

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**EFFECTO ANTIOXIDANTE E HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DEL *Geranium ruizii* Hieron. "PASUCHACA"
ADMINISTRADO EN RATAS HIPERGLICÉMICAS INDUCIDAS CON ALOXANO**

TESIS:

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

BACH. ARANGO VALENCIA EVELYN KATIA
BACH. CHINCHAY SALAZAR ROSA MADELINE
BACH. PALOMINO ORMEÑO BALVINA ESTELA

ASESORA:

Dra. LUZ J. CHACALTANA RAMOS

CO-ASESOR:

QF. OSCAR HERRERA CALDERON

ICA - PERÚ

2014

DEDICAMOS LA PRESENTE TESIS:

A Dios por mostrarnos día a día que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible.

A nuestros padres y hermanos quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de nuestra vida estudiantil; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivos de nuestras vidas.

A nuestros asesores quienes confiaron en cada una de nosotras para poder llevar a cabo el desarrollo de la presente tesis, brindándonos sus conocimientos y apoyo incondicional en esta ardua labor.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más amplio agradecimiento a todas aquellas personas importantes en nuestras vidas, que siempre estuvieron listos para brindarnos toda su ayuda.

Gracias a nuestros padres, hermanos y demás familiares.

Agradecemos de manera muy especial a nuestra asesora Dra. Luz J. Chacaltana Ramos, a nuestro Co-Asesor de tesis Q.F Oscar Herrera Calderon quiénes con sus conocimientos y con su apoyo incondicional supieron guiar el desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación.

A todos nuestro mayor reconocimiento y gratitud.

ÍNDICE

	PAGINA
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	
SUMMARY	
RESÚMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
III. MARCO TERIÓCO	6
1. ANATOMÍA DEL PÁNCREAS	7
1.1. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL	9
1.2. FUNCIONES DEL PÁNCREAS.	11
1.3. INSULINA	12
1.4. ACCIÓN DE LA INSULINA EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.	14
1.5. RECEPTORES DE INSULINA.	17
2. GLUCOSA	18

2.1. METABOLISMO DE LA GLUCOSA.	19
2.2. TRANSPORTE DE GLUCOSA.	22
3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA GENERADIABETES MELLITUS	24
4. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	27
4.1. FLAVONOIDES	28
5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>.	31
5.1 MÉTODO DE INHIBICIÓN FRENTE AL RADICAL LIBRE 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZILLO (DPPH).	32
5.2 TROLOX	33
6. MALONDIALDEHIDO	34
7. DIABETES MELLITUS	35
7.1. TIPOS DE DIABETES MELLITUS	36
7.2. DIABETES MELLITUS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO	10
7.3.FARMACOTERAPIA EN LA DIABETES MELLITUS	13
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MATERIALES	
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	45
1.2. MATERIAL FARMACOLÓGICO.	45
1.3. MATERIAL EN GENERAL.	45
1.4. SALES QUÍMICAS Y REACTIVAS	46

1.5. EQUIPOS.	47
2. METODOLOGÍA ANALÍTICA	
2.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO.	
2.1.1. RECOLECCIÓN, SELECCIÓN, SECADO Y CONSERVACION DE LA MUESTRA.	47
2.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE VEGETAL.	48
2.1.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL <i>Geranium ruizii</i> Hieron "pasuchaca".	48
2.1.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANOLICO DEL <i>Geranium ruizii</i> Hieron "pasuchaca".	48
2.1.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.	51
2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.	
2.2.1. MÉTODO DE INHIBICIÓN FRENTE AL RADICAL LIBRE 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRACILO (DPPH).	55
2.2.2. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DEL NIVEL DE MALONDIALDEHÍDO (MDA).	59
2.3. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL50).	60
2.4. INDUCCIÓN DE HIPERGLUCEMIA EN RATAS.	61
2.5. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL PANCREAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.	64
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
VII. RESULTADOS	

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO	
1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	67
1.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO DEL <i>Geranium ruizii</i> Hieron "pasuchaca".	67
1.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL <i>Geranium ruizii</i> Hieron "pasuchaca".	68
1.4. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.	68
1.5. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD ORAL AGUDA.	69
1.6. INDUCCIÓN DE HIPERGLICEMIA.	70
1.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.	73
1.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANIOXIDANTE IN VIVO.	75
1.9. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL PÁNCREAS DE RATAS HIPERGLICÉMICAS TRATADAS CON EL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Geranium ruizii</i> Hieron "pasuchaca".	76
VIII. DISCUSIÓN.	77
IX. SUGERENCIAS	83
XI. CONCLUSIONES.	85
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	87
XIII. ANEXOS	105

ABREVIATURAS

DM: Diabetes Mellitus

OMS: Organización Mundial de la Salud

DPPH: 1,1 difenil-2-picril-hidracil

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

EOx: Estrés oxidativo

EROs: Especies reactivas derivadas del oxígeno

AntiGAD: Anticuerpos anti-ácido glutámico descarboxilasa

LPO: Lipoperóxido

RER: Retículo endoplasmático rugoso

GLUT: Transportador de glucosa

FADH₂: Adenina reducido

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina forma reducida

ATP: Adenosín trifosfato

SLGT: Proteínas de transporte sodio-glucosa

SOD: Superóxido dismutasa

CAT: Catalasa

GPx: Glutación Peroxidasa

GRd: Glutación Reductasa

GSH: Glutación

OH: Radical hidroxilo

GSSG: Disulfuro de glutación

PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.- Anatomía del Páncreas.
- Figura 02.- El Páncreas y Conductos Biliares (Ganong W: fisiología médica).
- Figura 03.- Estructura Química del Aloxano.
- Figura 04.- Estructura Estreptozotocina.
- Figura 05.- Clasificación de los Antioxidantes.
- Figura 06.- Estructura básica de los Flavonoides y sistema de numeración.
- Figura 07.- Vías Metabólicas activadas por la Hiperglucemia Crónica vinculadas con el desarrollo de Estrés Oxidativo en sujetos Diabéticos (modificado de: Gugliucci 2000).
- Figura 08. Curva de calibración del ácido gálico.
- *Figura 09.* Evaluación del peso de los ratones en el estudio de la Toxicidad oral aguda durante 14 días.
- Figura 10. Medida de la Glucosa post inducción de la Hiperglicemia hasta las 98 h.
- Figura 11. Porcentaje de Efecto Hipoglucemiante del extracto etanólico del ***Geranium ruizii*** Hieron "pasuchaca"
- Figura 12. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del Trolox.
- Figura 13. Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de la "pasuchaca".
- Figura 14. Comparación de la Actividad Antioxidante del ***Geranium ruizii*** Hieron "pasuchaca", Trolox y Vitamina C a diferentes concentraciones.

- Figura 15. Evaluación de los niveles de Malondialdehído (MDA) en suero a los diferentes grupos experimentales.
- Figura 16. Microfotografías de páncreas (Islotes de Langerhans) de ratas tratadas con el extracto etanólico del *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca" en un modelo de Hiperglicemia inducida por Aloxano. 400 X

LISTA DE TABLAS

- *Tabla 01.- Transportadores de Glucosa.*
- *Tabla 02- Características de los Antidiabéticos orales disponibles en Latinoamérica..*
- *Tabla 03.- Pasos para la preparación del estándar de polifenoles.*
- *Tabla 04. Diseño experimental para toxicidad oral aguda en ratones.*
- *Tabla 05.- Diseño del experimento Farmacológico.*
- *Tabla 06. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron.*
- *Tabla 07. Cuantificación de polifenoles totales del extracto etanólico de **Geranium ruizii** Hieron "Pasuchaca".*
- *Tabla 08. Niveles de glucosa sanguínea pos tratamiento a las 50 horas de la inducción de hiperglicemia con aloxano en ratas.*
- *Tabla 09. Niveles de glucosa sanguínea pos tratamiento a las 74 horas de la inducción de hiperglicemia con aloxano en ratas.*
- *Tabla 10. Niveles de glucosa sanguínea pos tratamiento a las 98 horas de la inducción de hiperglicemia con aloxano en ratas.*
- *Tabla 11. Niveles de malondialdehído expresados en nmoles/mL de plasma a las 98 horas pos-inducción de hiperglicemia.*

RESUMEN

Introducción: *Geranium ruizii* Hieron. (Pasuchaca) es una especie utilizada por sus propiedades medicinales como hipoglucemiante. **Objetivo:** Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico del *Geranium ruizii* Hieron. Administrada en ratas hiperglicémicas inducidas con aloxano. **Diseño:** Experimental. **Institución:** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica, Perú. Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Material biológico:** Planta entera de *Geranium ruizii*, Ratas Holtzman machos de 8 semanas con 200 ± 20 g. **Intervenciones:** Se formó seis grupos (n=6): 1) Control aloxano (A) 100 mg/kg vía; 2) A + EGR 50 mg/kg; 3) A + EGR 150 mg/kg; 4) A + EGR 300 mg/kg; 5) A + Glibenclamida 5 mg/kg; 6) A + Insulina 4UI/Kg. Se utilizó la prueba de U-Mann-Whitney y Kruskal Wallis ($p < 0,05$) en el programa SPSS. **Principales medidas de los resultados:** Porcentaje de inhibición del radical DPPH (%), MDA (nmoles/mL), Porcentaje de reducción de la hiperglicemia. **Resultados:** La dosis de 150 mg/kg de peso, mostró efecto hipoglicemiante y antioxidante *in vivo* a las 98 h pos inducción de aloxano ($p < 0,05$). Porcentaje de actividad antioxidante *in vitro* fue de 23,66% a la concentración de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusiones:** El extracto etanólico de *Geranium ruizii* (pasuchaca) presentó efecto hipoglicemiante a la dosis de 150 mg/Kg en ratas hiperglicémicas inducidas por aloxano.

Palabras clave: *Geranium*; hiperglicemia; hipoglucemiante; Malondialdehído, aloxano, antioxidante.

ABSTRACT

Introduction: *Geranium ruizii* Hieron. (Pasuchaca) is specie used by traditional medicine like hypoglycemic. **Objective:** To evaluate the hypoglycemic effect of the extract ethanolic of *Geranium ruizii* Hieron. post administration in hyper-glycemic rats induced by alloxan. **Design:** Experimental. **Institution:** Faculty of Pharmacy and Biochemistry, National University San Luis Gonzaga, Ica, Perú. Human Medical Faculty, National University of San Marcos, Lima, Peru. **Biological material:** *Geranium ruizii*, Rats Holtzman Male of 8 weeks with 200 ± 20 g. **Interventions:** Six groups randomized were formed (n=6); 1) Control alloxan (A) 100 mg kg; 2) A + EGR 50 mg kg; 3) A + EGR 150 mg kg; 4) A + EGR 300 mg kg; 5) A + glibenclamida 5 mg kg; 6) A + Insulin 4UI/Kg. **Main Outcome measures:** Percentage of inhibition of the radical DPPH (%), MDA (nmoles/mL), Percentage of reduction of the hyperglycemia (%). Histopathology study. **Results:** G. ruizii at 150 mg/ Kg showed effect hypoglycemic and antioxidant *in vivo* to 98 h before induction by alloxan (p< 0.05). Assay of the DPPH, percentage of antioxidant activity in vitro was 23,66 % to 1,0 µg/mL. **Conclusion:** The ethanolic extract of *Geranium ruizii* (pasuchaca) presents effect hypoglycemicat 150-mg Kg. in hyperglycemic rats induced by alloxan. **Key Words:** *Geranium*; Hyperglycemia; Hypoglycemic effect; malondialdehyde, alloxan, antioxidant.

I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 180 millones de personas en todo el mundo sufren de diabetes y se espera que esta cifra se duplique para el año 2030. En el Perú, se estima que el 5,5% de la población está afectada por esta condición; teniendo una prevalencia del 1 al 8% de la población en general; siendo Piura y Lima los departamentos más afectados. Se menciona que en la actualidad la Diabetes afectará a más de un millón de peruanos y de los cuales menos de la mitad han sido diagnosticados (1, 2, 3).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica considerada como un problema de salud pública; es de etiopatogenia diversa, siendo las causas más frecuentes los trastornos metabólicos, fundamentalmente la hiperglicemia crónica, además de estar asociada a otros factores de riesgo, como dislipidemias, obesidad, hiperinsulinismo y aunado a estos problemas las complicaciones cardiovasculares y la hipertensión arterial (4).

La OMS identifica principalmente 3 tipos de diabetes: Diabetes de tipo 1, Diabetes de tipo 2 y Diabetes gestacional (5).

