmacol Exp Ther.* 280: 454-459; 1997.
12. DE MELLO, M.; LUCIANE, E.
Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan induced diabetes. *Med Biol Res;* 28(4):467-70; 1995.
 13. Department of Health and Human Services. The surgeon General report Nutrition and health. Washington DC:Vs. Government Printing Office. DHHS publication (PHS) 88-50210;1988.
 14. DUKE, J. A.
CRC Handbook of medicinal Herbs. Library of Congress Cataloging in Publication Data; 2000.
 15. FERNAND, N.; AASTESANO, A.; PHAN, H. H.; LELONG, C.; ROSSELIN, G.
Dynamic of pancreatic cell growth and differentiation during diabetes reversion in ST2-treated newborn rats. *Am J Physiol.* 28: 269-72; 1995.
 16. HOSSEN, A.; PEREYRA, V.; BUSTAMENTE, Z.
Evaluación in vivo de la actividad hipoglicemian- te de plantas de los valles altos y bajos de Cochabamaba. Universidad Nacional Mayor de San Simón. Facultad de Farmacia y Bioquímica de Cochabamba, Bolivia, 2000.
 17. IBÁÑEZ, V. L.
Importancia de la Investigación en Plantas Medicinales. FOLIUM Año XII N°34. Instituto de Química. UNAM, México; 2002.
 18. ISHIBASHI, F.
Alloxan action on glucose metabolism in cultured fibroblast:2. Effects on pentose-mono phosphate shunt and tricarboxilic acid pathways. *Am. J. Physiol.* 240 (6):E 645-E648; 1981.
 19. IISLAM, M.; ZACARÍA, M.; RADHKRISNAN, R.; ISMAEL, A.; LIU, X.; CHAN, K. et al.
Preliminary studies on the antidiabetic effect of *Teucrium stocksianum* Boiss (Fam Labiatae) in streptozotocin diabetic mice. *J Pharm Pharmacol.* 51 (suppl): 342; 1999.
 20. KIM, O. K.; LEE, E. B.
The screening of plants for hypoglycemic. Action in normal and alloxan-induced hiperglycemic rats. *Korean J Pharma-cog.* 23(2):117-9; 1992.
 21. MAEDA, C.; FERNÁNDEZ, T.
Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex insitivity in rats *J. Med Biol Res;* 28(4):497-501; 1995.
 22. OKAMOTO, K. T.
Diabetes experimental. *Sec Pathol Ispan;* 32:99-105; 1942.
 23. SHARMA, S.; DWIVEDI, S.; SWARUP, D.
Hypoglycemic, antihiperglycemic and hypolipo- demic activities of *cesalpinia bonducella* seeds in rats. *J Ethno-pharmacol;* 39-44; 1997.
 24. TALLA, O.; VILLEGAS, L.; FERNÁNDEZ, I.
Efecto hipoglicemiente del extracto acuoso de *Geranium Ayavacense* en ratas tratadas con Streptozotocin. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Ciencias y Filosofía. Congreso FITO, 2000.