En la Diabetes Mellitus existe un aumento del estrés oxidativo y una disminución de los sistemas de defensa antioxidante, que se han complicado en la etiopatología de la enfermedad y en la aparición de complicaciones crónicas (6). Fundamentalmente es responsable en esencia la hiperglicemia crónica que manifiestan los individuos afectados por esta enfermedad metabólica, además de la disminución

de las defensas antioxidantes naturales, que conllevan a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno a que afecten a diferentes tejidos y órganos del organismo del diabético, contribuyendo a la aparición de las retinopatías, las nefropatías y las neuropatías diabéticas ^(7, 8).

La medicina alternativa complementaria se está volviendo cada vez más popular en muchos países desarrollados y es a menudo el único tratamiento accesible y asequible disponible⁽⁹⁾. La medicina natural a base de extractos de plantas medicinales es utilizada con el propósito de solucionar diferentes enfermedades; los metabolitos secundarios presentes son responsables de algunas “propiedades curativas” y constituyen un gran potencial de reserva inexplorada de inmensa utilidad ⁽¹⁰⁾.

El ***Geranium ruizii*** Hieron. “pasuchaca”, es una planta medicinal perteneciente a la familia Geraniaceae. Estudios farmacológicos de algunas especies de *Geranium* han demostrado tener actividades biológicas como: antidiabética, hipotensora, astringente, diurética, hepatoprotectora, antioxidante, antiinflamatoria y antiviral ^(11, 12, 13).

Sin embargo, no hay evidencia de estudios científico realizado a la especie sobre su acción antioxidante e hipoglicemiante, razón por la cual se realizó el presente trabajo de investigación. Considerando el uso tradicional que se le atribuye, nos planteamos el siguiente problema de investigación: ¿Presenta el extracto etanólico del ***Geranium***

ruizii Hieron. "pasuchaca" efecto antioxidante e hipoglucemiante en ratas Hiperglicémicas Inducidas con Aloxano?

1.1. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto antioxidante e hipoglucemiante del extracto etanólico del *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" administrada en ratas hiperglicémicas inducidas con aloxano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" mediante el tamizaje fitoquímico preliminar.
2. Cuantificar los fenoles totales presentes en el extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca".
3. Evaluar la toxicidad subaguda del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" a dosis repetidas en ratones, durante 14 días.
4. Determinar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca" en ratas machos raza Holtzman hiperglicémicas inducidos con aloxano.
5. Medir el efecto antioxidante *in vitro* mediante la técnica de captación del radical 1,1 difenil-picril-hidracil (DPPH) y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcador

antioxidante *in vivo*.

6. Evaluar el efecto protector sobre el páncreas a través de estudios Anatomopatológico después de la administración del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca"

II. MARCO TEÓRICO

1. ANATOMÍA DEL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula de aspecto lobulado, plana y de consistencia blanda. Pesa entre 85 a 100 gr, mide entre 14 a 18 cm aproximadamente, y tiene un grosor de 2 a 3cm. Su peso está constituido por agua en el 71% y por proteínas en el 13%, mientras que su composición de grasa es variable y puede oscilar entre 3 y 20%. Se encuentra ubicado transversalmente en el retroperitoneo entre el duodeno a la derecha y el bazo a la izquierda, a la altura de L1-L2. El páncreas ayuda en la digestión a través de la producción de enzimas que se desplazan hasta la primera parte del intestino para la descomposición de carbohidratos, lípidos y proteínas, y es además el encargado de mantener los niveles de glucosa en la sangre controlados⁽¹⁴⁾.

Se considera una glándula mixta ya que posee funciones exocrinas (jugo pancreático de las células acinares) que ingresa en el duodeno y funciones endocrinas (glucagón e insulina de los islotes del páncreas) que ingresan en la sangre, tienen una acción esencial en la regulación del metabolismo⁽¹⁵⁾.

El páncreas se divide en cuatro porciones: cabeza, cuello, cuerpo, y cola. La cabeza es la porción más expandida, abrazada por la curvatura en "c" del duodeno, a la derecha de los vasos mesentéricos superiores, se inserta de manera firme en la cara medial de las porciones descendente y horizontal del duodeno unido por tejido conjuntivo. La

cara posterior de la cabeza se relaciona con la vena cava inferior, arterias y venas renales derechas y venas renales izquierdas ^(16,17).

El cuello o istmo tiene una longitud aproximada de entre 1 y 2 cm y es adyacente al píloro gástrico. Está ubicado por encima de los vasos mesentéricos, que forman un surco en su cara posterior. El Cuerpo del páncreas discurre hacia el lado izquierdo entre la primera y tercera vértebra lumbar adaptándose a la convexidad de la columna. En esta zona está en relación de izquierda a derecha con la aorta, el plexo solar, pilares izquierdos del diafragma, suprarrenal izquierda, riñón e hilio renal. La cola del páncreas está íntimamente relacionada con el hilio del bazo y el ángulo cólico izquierdo. La cola es relativamente móvil y pasa entre las capas del ligamento esplenorrenal con los vasos esplénicos. El conducto pancreático comienza en la cola del páncreas y discurre a través del parénquima (sustancia) de la glándula hasta la cabeza, donde gira hacia abajo y se une con el conducto colédoco ⁽¹⁶⁾. El conducto pancreático se relaciona con el conducto colédoco, con el que termina en la ampolla hepatopancreática o ampolla de Vater. Esta se abre en el duodeno por la carúncula mayor, donde la terminación del conducto pancreático está rodeado por la parte pancreática del esfínter de la ampolla pancreática o esfínter de Oddi, de músculo liso ^(18,19).

La inervación aferente y eferente del páncreas depende de las ramas de los nervios vagos y esplénico. Es escaso el conocimiento disponible acerca del trayecto real de estos nervios hasta el páncreas. Las fibras

nerviosas que se encuentran en el interior del órgano consisten en fibras adrenérgicas posganglionares, fibras colinérgicas preganglionares y posganglionares y fibras sensitivas. Las fibras adrenérgicas se distribuyen sobre todo en los vasos sanguíneos y los islotes, lo que implica que carezcan de efectos directos sobre la función secretora exocrina⁽¹⁸⁾.

1.1. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL

Estructuralmente, el páncreas es una glándula túbulo-alveolar, rodeada por una cápsula conectiva, que envía tabiques al interior, que separan los lobulillos. Esta recorrida en su interior, por el conducto pancreático de Wirsung. Un segundo conducto excretor secundario viene constituido por el conducto de santorini, que drena parte de la secreción de la cabeza del páncreas hacia la carúncula menor del duodeno. En las paredes de estos conductos se disponen fibras musculares lisas que favorecen el transporte de la secreción y que además se concentran en su desembocadura, determinando a la formación de un esfínter. Al margen de este aspecto exocrino, en el páncreas se encuentra también como ya se ha indicado los islotes pancreáticos, formando acúmulos celulares irregulares y ricamente vascularizados dispuestos desordenadamente en relación con los alveolos exocrinos⁽²⁰⁾.

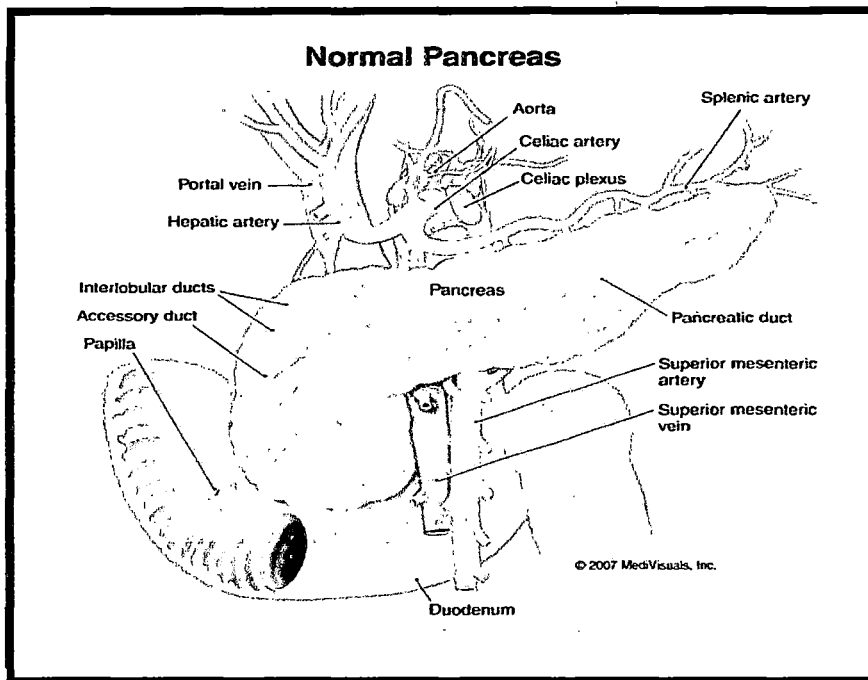


Figura 01.-Anatomía del Páncreas⁽¹⁵⁾

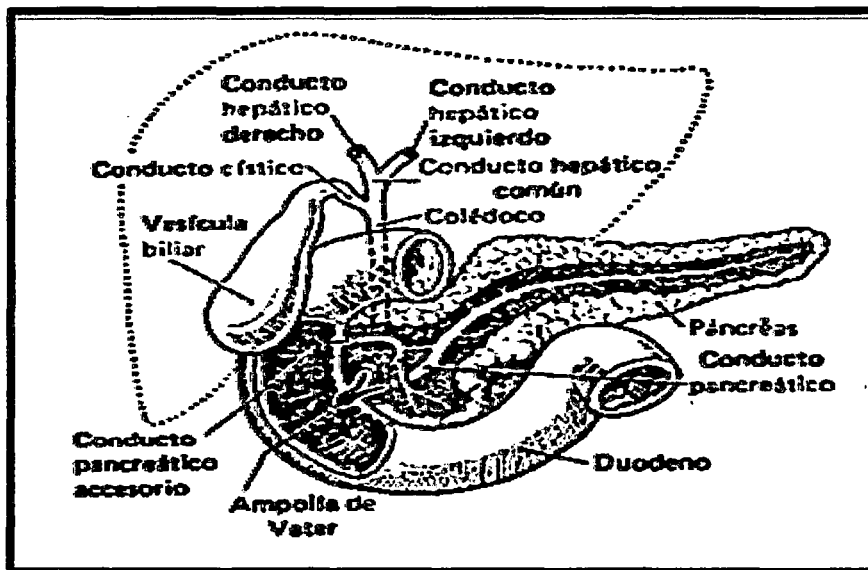


Figura 02.-El Páncreas y Conductos biliares (Ganong W: fisiología médica).

1.2. FUNCIONES DEL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula mixta recubierta por una delgada cápsula de tejido conectivo de la que parten en profundidad septos o tabiques que contienen los vasos de irrigación; estos tabiques dividen la glándula en una serie de lobulillos. El páncreas va a cumplir una doble misión produce secreciones exocrinas y endocrinas cuyo componente son los acinos serosos y los islotes de Langerhans respectivamente ⁽²¹⁾.

El páncreas endocrino se encuentra formado por los islotes de Langerhans que predominan en la cola del páncreas; contienen varios tipos de células siendo tres las principales: células beta (secretan insulina), las células alfa son de menor volumen y en menor número que las células beta se encuentran situadas en la periferia del islote encargadas de la secreción del glucagón hormona hiperglucemiante, el glucagón aumenta el nivel de glucosa en la sangre, estimulando a los hematocitos (o células hepáticas) a activar la enzima glucógeno fosforilasa; esta enzima hidroliza el glucógeno almacenado en el hígado en glucosa, que es vertida en el torrente sanguíneo. También ejerce efecto en el metabolismo de proteínas y grasas. El glucagón pancreático parece ser degradado fundamentalmente en el riñón, ya que en la insuficiencia renal existe una importante elevación de sus niveles séricos, por último las células delta (secretan somatostatina, la somatostatina es un potente inhibidor de la liberación de insulina, sin embargo no tiene efecto sobre la biosíntesis de la proinsulina), estas hormonas son vertidas directamente al torrente sanguíneo. El páncreas

como órgano endocrino, se encarga de la regulación de la glucemia, mediante la secreción de insulina y glucagón, función que está regida por las leyes del sistema neuroendocrino, bajo la acción directa del eje hipotálamo-hipofisario ⁽²¹⁾.

El páncreas exocrino está a cargo de los acines serosos que se encargan de la producción de jugo pancreático, el cual interviene en las funciones digestivas. Los acines están constituidos por células piramidales de núcleo basal, que vierten gránulos de zimógeno a la luz del acines, gránulos que son transportados por los canalículos excretores intra e interlobulillares a los túbulos colectores extra parenquimatosos de jugo pancreático, que son los conductos de Wirsung y de Santorini. Las células de los tubos excretores segregan agua y bicarbonato, que se mezcla con los gránulos de zimógeno. Los gránulos de zimógeno contienen proteínas, amilasa y lipasa, enzimas imprescindibles para el proceso de digestión de proteínas, hidratos de carbono y grasas, respectivamente ^(22, 23).

1.3. INSULINA

La insulina es un polipéptido que contiene 51 aminoácidos, está compuesto por las cadenas A y B unidas entre sí por dos puentes disulfídicos, la cadena A tiene 21 aminoácidos y la B 30 aminoácidos y se encuentran dispuestas en formas de hélices, lo cual influye en las propiedades fisicoquímicas de la hormona. Su importancia viene

determinada por el papel determinante de esta hormona en la homeostasis de la glucemia y su relación con la diabetes mellitus ⁽²⁴⁾.

La insulina se sintetiza a partir de una molécula precursora, la preproinsulina, que penetra en el retículo endoplásmico rugoso (RER), donde una peptidasa escinde el péptido señal de la misma generando la molécula de proinsulina, que sufre un plegamiento que deja alineados los puentes disulfuro entre las cadenas A y B de la misma. Posteriormente la molécula de proinsulina se transporta al aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción. Durante la maduración de los gránulos de secreción actúan dos endopeptidasas (PC1 y PC2, enzimas dependientes de calcio que precisan un pH ácido) y una carboxipeptidasa H que escinden la proinsulina en insulina y péptido C. PC1 y PC2 se sintetizan en las células del islote como preproteínas inactivas, las que se activan por proteólisis limitada que se inicia en el RER y finaliza en el compartimento de los gránulos inmaduros. En el interior del gránulo la insulina se cristaliza en hexámeros, para lo que necesita zinc y un medio ácido. El péptido C y los demás compuestos presentes en él no cristalizan, sino que determinan un halo característico alrededor de un núcleo compacto que es la insulina. La insulina es secretada por las células β mediante exocitosis en cantidades equimolares con el péptido C, para ello los gránulos tienen que ser transportados a través del citoesqueleto de microfilamentos y microtúbulos existentes en ella hasta la superficie de

la célula β . El proceso de secreción de insulina está regulado mediante señales generadas por nutrientes, neurotransmisores y hormonas ⁽¹⁷⁾.

La insulina actúa a nivel celular, uniéndose a su receptor de membrana una multisubunidad transmembrana de tipo glicoproteína que contiene actividad de tirosina cinasa estimulada por la insulina. El contenido de receptores de insulina es variable, su número aumenta en células de respuesta al metabolismo energético: músculo, hígado y tejido adiposo. El receptor fue identificado y su ADN clonado en 1985, y su estructura proteínica determinada en 1994⁽²⁵⁾.

1.4. ACCIÓN DE LA INSULINA EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Los principales blancos de acción de la Insulina en el metabolismo de la glucosa se encuentran en:

➤ HÍGADO

Uno de los principales efectos a nivel hepático de la Insulina es promover la captación de glucosa y el almacenamiento en forma de glucógeno. Esto comprende varias etapas simultáneas:

La insulina inactiva a la fosforilasa hepática, principal enzima que degrada glucógeno a glucosa.

Facilita la entrada de glucosa a los hepatocitos por aumento de la actividad de la Glucocinasa. Promueve la síntesis de glucógeno por

inducción de la Glucógeno-sintetasa e Inhibición de la Glucosa-6-fosfatasa⁽²⁶⁾.

Una vez que ha concluido la comida y el nivel de glucosa comienza a descender se producen varios acontecimientos. La disminución de Insulina, junto con el aumento de Glucagón producen:

- Activación de la Fosforilasa hepática
- Activación de la Glucosa-6 -fosfatasa
- Inhibición de la Glucógeno Sintetasa

Por lo tanto, el hígado capta la glucosa cuando se encuentra en grandes cantidades en la sangre por efecto de la Insulina y la devuelve cuando las concentraciones son muy bajas. Habitualmente el 60% de la glucosa se almacena en este órgano como glucógeno, constituyendo el mismo el principal reservorio de este carbohidrato en el organismo ^(25,27)

➤ **MÚSCULO ESQUELÉTICO**

El músculo en condiciones de reposo no depende de glucosa para obtener energía, sino de los ácidos grasos. Sin embargo existen dos situaciones en las cuales el músculo utiliza grandes cantidades de glucosa. Una de ellas es el ejercicio moderado o intenso, en donde las fibras musculares se hacen naturalmente permeables a la glucosa incluso en ausencia de Insulina, la segunda es a las pocas horas de una gran ingesta de hidratos de carbono, donde la concentración de

Insulina es suficientemente elevada para producir un rápido ingreso de glucosa al miocito. Si el músculo no se está ejercitando y este se encuentra bajo la acción de la Insulina, ésta produce el almacenamiento de glucosa como glucógeno que es especialmente útil para períodos cortos de gran consumo de energía. En síntesis podemos decir que, los efectos de la Insulina sobre el músculo son la captación de glucosa en altas concentraciones y su almacenamiento como glucógeno⁽²⁶⁾.

ACCIONES:

- Estimula la entrada de glucosa (por translocación de los GLUT 4 hacia la membrana).
- Aumenta la glucólisis por estimulación de la fosfofructokinasa I y de la piruvatokinasa.
- Estimula la síntesis de glucógeno al estimular la actividad de la GS.
- Favorece la entrada de aminoácidos en la célula y su incorporación a las proteínas, estimula la síntesis e inhibe el catabolismo de proteínas.
- Estimula la captación y utilización de los cuerpos cetónicos.
- La insulina estimula la bomba Na^+/K^+ lo que favorece la entrada de K^+ a las células.

➤ TEJIDO ADIPOSO

- Estimula la captación (GLUT 4) y utilización de glucosa por el adipocito.
- Aumenta la vía de las pentosas que aporta NADPH al estimular a la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- Favorece la captación de ácidos grasos al estimular a la enzima lipoproteinlipasa 1, que degrada los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas.
- Estimula la síntesis de triglicéridos (al promover la glucólisis y la vía de las pentosas) e inhibe los procesos de lipólisis, por lo que se favorece la acumulación de éstos en los adipocitos.

1.5. RECEPTORES DE INSULINA:

La acción biológica de la insulina se realiza a través de su interacción con receptores específicos. Se componen de 2 unidades alfa, responsables del reconocimiento de la de insulina y de 2 unidades beta, de ubicación al interior de la membrana, con la función de transmitir el mensaje a los efectores intracelulares. Los receptores son degradados y resintetizados continuamente. El número de receptores está contrarregulado en forma negativa por la concentración de la insulina (Down regulation) y su afinidad se reduce por la acción de otras hormonas, entre las que destacan las catecolaminas, glucagón, hormona de crecimiento, corticoides, estrógenos, progesterona y lactógeno placentario. Se ha podido establecer que el bioefecto

máximo de la insulina se puede mantener aún con una concentración del 10% de receptores⁽²⁷⁾.

2. GLUCOSA

Para la mayoría de los animales, incluyendo al hombre, la energía útil para la célula es la energía química, la cual se encuentra contenida en los nutrientes (carbohidratos y lípidos, principalmente) que se consumen. A través de un conjunto de procesos enzimáticos bien definidos, la célula extrae dicha energía y la hace disponible para que se realicen una gran variedad de procesos celulares, entre los que destacan los encaminados a la síntesis de (anabolismo) y degradación (catabolismo) de biomoléculas, a la suma de ambos procesos se le identifica como metabolismo. La célula ha diseñado para la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos un proceso metabólico único (metabolismo de carbohidratos, de lípidos y de proteínas, respectivamente), acompañado cada uno de ellos de un estricto mecanismo de regulación (control metabólico). Los tejidos muscular y adiposo captan glucosa mediante la acción de la insulina. Un aumento de la glucosa en sangre posterior a la ingesta de alimento (estado alimentario) estimula la secreción de insulina. La insulina actúa sobre sus células blanco, se une a su receptor y produce una cascada de eventos intracelulares que produce la translocación de glucotransportadores a la superficie celular captando glucosa extracelular, a este proceso se le conoce como captación de glucosa

estimulada por la insulina. En estado de ayuno los niveles de insulina decrecen, se produce aumento de hormonas contrarregulatorias, se activa la lipoproteína lipasa hormono-sensible, estimulando la obtención de energía a partir de sustratos no glúcidos, especialmente se aumenta la hidrólisis de triglicéridos de los adipocitos y se genera aumento de los ácidos grasos libres en circulación que son captados vía hepática para obtener energía, esto es lo que sucede en condiciones fisiológicas (28, 29, 30).

2.1. METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Los carbohidratos son los principales nutrientes productores de ATP que ingresan a las vías catabólicas, donde son oxidados hasta bióxido de carbono y agua, de hecho, la glucosa es el carbohidrato más importante y el más abundante dentro de los mamíferos, siendo así, el proveedor principal de energía. La glucosa al ingresar a la célula es fosforilada hasta glucosa-6-fosfato, este paso es común para todas las rutas metabólicas de la glucosa. En el músculo esta reacción es catalizada por la hexocinasa, mientras que a nivel de hígado lo hace la glucocinasa. Una de las principales vías catabólicas a las que ingresa la glucosa-6- fosfato es la glucólisis, en esta ruta metabólica intervienen 10 enzimas para oxidar cada molécula de glucosa, obteniendo al final 2 moléculas de piruvato y dos moléculas de ATP; pero además se producen dos moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH), que al ingresar al transporte electrónico producen 6

moléculas de ATP. Así, el piruvato obtenido como producto final en esta ruta metabólica, sufre una descarboxilación oxidativa por acción del complejo multienzimático denominado piruvato deshidrogenasa hasta acetil coenzima A (acetil-CoA), bióxido de carbono y una molécula de NADH por cada molécula de acetil-CoA producida. La acetil-CoA puede ingresar a diferentes vías metabólicas, para la producción de energía se combina con el oxalacetato, ingresando así al ciclo del ácido cítrico, donde se produce una molécula de ATP por cada molécula de acetil-CoA que ingresa al ciclo; pero además, se desprenden 2 moléculas de NADH y una de dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂), que al ser incorporadas a la fosforilación oxidativa, las dos NADH van a producir 6 moléculas de ATP y el FADH₂ 2 ATP; de tal forma que haciendo un balance global, cuando una molécula de glucosa es oxidada por glucólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa, hasta bióxido de carbono y agua, la energía total obtenida es de 38 moléculas de ATP^(31, 32).

Junto con la glucólisis, la vía de la pentosa fosfato o vía de las pentosas es la otra vía metabólica importante para la oxidación de la glucosa, ésta ruta metabólica se lleva a cabo en el citosol o citoplasma de todas las células del organismo, teniendo una mayor actividad en el hígado, tejido adiposo, corteza suprarrenal, tiroides, eritrocitos, testículos y glándulas mamarias en lactancia. Las funciones de esta ruta metabólica son las de proveer al organismo con la ribosa necesaria para la síntesis

de nucleótidos, además de producir fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH), que son los equivalentes reductores indispensables para la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, también se libera gliceraldehído-3-fosfato que al ingresar a la glucólisis es oxidado hasta piruvato, sufriendo una descarboxilación oxidativa por el complejo enzimático denominado piruvato deshidrogenasa hasta acetil Co-A, que puede tomar otras vías metabólicas o ingresar al ciclo del ácido cítrico⁽³³⁾. Cuando la cantidad de glucosa que ingresa al organismo satura las vías metabólicas oxidativas, el excedente de glucosa es fosforilada hasta glucosa-6-fosfato e ingresa a una ruta biosintética para su almacenaje, produciéndose glucógeno como producto final; de hecho, el glucógeno representa la forma más importante para el almacén de los carbohidratos en los mamíferos, encontrándose principalmente en el músculo a una concentración aproximada de 1%, mientras que en hígado se considera que alcanza hasta un 6%⁽³⁴⁾.

La vía del ácido urónico es otra ruta alternativa para el metabolismo de la glucosa, tiene como finalidad la excreción de metabolitos y compuestos químicos extraños (xenobióticos) como los glucurónidos; sin embargo, cuantitativamente tiene menor importancia que las vías metabólicas anteriores, puesto que la cantidad de glucosa metabolizada o requerida por esta vía es menor^(26, 32).

2.2. TRANSPORTE DE GLUCOSA

El metabolismo de la glucosa se lleva a cabo a nivel intracelular, de tal forma que tanto la glucosa plasmática circulante como la que se encuentra en el espacio intersticial, necesita ingresar a las células del organismo para que pueda ser metabolizada. En los mamíferos, este proceso de internalización de glucosa se logra por difusión facilitada, mediada por proteínas transportadoras, las cuales son conocidas como transportadores de glucosa (GLUT), éstos se localizan en las membranas celulares, presentando 12 dominios transmembrana. Se han identificado 7 diferentes transportadores, conocidos por su orden de clonación desde GLUT1 hasta GLUT7^(35,36).

Tabla 01.- Transportadores de Glucosa.

	Ubicación tisular	Funciones
Transportadores bidireccionales facilitadores		
GLUT 1	Encéfalo, riñón, colon, placenta, eritrocito	Captación de glucosa
GLUT 2	Hígado, células β pancreáticas, células epiteliales del intestino delgado, riñón	Censor de la glucosa de las células β ; Captación y liberación rápidas de glucosa
GLUT 3	Encéfalo, riñón y placenta	Captación de glucosa
GLUT 4	Músculo cardíaco, músculo esquelético, tejido adiposo	Captación de glucosa estimulada por insulina
GLUT 5	Intestino delgado (yeyuno) y esperma	Absorción de glucosa, transporte de fructuosa
GLUT 6	Seudogen	Ninguna
GLUT 7	Hígado	Transportador de la glucosa-6-fosfato en el retículo endoplásmico.
Transportadores unidireccionales dependientes de sodio		
SGLT 1	Intestino delgado y riñón	Captación activa de glucosa desde la luz intestinal y reabsorción de glucosa en el túbulo proximal renal contra el gradiente de concentración.
SGLT 2	Túbulos renales	Absorción de glucosa

Fuente: Modificado de Mayes (1997) y Ganong (2000).

En esta tabla se puede apreciar la variación en la distribución y tipo de transportador de las membranas celulares en los diferentes tejidos. Además de estos 7, se han identificado otros dos transportadores de glucosa dependientes de sodio (SLGT), éstos se han denominado como SLGT1 y SLGT2, además de ser dependientes de sodio, requieren de energía para ejercer su actividad; tanto el SLGT1 como el SLGT2, se han localizado en el riñón a nivel de túbulo renales, mientras que el SLGT1 ha sido identificado también en el intestino⁽³⁷⁾. Todos los transportadores de glucosa se localizan en la membrana celular, a excepción del GLUT4, que se encuentra asociado con membranas vesiculares específicas dentro de la célula, y solo emigra hacia la membrana plasmática en presencia de insulina, siendo el único de los 7 transportadores que requiere de esta hormona para efectuar la internalización de glucosa hacia las células musculares y del tejido adiposo⁽³⁸⁾.

A pesar de que la mayoría de los tejidos puede obtener su energía tanto de ácidos grasos como de aminoácidos glucogénicos, el cerebro representa una importante excepción, ya que depende del suministro constante de glucosa para la obtención de su energía, de hecho, el cerebro consume aproximadamente el 65% del total de la glucosa circulante⁽³⁹⁾. Cuando el aporte de glucosa hacia el cerebro disminuye, éste se puede adaptar para suplir la glucosa como fuente energética por

cuerpos cetónicos provenientes del metabolismo de las grasas, pero se activa la posibilidad de llegar a una cetosis y cetoacidosis metabólica⁽³⁷⁾.

En las células musculares y adiposas, la concentración intracelular de glucosa libre es mucho más baja en comparación con la extracelular, pero en estas células la captación de glucosa depende de la velocidad de transporte a través de la membrana plasmática, proceso que se lleva a cabo por difusión facilitada mediada por transportadores GLUT4, que necesitan de insulina para internalizar glucosa a los adipocitos y miocitos⁽⁴⁰⁾, aunque el músculo tiene transportadores GLUT1 que no requieren de insulina, estos tienen un papel minoritario en comparación con los GLUT4⁽⁴¹⁾.

3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA GENERAR DIABETES MELLITUS

Los modelos experimentales que actualmente están siendo utilizados en las investigaciones de diabetes en todo el mundo se basan en el uso de sustancias químicas. La inducción de diabetes experimental en animales de laboratorio usando sustancias químicas es muy conveniente y de uso bastante simple. Para este fin, los químicos más utilizados en la actualidad son el aloxano y la estreptozotocina (STZ), los cuales destruyen la célula β pancreática selectivamente⁽⁴²⁾.

El aloxano es un compuesto químico, estructuralmente similar a la urea^(43,44), posee acción necrosante específica y sobre las células β de los Islotes de Langerhans. En relación con la acción de este compuesto

a nivel pancreático se postulan dos teorías, una describe la interacción de los metabolitos del Aloxano con el zinc pancreático, responsables de la destrucción de las células beta, mientras que otras observaciones sustentan la teoría de la formación de radicales de oxígeno que desempeñan una función significativa en la acción diabetogénica de esta sustancia. El aloxano es un compuesto análogo a la glucosa lo cual permite su entrada a las células beta del páncreas a través de los receptores GLUT-2 provocando la destrucción de las células beta del páncreas, impidiendo así la liberación de la insulina en el organismo⁽⁴⁵⁾.

La respuesta clínica a una dosis diabetogénica de aloxano son 3 tres respuestas. La primera se presenta dos 0 tres horas después y se caracteriza por un estado hipoglucémicos asociado con la glucogenólisis inducida por adrenalina. La segunda, después de seis a doce horas, se distingue por hipoglucemia por liberación de insulina preformada en las células β Por ultimo, después de 18 a 24 horas, la pérdida total de las células β con lleva a una hiperglucemia permanente⁽⁴⁶⁾.

La estreptozotocina es una nitrosourea sintetizada por el microorganismo ***Streptomyces achromogenes***, se le han atribuido propiedades antineoplásicas y antibióticas, y es comúnmente utilizado en la inducción de diabetes mellitus debido a su efecto tóxico específico de la célula β pancreática^(42, 47,48).

Algunas evidencias indican que la toxicidad de la estreptozotocina está mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre la célula beta ⁽⁴⁹⁾. Se cree que provoca un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ya que puede disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis. La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto de estreptozotocina como de aloxano ⁽⁵⁰⁾.

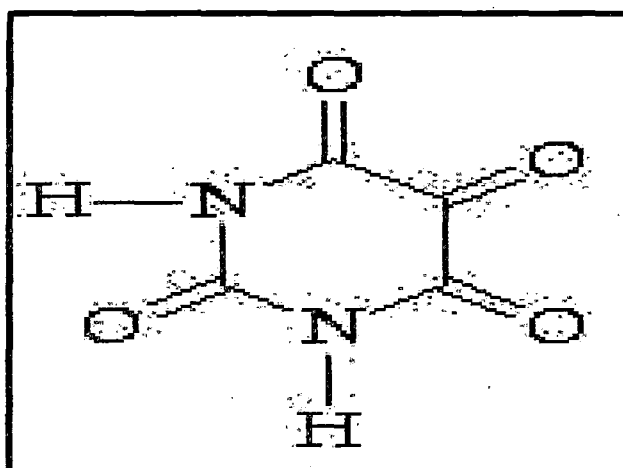


Figura 03.- Estructura química del Aloxano ⁽⁵¹⁾

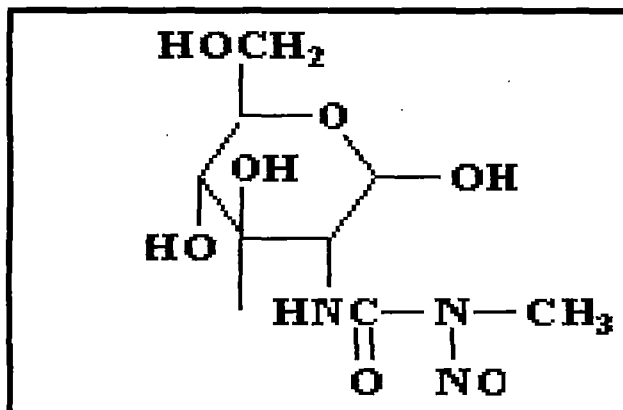


Figura 04.- Estructura Estreptozotocina ⁽⁵²⁾

4. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por: a) reactividad química del antioxidante asociada a la actividad antirradicalaria o estabilizadora de radicales libres; b) capacidad para acceder al sitio de reacción y; c) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres ⁽⁵³⁾.

Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño.

Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como endógenos y exógenos (Ver figura 05). Los sistemas de defensa antioxidante endógeno consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de radicales libres generados por funciones celulares como la respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondrial; el sistema antioxidante endógeno, a su vez, se divide en enzimático y no enzimático. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa, Glutación reductasa, Glutación S-transferasa entre las más importantes. El segundo lo integran el glutati6n, la coenzima Q y el 6cido tioctico o lipoico. El sistema de defensa antioxidante ex6geno se forma

por todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, etc.) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante. Entre los más estudiados se encuentran la vitamina E, vitamina C, β -carotenos y Polifenoles (flavonoides y taninos) ⁽⁵⁴⁾.

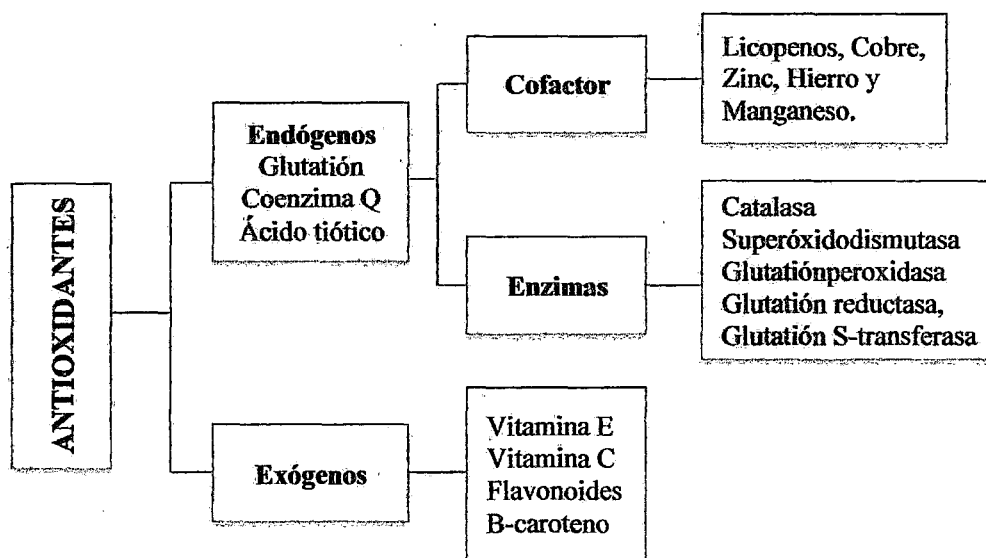


Figura 05. Clasificación de los antioxidantes.

4.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos naturales fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo; y sólo algunos se han detectado en hongos y algas ^(55, 56, 57). Se les encuentra en forma

libre también llamados agliconas flavonoides, pero la mayoría de veces se les encuentra como glicósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos; los O-glicósidos son los hallados comúnmente. Las antocianinas se encuentran como sales en flores, frutos con coloraciones que van del color rojo hasta violeta y el azul ^(58,59). Los flavonoides pueden ser desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da⁽⁶⁰⁾.

Los flavonoides tienen una estructura química definida, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, y cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, se denominan como compuestos C₆-C₃-C₆ (difenílpropano) derivado del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato (Figura 06).

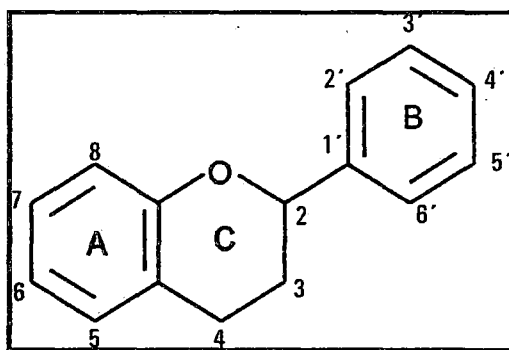


Figura. 06. Estructura básica de los Flavonoides y sistema de numeración.

Los flavonoides se han clasificado en varias clases de acuerdo a las variantes estructurales que presenta la cadena central C₃. Tienen 13 subclases de flavonoides con un total de 5000 compuestos y están agrupados en: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc ⁽⁶¹⁾. Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes ⁽⁶²⁾, antiinflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas, antiasmáticas, antitumorales, etc. Siendo la de mayor importancia la propiedad antioxidante ⁽⁶³⁾.

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y sequestradoras de radicales libres (RL)⁽⁶⁴⁾. También se debe a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); así se evita la generación de especies reactivas derivados del oxígeno (EROs) *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos⁽⁶⁵⁾.

Los flavonoides inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), al mismo tiempo se estimulan otras enzimas con propiedades antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD); así los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí ⁽⁶⁶⁾.

Los flavonoides aumentan la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes; al mismo tiempo que son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs)⁽⁶⁷⁾.

5. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro*

Se han desarrollado un gran número de métodos hasta la actualidad para determinar la posible actividad antioxidante de diversos extractos o muestras.

Siendo difícil determinar la capacidad antioxidante de una muestra por medio de un solo método, por tal razón es necesario combinar varios. Esto se debe a que los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción; pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, pueden capturar radicales libres, formar complejos, quelar metales, reducir algunos compuestos, activar sistemas biológicos antioxidantes. Ya que en un mismo extracto puede haber mezclas de antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, se pueden establecer reacciones sinérgicas siendo necesario el análisis de los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en la muestra ^(68,69). Se deben considerar otros aspectos al determinar la capacidad antioxidante de los extractos vegetales, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación, la localización del antioxidante en las distintas fases, el tipo de sustrato oxidable, las interacciones con otros

compuestos, la composición del sistema, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema ⁽⁷⁰⁾. Por las razones ya descritas los autores tienen la necesidad de combinar más de un método para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* ⁽⁶⁸⁾.

Los ensayos *in vitro* sobre la capacidad antioxidante de extractos de plantas, se deben completar con ensayos *in vivo*, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas, ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante ^(71, 72,73).

Se debe de considerar en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*, las modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes; la comparación entre resultados se debe realizar con precaución aún si se ha realizado el mismo método de medida ya que puede haber sufrido cambios en la manipulación, en la temperatura de la muestra o en el procesamiento, en la metodología empleada en la extracción, etc. También se debe tener cuenta que los resultados para un mismo método se expresan de múltiples maneras, dificultándose su comparación ⁽⁷⁴⁾.

5.1. Método de inhibición frente al radical libre 1,1-Difenil-2 picrilhidrazilo (DPPH)

El método del DPPH se basa en la reducción del radical DPPH[•] por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade

la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a una λ de 515nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido, sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH ^(75, 76).

5.2. Trolox

Antioxidante utilizado en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño celular.

El compuesto ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2- carboxílico, Trolox, es un análogo soluble en agua de la vitamina E (alfa - tocoferol), que se puede comparar con varios antioxidantes comerciales.

Las reacciones entre el Trolox y varios radicales libres oxidantes incluyendo los radicales peroxilo y varios radicales hidroxilo se examinaron mediante el uso de la técnica de pulsoradiólisis, demostrando que el Trolox puede someterse a reacciones rápidas de transferencia de electrones, así como los procesos de transferencia de hidrógeno; el radical fenoxilo resultante demuestra ser

relativamente estable, en común con el radical fenoxilo derivado de la vitamina E.

Las reacciones entre el Trolox (radical fenoxilo) y una variedad de compuestos reductores biológicamente pertinentes se examinaron mediante el uso del pulsoradiólisis. Los resultados evidencian que el Trolox (radical fenoxilo) se repara fácilmente por el ascorbato y ciertos tioles, pero no por urato, galato de propilo. Las pruebas evidencian que el Trolox repara proteínas que se han oxidado por radicales libres ^(77,78).

6.- MALONDIALDEHÍDO.

Los radicales libres son muy reactivos, debido al electrón extra, por tal motivo tienden a extraer un electrón de otras moléculas con el fin de aparear su electrón; estos radicales son fuertemente oxidantes. Estos causan daño a diferentes macromoléculas, produciendo daño a la membrana celular y lipoproteínas por un proceso de peroxidación lipídica, conduciendo a la formación de productos de degradación como los aldehídos en los cuales se encuentra el malondialdehído (MDA) que es un marcador de la oxidación lipídica ⁽⁷⁹⁾.

El malondialdehído es un producto natural de la peroxidación lipídica y la biosíntesis de prostaglandinas; es mutagénico y cancerígeno, se determina en el laboratorio como indicador de estrés oxidativo ⁽⁸⁰⁾.

una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, arterial periférica y cerebrovascular ^(83,84).

7.1. TIPOS DE DIABETES MELLITUS

La OMS reconoce 3 tipos de diabetes: Diabetes de tipo 1, Diabetes de tipo 2 y Diabetes gestacional.

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es un desorden metabólico caracterizado por niveles de glicemia elevados, como consecuencia de una alteración en la secreción de insulina ⁽⁸⁵⁾. Fisiopatológicamente se caracteriza por destrucción de las células β -pancreáticas, con un déficit absoluto de insulina y dependencia permanente a esta hormona. Su presentación puede ser a cualquier edad, siendo su mayor incidencia en menores de 15 años, con mayor frecuencia en edad preescolar y especialmente prepuberal. Su etiología en el 90% es autoinmune, lo que se determina por la presencia de anticuerpos anti-islotos (ICA), anticuerpos anti-ácido glutámico descarboxilasa (antiGAD) y anticuerpos anti-insulina; y un 10% de los casos son idiopáticos ⁽⁸⁶⁾.

La diabetes de tipo 2 es la más común; representa aproximadamente entre el 85 y 90% de los casos, y se relaciona con factores de riesgo modificables como la obesidad o el sobrepeso, la inactividad física y los regímenes alimentarios hipercalóricos y de bajo valor nutritivo ⁽⁸⁷⁾.

Se ha demostrado que en la presentación de la DMT2 hay 2 factores involucrados: a) Una disfunción de las células beta con falta de respuesta secretoria al estímulo de la glucosa sanguínea, y b) Una

resistencia periférica a los efectos biológicos de la insulina, tanto por disminución del número de los receptores insulínico de la membrana celular, como de los receptores postmembrana, todo lo cual conduce a una excesiva producción de glucosa por el hígado y dificultades en la captación de ésta por el músculo y por los adipocitos. En otras palabras la resistencia insulínica puede ocurrir a cualquier nivel de la acción biológica de la insulina, desde su unión inicial a los receptores de la superficie celular, hasta su participación en la cascada de fosforilación de la glucosa. Se ha constatado también el aumento en la secreción de glucagón^(88, 89).

Algunos autores plantean que el defecto primario radica en la célula beta, con deterioro en la secreción de insulina. Por otra parte se ha identificado la causa primaria con la insulino-resistencia como demostración se esgrime el hecho de que la obesidad produce insulino-resistencia y que la disminución del peso corporal reduce marcadamente la posibilidad de desarrollar una diabetes mellitus^(90, 91).

7.2. DIABETES MELLITUS Y EI ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo (EOx) es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros con implicaciones en la homeostasis del organismo por daño a nivel celular, tisular y sistémico. El EOx ha sido asociado con el

mecanismo fisiopatológico de más de 100 enfermedades crónico-degenerativas, entre las que se pueden destacar a la aterosclerosis, el cáncer, la artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y la Diabetes Mellitus^(92, 93).

Es característico en la diabetes el desarrollo de complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares, donde está involucrada la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs), que causarían el daño oxidativo de las células del organismo y se ha comunicado que la hiperglicemia crónica es el principal factor etiológico de las complicaciones diabéticas. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos involucrados en el proceso fisiopatológico no son del todo claros⁽⁹⁴⁾.

El aumento de los radicales libres empeora la acción de la insulina a nivel periférico, contribuye a la disfunción de la célula beta pancreática⁽⁹⁵⁾ y está implicado en el desarrollo de las complicaciones crónicas^(96, 97).

Los radicales libres se definen como átomos o moléculas que en su último orbital presentan un electrón no apareado, por lo cual son especies altamente inestables y reactivas que precisan de obtener el átomo que le falta de las moléculas vecinas, y dependiendo de dónde y cuánto se generen pueden estabilizarse tomando el electrón que requieren de las biomolécula próximas a él, si esto sucede, se puede afectar la fisiología de las células al oxidar a los lípidos de membrana, a

los carbohidratos, a las proteínas e incluso al ADN, lo cual sería uno de los mecanismos de daño del EOx^(98,99).

Existen evidencias que muestran que el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes se ve alterado en los sujetos diabéticos⁽¹⁰⁰⁾. El EOx presente en los sujetos diabéticos se asocia con la hiperglucemia crónica que caracteriza a esta enfermedad, ya que ante un exceso de glucosa circulante se activan varias vías metabólicas no muy usuales en el organismo, lo que conduce a la generación de otros metabolitos entre los cuales se encuentran los radicales libres del oxígeno⁽¹⁰¹⁾.

Los lípidos, son los más susceptibles al daño por los RL, específicamente los poli-insaturados que son fácilmente oxidables. El proceso de oxidación de los lípidos es llamado peroxidación lipídica y los productos de estas reacciones se denominan lipoperóxidos (LPO). En este sentido, las membranas son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, de ahí que este proceso dañe directamente la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos^(102, 103).

Se han descrito varias rutas metabólicas vinculadas con el EOx e implicadas en las complicaciones de la DM2, entre ellas encontramos la ruta del sorbitol (o de la aldosa-reductasa), la de la glucosilación no enzimática de proteínas, la autooxidación de la glucosa, la modificación de la actividad de la protein-cinasa C, la pseudohipoxia, el metabolismo alterado de lipoproteínas y la alteración vía citosinas.

De entre todas las mencionadas, las vías de la autooxidación de la glucosa, la del sorbitol y la glucosilación no enzimática de proteínas han sido las más estudiadas ^(104, 105, 106).

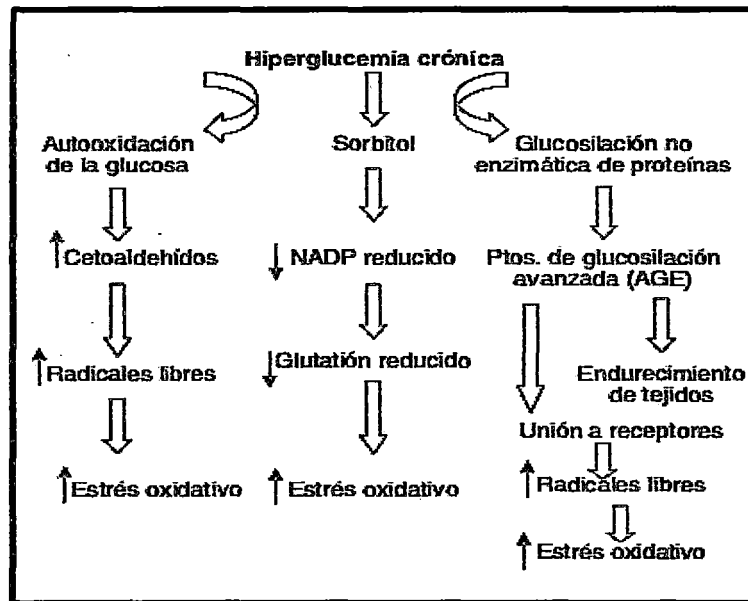


Figura 07.-Vías metabólicas activadas por la hiperglucemia crónica vinculadas con el desarrollo de estrés oxidativo en sujetos diabéticos Modificado de:

Gugliucci, 2000)⁽¹⁰⁶⁾

7.3. FARMACOTERAPIA EN LA DIABETES MELLITUS

En la diabetes mellitus tipo 1 el tratamiento efectivo es sólo con la administración de insulina ⁽¹⁰⁷⁾. Consiste en realizar el reemplazo insulínico imitando en forma dinámica la secreción pancreática por lo que tendremos que utilizar dosis basales y pre-prandriales, aplicando diferentes esquemas terapéuticos adaptadas a las necesidades de cada individuo ⁽¹⁰⁸⁾.

La farmacoterapia de la diabetes tipo 1 busca lograr un control metabólico óptimo para prevenir o retrasar las complicaciones crónicas y mejorar la calidad de vida. El año 1993 se publicó el estudio DCCT ⁽¹⁰⁹⁾, que demostró que el tratamiento intensificado con múltiples dosis mejora el control glicémico y disminuye las complicaciones microvasculares. El seguimiento de esta misma cohorte demostró una reducción también de las complicaciones macrovasculares ⁽¹¹⁰⁾.

En la diabetes mellitus tipo 2 se emplean medidas no farmacológicas y farmacológicas. Las medidas no farmacológicas están orientadas al manejo nutricional y a la actividad física ⁽¹¹¹⁾.

En las medidas farmacológicas se emplean hipoglucemiantes orales detalladas en la tabla 01, los hipoglucemiantes orales pueden emplearse sólo o combinados entre estos y en algunos casos con insulina. El objetivo fundamental del tratamiento de DM2 es prevenir el desarrollo de las complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares, causantes de su elevada morbimortalidad, optimizando el control metabólico. En las medidas farmacológicas se emplean hipoglucemiantes orales los hipoglucemiantes orales pueden emplearse sólo o combinados entre estos y en algunos casos con insulina ⁽⁸¹⁾.

Tabla 02- Características de los Antidiabéticos orales disponibles en Latinoamérica (Guía ALAD 2011,2013)

CLASE	MECANISMO ACCIÓN/ EFFECTIVIDAD	EFFECTOS SECUNDARIOS	CONTRAINDICACIONES
Metformina (biguanidas)	Tiene su mayor efecto a nivel hepático donde inhibe la gluconeogénesis y por lo tanto la producción hepática de glucosa durante el ayuno, aunque también tiene un importante efecto sensibilizador de la insulina a nivel periférico y las personas que la toman ganan menos peso que con otros ADOs.	Con frecuencia produce intolerancia gastrointestinal, especialmente si no se tiene cuidado en dosificarla gradualmente. Sin embargo, la intolerancia puede presentarse meses o años después.	Está contraindicada en presencia de insuficiencia renal o hepática y en alcoholismo, porque se puede producir acidosis láctica.
Sulfonilureas	Tienen su principal efecto como secretagogos de insulina, aunque algunas de última generación como la glimepirida y la gliclazida tiene efectos adicionales favorables sobre el sistema cardiovascular, la función endotelial y la célula beta.	Su principal efecto secundario es la hipoglucemia que es menos frecuente con las de última generación y en particular con las de acción prolongada que se administran una vez al día. Muy rara vez se pueden presentar reacciones cutáneas, hematológicas o hepáticas.	Algunas, como la glibenclamida están contraindicadas en falla renal porque sus metabolitos hepáticos conservan acción hipoglucemiante.

Meglitinidas	Tiene su principal efecto secretagogo de insulina	Su principal efecto secundario es la hipoglucemia aunque se presenta menos que con las sulfonilureas, por tener una acción más corta. Rara vez se pueden presentar reacciones gastrointestinales	Por su metabolismo hepático, se deben evitar en falla severa de este órgano. Además la nateglinida se debe evitar en falla renal severa
Tiazolidinedionas	Tiene su principal efecto como sensibilizadoras de la insulina, aunque cada vez se encuentran más efectos antiinflamatorios /antiaterogénicos derivados de su acción sobre las citoquinas producidas por el tejido adiposo. El efecto sobre los lípidos es variable dependiendo del tipo de glitazona	Su principal efecto secundario es el edema (especialmente en combinación con insulina) y la ganancia modesta de peso	Están contraindicadas en pacientes con insuficiencia cardíaca severa (grados III y IV de la clasificación de NY).
Inhibidores de alfa-glucosidasas	Su principal efecto es la inhibición parcial de la absorción de disacáridos, por lo cual retardan la absorción post-prandial de carbohidratos	Su principal efecto secundario es la flatulencia, especialmente si no se tiene cuidado en dosificarla gradualmente	Bloquea la absorción de disacáridos como el azúcar, por lo cual en el caso de hipoglucemia se debe ingerir solo glucosa

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Material biológico:

- Planta entera de *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca".
- Para el ensayo experimental de Diabetes Mellitus tipo 1 se utilizaron 30 ratas machos albinas raza Holtzman de 250 ± 5 g de peso corporal; provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Siendo colocadas en jaulas con una temperatura ambiental controlada que osciló entre 20 y 23 °C, fueron adaptadas 48 horas antes de realizar el experimento, sus alimentos fueron obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud y agua ad libitum.
- Para la determinación de la dosis letal 50 (DL50) se utilizaron 06 ratones albinos machos cepa Balb-C de 25 ± 5 g de peso corporal obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

1.2 Material Farmacológico:

- Extracto etanólico seco de *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca".
- 01 Frasco de Aloxano monohidrato ($C_4H_2N_2O_4 \cdot H_2O$)
- 01 Frasco de Tiopental sódico (Richmond, División Veterinaria S.A.).
- 01 Frasco de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

1.3 Material en General:

- Material de vidrio
- Pipetas volumétricas AS de 1, 3, 5, 10 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 3, 5, 10 mL

- Matraz volumétrico de 10, 25, 50, 100 mL
- Matraz de Erlenmeyer 100, 250, 1000 mL
- Micropipetas calibradas de 10, 100, 1000 uL
- Tubos de ensayo de 20 mL
- Fiola de 100 mL
- Gradillas
- Frascos de vidrio color ámbar
- Sonda de administración orogástrica
- Jeringas

1.4 Sales químicas y reactivos:

- Reactivo de Liebermann-Burchard
- Cloruro férrico (Merck®)
- Reactivo de Shinoda
- Hidróxido de sodio (Merck®)
- Ácido clorhídrico (Merck®)
- Hidróxido de amonio (Merck®)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Colorante hematoxilina / eosina.
- Metanol (Fisher®)
- Etanol (Fisher®)
- Cloroformo (Merck®)
- Silicagel G60 (Merck®)
- 1, 1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (Sigma®)

- Ácido tiobarbitúrico (ATB) (Sigma ®)
- Tricloruro Férrico (JT Baker ®)
- Formol 40% (Diquimsa®)

1.5 Equipos

- Rotaevaporador (Büchi ®)
- Estufa (Mettler®)
- Horno de aire circulante (Binder ®)
- Centrífuga (internacional Equipment Co®)
- Balanzas analíticas sensibles a 1 g (Hanna®); 0.1 y 0.00001 g (Bennet®)
- Espectrofotómetro UV-VIS (Labo Med®)
- Microscopio óptico (Nikon®)
- Equipo de disección
- Glucómetro Accu-Chek Active (Laboratorios Roche)
- Tiras reactivas Accu-Chek Active (Laboratorios Roche)

2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.1 Estudio fitoquímico.

2.1.1. Recolección, selección, secado y conservación de la muestra

La planta entera de *Geranium ruizii* Hieron “pasuchaca” fue recolectada en el poblado de Huaraz, departamento Ancash, a 3500 m.s.n.m. en el mes de Noviembre del 2013.

Posteriormente la planta entera, fue secada bajo sombra y estabilizadas a una temperatura no mayor de 40 °C, posteriormente se molió en un molino de cuchillas en el laboratorio de Bioquímica de

la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga de Ica".

2.1.2. Clasificación Taxonómica de la especie vegetal.

La muestra vegetal fue determinada botánicamente en el Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú

2.1.3. Obtención del extracto etanólico *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca".

El extracto etanólico se obtuvo por el método de maceración, el cual consistió en extraer los metabolitos de la planta entera de la especie en estudio hasta agotamiento, empleando como solvente etanol al 96 %, una vez que obtuvimos el extracto, se procedió a evaporar el solvente hasta sequedad completa del extracto con ayuda de una estufa con aire circulante y temperatura controlada menor a 40°C. Se realizó en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga de Ica".

2.1.4 Tamizaje Fitoquímico del extracto etanólico (Lock de Ugaz)⁽¹¹²⁾.

El análisis fitoquímico cualitativo se realizó mediante pruebas fisicoquímicas de caracterización según Lock de Ugaz, mediante cambios de coloración o formación de precipitados. La marcha Fitoquímica se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.

Se procedió a realizar las reacciones de identificación o coloración para cada tipo de metabolito secundario presente, con los reactivos específicos; los cuales se expresaran como presencia o ausencia del metabolito: Para ello se utilizó 5 mg de extracto problema con 5 gotas de reactivo.

1. Determinación de Saponinas:

Prueba de la espuma:

A una solución acuosa de la muestra, se le sometió agitación vigorosa durante 30 segundos. La formación de espuma confirmará la presencia de saponinas.

2. Determinación de Flavonoides

Reacción de Shinoda:

A una solución etanólica de la muestra se le añadió granillos de magnesio y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Si se observó un intenso burbujeo y una coloración naranja o rojo, luego de 10 minutos indicara presencia de flavonoides.

3. Determinación de Compuestos Fenólicos

Reacción con Cloruro Férrico (FeCl_3):

A una solución etanólica de la muestra se le añadió 5 gotas del reactivo cloruro férrico (FeCl_3), instantáneamente la solución deberá tomar un color verde oscuro, azul o violeta, lo que indicará la presencia de compuestos fenólicos.

4. Determinación de Taninos

Reacción de la Gelatina:

A una solución acuosa de la muestra se le añadió 5 gotas de solución de gelatina (1 %) que contiene además NaCl (10 %). Si se observa una sustancia en forma de nube en la solución y luego queda en el fondo un precipitado color blanco, confirmaría la presencia de taninos.

5. Determinación de Alcaloides

Reacción de Dragendorff:

A una solución etanólica de la muestra se añadió 5 gotas del reactivo de Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio), si se observó la aparición de un precipitado que fue del color naranja al rojo confirmaría la presencia de alcaloides.

Reacción de Mayer:

A una solución etanólica de la muestra un exceso del reactivo se añadió 5 gotas del reactivo (yoduro de mercurio y potasio), si se observó la aparición de un precipitado blanco, confirmara la presencia de alcaloides.

Reacción de Hager:

A una solución etanólica de la muestra se le añadió 5 gotas del reactivo de Hager (solución de ácido pícrico), si se observó la formación de un precipitado amarillo, confirmará la presencia de alcaloides.

6. Determinación de Quinonas

Reacción de Borntrager:

A una solución etanólica se le adicionó gotas del reactivo de Borntrager (solución de KOH al 5 %). La aparición de una coloración rojiza indica la presencia de este metabolito.

7. Determinación de triterpeno y/o esteroides

Reacción de Lieberman-Burchard:

A una solución etanólica de la muestra se le adiciono el reactivo de Lieberman-Burchard (1 mL de anhídrido acético, 1 mL de cloroformo o diclorometano y se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado.)

Se observó la formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, que cambian con el tiempo confirmará la presencia del metabolito.

8. Determinación de los grupos Aminos Libres

Reacción de la Ninhidrina:

A una solución acuosa de la muestra 5 gotas del reactivo (Hidrato de tricetohidrindeno), si se observó que la muestra se tornó de un color violáceo o amarillo confirmará la presencia del metabolito.

2.1.5. Determinación de Compuestos Fenólicos⁽¹¹³⁾

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por García et al. (2012), para la Determinación de Compuestos Fenólicos presentes en el extracto. El Reactivo Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfotúngstico $H_3PW_{12}O_{10}$ y ácido fosfomolibdico $H_3PMo_{12}O_{14}$. Se

produce una Reacción óxido-reducción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (se reduce) y los polifenoles (se oxidan).

Estos compuestos se reducen al interaccionar con los compuestos fenólicos dando origen a óxidos de coloración azul (óxidos de wolframio y molibdeno), los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con un máximo a 760nm.

Se utilizó también carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% y una solución stock de ácido gálico 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4mg de ácido gálico y se diluyó en 10mL de agua destilada).

Preparación de los reactivos:

- **Reactivo de FolinCiocalteu (FC):** 1/3.
- **Carbonato de sodio (Na_2CO_3):** 20 %
- **Solución stock de ácido gálico (AG):** 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Preparación del estándar de polifenoles: Ácido Gálico

Se tomó 2mL de la solución de **ácido gálico (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)** y se diluyó en 6 mL de agua destilada, para obtener la concentración de **ácido gálico de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/4)**. Luego se procedió a seguir los pasos de la tabla (03).

Tabla 03.- Pasos para la preparación del estándar de polifenoles.

Tubo	100($\mu\text{g}/\text{mL}$)	agua destilada μL	Cc de $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tubo
1	100	900	10
2	300	700	30
3	500	500	50
4	750	250	75

REACCIONES

a) Reacción para el ácido gálico:

- Se tomó 300 μL de cada uno de los tubos de ensayos que contenían el estándar de ácido gálico obtenido en el paso anterior, con la ayuda de la Micropipeta se colocó de forma ordenada en 4 tubos de ensayo rotulados.
- Luego a los 4 tubos que contenían los 300 μL del estándar se adicionó 450 μL a c/u del reactivo de FOLIN diluido y se dejó reposar en oscuridad por 5 minutos.
- Luego se le adiciona 450 μL de carbonato de sodio a cada uno de los 4 tubos de ensayo y finalmente se le adicionó 1800 μL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo, y se llevó a reposar en un ambiente oscuro por 30 minutos, para después de ese tiempo ser llevado al espectrofotómetro o a una longitud de onda de 760 nm.

b) Preparación del tubo blanco

En un tubo de ensayo con la ayuda de la Micropipeta se tomó 300 μL de agua destilada, luego se adiciono 450 μL del reactivo de Folin, se dejó reposar 5 minutos, después de eso se le adiciono 450 μL de carbonato de sodio y finalmente 1800 μL de agua destilada. Al igual que los tubos anteriores se deja reposar por media hora para luego ser llevado al espectrofotómetro.

c) Preparación de la muestra:

Solución madre: Se pesó 43,7 mg del extracto seco del *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca". Se diluyo en 6 mL de etanol.

1° Dilución de la muestra madre: Se tomó 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la solución madre diluida en etanol y se le agrego 5,9 mL de agua destilada.

2° dilución de la muestra madre: Se tomó 100 μL de la solución madre y se le adiciono 1000 μL de agua destilada y se procedió a realizar los pasos para la reacción.

Luego se procedió a realizar las reacciones:

- Se tomó 300 μL de las muestras diluidas (1 y 2 dilución) y se colocó en 3 tubos de ensayo respectivamente.
- Se adiciono 450 μL del reactivo de Folin a cada uno de los tubos de ensayo, se dejó reposar en oscuridad por 5 minutos.
- Se adicionó 450 μL de carbonato de sodio a cada tubo de ensayo, y finalmente se le adiciono 1800 μL de agua destilada.

- Se dejó reposar 30 minutos en oscuridad, para ser llevado al espectrofotómetro.

Preparación de la curva de calibración:

Se tomó 2,9 mL de c/u de los 4 tubos de ensayo de la reacción del ácido gálico respectivamente y se llevó con la ayuda de una celda a realizar la lectura de cada en el espectro fotómetro UV/VIS a 760nm.

Medición del contenido de compuestos fenólicos del extracto etanólico del *Geranium ruizii* Hieron “pasuchaca”

Se tomó 2,9 mL de c/u de los 3 tubos de ensayo de las 2 diluciones de la muestra; con la ayuda de una celda se llevó a realizar la lectura de cada uno respectivamente en el espectrofotómetro UV/VIS a 760nm.

2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.

El método empleado para determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico fue con la prueba del DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidracilo). Y para la determinación del estrés oxidativo se realizó a través del nivel de malondialdehído (MDA).

2.2.1. Método de inhibición frente al radical libre 1,1-Difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) con modificaciones⁽¹⁰⁶⁾.

El método empleado en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams (*et al*, 1995) con algunas modificaciones. Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, por

diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH, ésta reacción se midió con la ayuda de un espectro fotómetro uv/vis.

Se encuentra expresado como IC₅₀ (µg de extracto etanólico /mL). Este valor corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de DPPH a 517 nm con una absorbancia inicial de 0,600.

Se usó como estándar el reactivo TROLOX (6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2carboxílico acid) para obtener la capacidad antioxidante equivalente a TROLOX, y también se usó la vitamina C.

Preparación de las soluciones:

Preparación del radical DPPH:

Se preparó una solución a 0,1 mM de DPPH, pesando 2,2 mg de DPPH, en un matraz aforado previamente tarado se disolvió en 100 mL de etanol, luego se llevó a comprobar que la absorbancia a 517 nm esté entre 0,6 y 0,7. El matraz aforado se cubrió con papel de aluminio para la protección frente a la luz.

Preparación del Trolox:

Se preparó una solución stock 1 mM, se pesó 2.4 mg ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97% (Trolox), se disolvió en 1000µL de etanol y se le agregó 9000 µL de agua destilada.

Preparación de la vitamina C:

Se preparó una solución pesando 2mg de vitamina C en 10mL de agua destilada.

Preparación de la muestra

Se pesó 2,4mg de extracto seco de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" y se diluyó en 10mL de etanol.

Reacciones:

a) Reacción del Trolox:

De la solución preparada de Trolox se procedió a realizar diluciones a concentraciones de 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL en tres tubos de ensayo respectivamente por cada uno de las concentraciones, utilizando la solución preparada del radical DPPH. Se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

b) Reacción de la Vitamina C:

De la solución preparada de la vitamina C; se procedió a realizar diluciones a concentraciones de 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL en tres tubos de ensayo respectivamente por cada uno de las concentraciones, utilizando la solución preparada del radical DPPH. Se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

c) Reacción de la Muestra:

De la solución preparada de extracto seco de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" se procedió a realizar diluciones a concentraciones de 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL en tres tubos de ensayo respectivamente por cada uno de las concentraciones, utilizando la solución prepara del radical DPPH. Se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

Preparación de la curva de calibración:

Se adiciono 2,9 mL de los tubos de ensayo de las diluciones de la reacción del Trolox con el DPPH respectivamente, y con la ayuda de una celda se llevó a leer al espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

Como blanco de calibración del equipo se empleó la solución preparada del radical DPPH.

Medición de la actividad antioxidante del extracto del *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca"

Se adiciono 2,9 mL de los tubos de ensayo de las diluciones de la reacción de la muestra y con la ayuda de una celda se llevó a leer al espectrofotómetro UV/VIS 517 nm. Los resultados fueron expresados como IC₅₀ (µg de extracto etanólico /mL).

2.2.2 Determinación del estrés oxidativo a través del nivel de Malondialdehído (MDA) según Buege & Aust, 1978⁽¹¹⁴⁾.

El marcador de estrés oxidativo fue determinado en suero procedente de la sangre extraída de las ratas sometidas al ensayo de la determinación del efecto hipoglucemiante. Se empleó la prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que en forma general mide la formación de malondialdehído otros carbonilos procedentes de la conversión oxidativa de lípidos y otras moléculas como proteínas. Los resultados serán informados como formación del complejo malondialdehído, ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA), complejo coloreado que se mide a 535 nm. Se usará el coeficiente de extinción molar de MDATBA: $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

REACTIVOS:

Solución de ácido tricloroacético al 20% en una Fiole se preparó 20 mL del mismo en 100 mL de agua destilada.

Solución de ácido clorhídrico al 0.25N se tomó 1,03 mL de ácido clorhídrico y se completó hasta 50 mL con agua destilada.

Reactivo de TBA al 0.67% se pesó 170 mg del TBA y se diluyó en 25 mL de la solución del ácido clorhídrico.

PROCEDIMIENTO

- Se colocó 0,3mL del suero en tubos de ensayo de la sangre extraída de las ratas sometidas al ensayo de la determinación del efecto hipoglucemiante.

- A cada uno de los tubos de ensayo se le añadió 0,6 mL de ácido tricloroacético y se llevó a baño maría hirviendo por 10 minutos.
- Se enfrió los tubos de ensayo, y se le añadió 0,9 mL de TBA al 0,67%
- Se llevó a baño maría hirviendo x 30 minutos.
- Se enfrió con agua helada.
- Se llevó a centrifugar a 4000 RPM por 10 minutos.
- Se prosiguió a separar el sobrenadante y se llevó a leer a 535 nm.

2.3 Determinación de la dosis letal 50 (DL50) ⁽¹¹⁵⁾.

El extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" fue administrado por vía oral según el diseño de la tabla 03 en 6 ratones entre hembras y machos de igual proporción, cepa Balb-C adquiridos del Instituto Nacional de Salud, y con peso promedio de 25 ± 1 g al inicio del experimento, los cuales fueron mantenidos en un ambiente a temperatura controlada de 20 ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h, en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM. La alimentación consistió en ratonina peletizada y agua *ad libitum*. Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24 h, continuando la misma diariamente durante un período de 14 días, registrando cualquier síntoma tóxico que pueda presentarse.

Tabla 04. Diseño experimental para toxicidad oral aguda en ratones.

Nro.	Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Muestra (n)
1	<i>G. ruizii</i>	2000	6
2	Goma de tragacanto	0,1 ml	6

Preparación de la muestra administrada

- Se pesó 1,3 g del extracto etanólico y se diluyó en 13 mL goma de tragacanto para hacer factible la administración vía per oral.

2.4 Inducción de hiperglucemia en ratas albinas raza Holtzman⁽¹¹⁶⁾.

La inducción de hiperglucemia se realizó según el método descrito por Kamesguara Rao et al., (1999). Con modificación en la dosis.

Se utilizaron ratas Holtzman machos de 8 semanas con 200 ± 20 g. A los animales de experimentación se les administró aloxano monohidrato a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal disuelto en buffer citrato pH 4,5 por vía intraperitoneal (IP). Después de las 48 horas las ratas evidenciaron una elevación de la glucosa hasta llegar a los 150 mg/dL de glucosa. El extracto etanólico fue resuspendido en goma de tragacanto, y administrado a las ratas, la administración fue por vía peroral a las 48 h, 54, 56, 72, 98h post inducción de la hiperglicemia por aloxano.

Tabla 05.- Diseño del experimento Farmacológico.

Grupo	Tratamiento
1	Ratas hiperglucémicas
2	Ratas hiperglucémicas tratadas con EE de <i>Geranium ruizii</i> a dosis de 50 mg/Kg
3	Ratas hiperglucémicas tratadas con EE de <i>Geranium ruizii</i> a dosis de 150 mg/Kg
4	Ratas hiperglucémicas tratadas con EE de <i>Geranium ruizii</i> a dosis de 300 mg/Kg
5	Ratas hiperglucémicas tratadas con glibenclamida a 5 mg/Kg de peso.
6	Ratas hiperglucémicas tratadas con 4 UI de insulina

Se realizó el pesado de las ratas de experimentación de cada uno de los grupos, y se procedió a realizar los cálculos adecuados para la preparación de los reactivos.

Preparación del Aloxano: Se pesó 600mg de aloxano y se diluyó en 12 mL de buffer citrato pH 4,5.

Preparación de la Insulina: Se utilizó 4 UI y se diluyó en 3 mL de agua destilada.

Preparación de la Glibenclamida: Se pesó 2,5 mg de glibenclamida y se disolvió en 10 mL de agua destilada.

Preparación del Extracto: Se pesó 1,3 g de extracto y se disolvió en 13 mL de goma de tragacanto.

Antes de la administración del Aloxano a cada uno de los animales de experimentación se procedió a medir la glucosa inicial.

PROCEDIMIENTO:

- Al grupo 1 se le administró 0,352 mL de Aloxano a cada animal de experimentación.

- Al grupo 2 se le administró 0,35 mL de Aloxano a cada animal de experimentación.
- al grupo 3 se le administró 0,33 mL de Aloxano a cada animal de experimentación.
- Al grupo 4 se le administró 0,31 mL de Aloxano a cada animal de experimentación.
- Al grupo 5 se le administró 0,26 mL de Aloxano a cada animal de experimentación.
- Al grupo 6 se le administró 0,20 mL de Aloxano a cada animal de experimentación.

Después de las 48 horas las ratas evidenciaron una elevación de la glucosa. Luego se procedió a realizar la administración correspondiente del extracto, la insulina y la glibenclamida a cada uno de los grupos correspondientes según como indica el modelo experimental.

PROCEDIMIENTO

- Al grupo 1 no se le administró fármaco ni extracto.
- Al grupo 2 se le administró 0,1 mL del extracto etanólico del ***Geranium ruizii*** Hieron. "pasuchaca".
- Al grupo 3 se le administró 0,3 mL del extracto etanólico del ***Geranium ruizii*** Hieron. "pasuchaca".
- Al grupo 4 se le administró 0,5 mL del extracto etanólico del ***Geranium ruizii*** Hieron. "pasuchaca".
- Al grupo 5 se le administró 0,5 mL de la solución de glibenclamida.
- Al grupo 6 se le administró 0,1 mL de la solución de insulina.

La administración se realizó 2 veces al día, posteriormente a cada administración se realizó la medida de la glucosa de los animales de experimentación para poder evaluar los datos obtenidos.

2.5. Estudio Anatomopatológico del Páncreas de los grupos experimentales.

Para la evaluación histopatológica según Devi et al., 1998 ⁽¹¹⁷⁾, los páncreas fueron extirpados y lavados suavemente con solución salina, para remover la sangre y los detritos adheridos al tejido. Se les fijó en solución de formol al 10% tamponado, por 7 días, y luego se seleccionaron las zonas donde de acuerdo al examen macroscópico se evidenciaba lesión aparente. Trascorrido este tiempo, se les procesó en un autotecnicón por 18 horas, en soluciones de alcoholes para deshidratación, hidratación con xilol, y embebido en parafina. El procesamiento de los tacos de parafina se realizó empleando un dispensador de parafina. Los tacos obtenidos fueron llevados a congelamiento a $<0^{\circ}\text{C}$, por un lapso de 3 horas, para luego proceder al corte de 3μ de espesor con ayuda de un micrótomo. Luego, se retiró la parafina en una estufa, para proceder a la coloración con hematoxilina y eosina.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de variables se realizó con medias y medianas. Para la comparación estadística entre grupos se realizó la prueba de U de Mann Whitney y Kruskal-Wallis. Se consideró significativa una $p < 0,05$,

con intervalo de confianza del 95%. Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS Versión 19,0; año 2013.

VII. RESULTADOS

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

1.1. Clasificación taxonómica.

Como resultado de la Clasificación Taxonómica según la Clasificación de Cronquist (1988) y determinado por la Mg.: María Isabel la Torre.

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: GERANIALES

FAMILIA: GERANIACEAE

GÉNERO: Geranium

ESPECIE: *Geranium ruizii* Hieron.

Nombre vulgar: "pasuchaca".

1.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco (%EES) fue de 0.1 %. Este resultado fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\%EES = \frac{\text{Peso final del extracto seco}}{\text{Peso inicial de la muestra seca}} \times 100$$

$$\%EES = \frac{7g}{7000g} \times 100$$

$$\%EES = 0.1 \%$$

1.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo se observa en la tabla 06.

Tabla 06. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron.

Prueba de caracterización	Resultado	Metabolito secundario
Reacción de la NINHIDRINA	(+)	Grupos aminos libres
Reacción de la GELATINA	(+)	Taninos
Reacción con CLORURO FERRICO (FeCl ₃)	(+)	Compuestos Fenólicos
Reacción de DRAGENDÖRFF	(+)	Alcaloides
Reacción de HAEGER	(+)	Alcaloides
Reacción MAYER	(+)	Alcaloides
Reacción de SHINODA	(+)	Flavonoides
Reacción de BORNTRAGER	(+)	Quinonas
Reacción de LIEBERMAN-BURCHARD	(+)	Triterpeno y/o esteroides
Prueba de la ESPUMA	(+)	Saponinas

(-) = Ausencia; (+) = Presencia

1.4. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES PRESENTES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Geranium ruizii* Hieron "Pasuchaca".

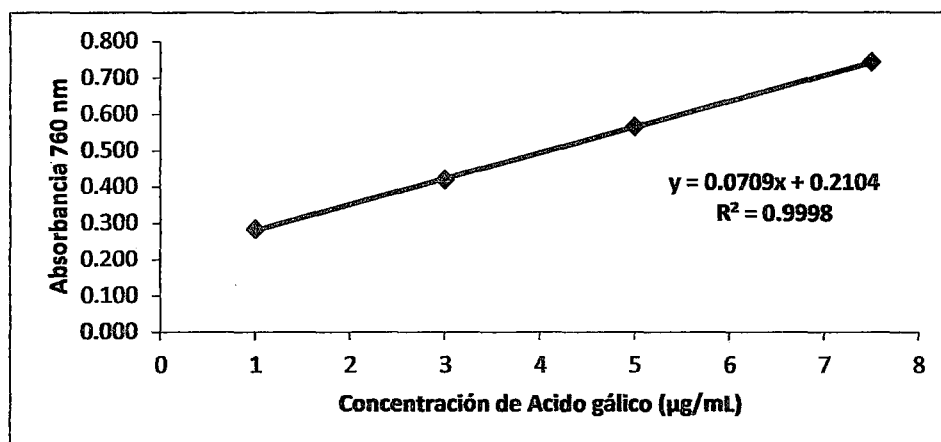


Figura 08. Curva de calibración del ácido gálico

Tabla 07. Cuantificación de polifenoles totales del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron “Pasuchaca”.

Muestra	mgEAG/g extracto	DE
Extracto etanólico de <i>Geranium ruizii</i> Hieron.	42,07	7,18

D.E.: desviación estándar, mgEAG/g = miligramos equivalente a Acido gálico por gramo de extracto.

1.5. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD ORAL AGUDA A DOSIS ÚNICA DURANTE 14 DÍAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Geranium ruizii* Hieron “Pasuchaca”.

En la figura 09 se observa la variación del peso de los animales durante 14 días. Se establece una dosis letal media mayor a los 2000 mg/Kg.

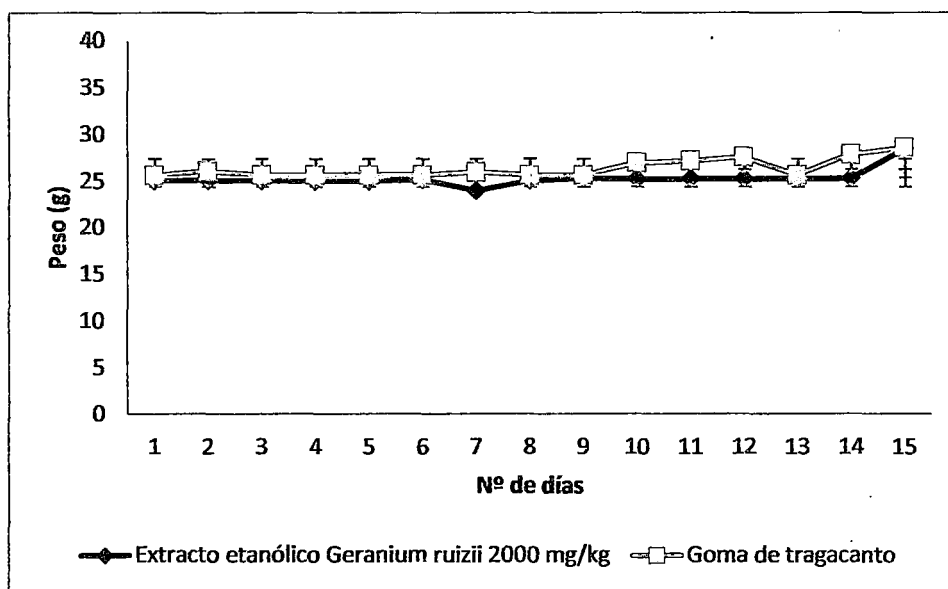


Figura 09. Evaluación del peso de los ratones en el estudio de la Toxicidad Oral Aguda durante 14 días.

1.6. INDUCCIÓN DE HIPERGLUCEMIA EN RATAS ALBINAS RAZA HOLTZMAN SEGÚN EL MÉTODO DESCRITO POR KAMESGUARA RAO et al., (1999).

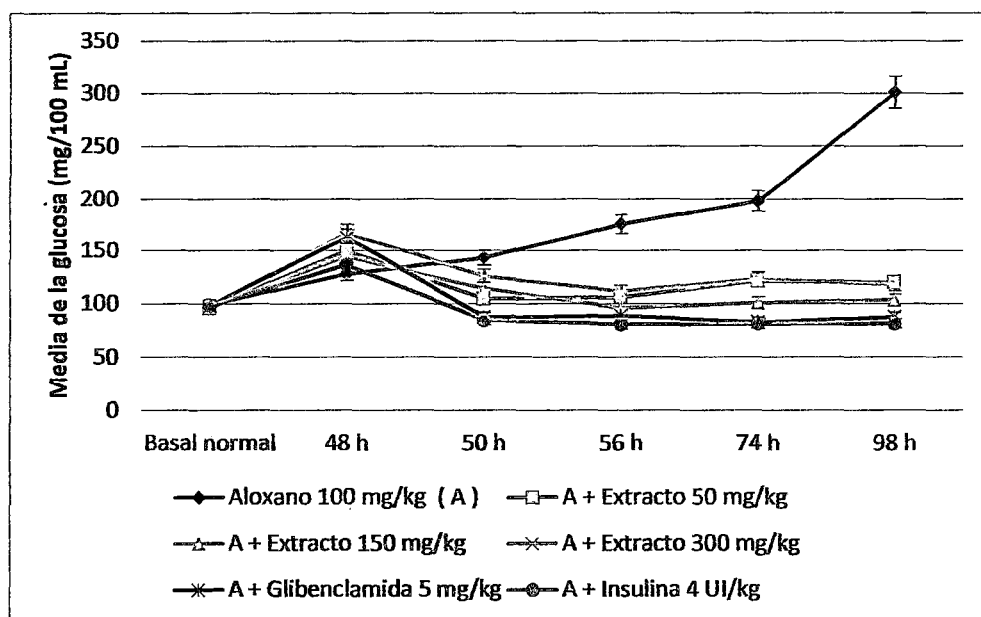


Figura 10. Medida de la Glucosa post inducción de la Hiperglicemia hasta las 98 h.

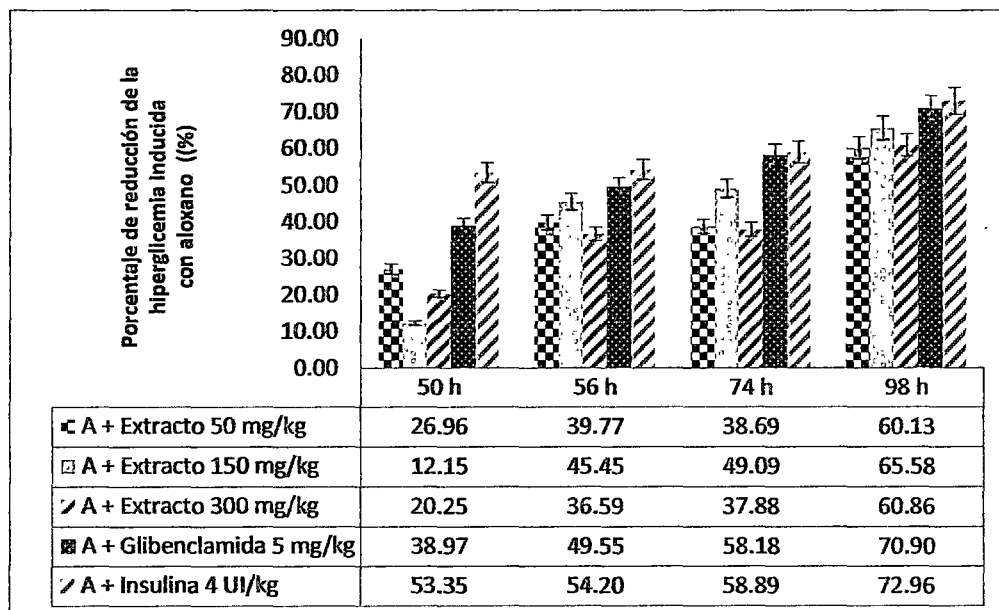


Figura 11. Porcentaje de reducción de la Hiperglicemia Inducido por Aloxano.

Tabla 08. Niveles de glucosa sanguínea pos tratamiento a las 50 horas de la inducción de hiperglicemia con aloxano en ratas.

Grupo experimental*	Dosis (mg/Kg)	Peso (g)	Glucosa sanguínea (mg/100mL)		
			$\bar{x} \pm DE$	Med	P
Aloxano (A)	100	220	143,2 ± 13,96	145	-
Extracto + A	50	210	104,6 ± 7,20	106	< 0,001
Extracto + A	150	180	114,2 ± 10,40	116	< 0,001
Extracto + A	300	220	125,8 ± 6,18	125	< 0,001
Glibenclamida + A	5	224	87,4 ± 16,28	80	< 0,001
Insulina + A	4 UI/Kg	213	84,6 ± 8,26	85	< 0,001

Los datos de ninguno de los extractos presentó distribución normal ($p < 0,05$, Shapiro Wilk) X: media; DE: desviación estándar; Med: mediana; A: aloxano; p: comparación entre las medianas de las dosis del extracto y del aloxano 100 mg/kg, (Prueba de Mann-Whitney).

Tabla 09. Niveles de Glucosa sanguínea pos tratamiento a las 74 horas de la inducción de Hiperglicemia con Aloxano en ratas.

Grupo experimental*	Dosis (mg/Kg)	Peso (g)	Glucosa sanguínea (mg/100mL)		
			$\bar{x} \pm DE$	Med	p
Aloxano (A)	100	220	198,0 ± 10,84	195	-
Extracto + A	50	210	121,4 ± 6,95	121	< 0,001
Extracto + A	150	180	100,8 ± 5,45	99	< 0,001
Extracto + A	300	220	123,0 ± 6,36	120	< 0,001
Glibenclamida + A	5	224	82,8 ± 3,42	81	< 0,001
Insulina + A	4 UI/Kg	213	81,4 ± 1,52	82	< 0,001

* Los datos de ninguno de los extractos presentó distribución normal ($p < 0,05$, Shapiro Wilk) X: media; DE: desviación estándar; Med: mediana; A: aloxano; p: comparación entre las medianas de las dosis del extracto y del aloxano 100 mg/kg, ($p < 0,05$, Prueba de Mann-Whitney).

Tabla 10. Niveles de Glucosa sanguínea pos tratamiento a las 98 horas de la inducción de Hiperglicemia con Aloxano en ratas

Grupo experimental*	Dosis (mg/Kg)	Peso (g)	Glucosa sanguínea (mg/100mL)		
			$\bar{x} \pm DE$	M_{ed}	p
Aloxano (A)	100	230	301,0 ± 16,81	301	-
Extracto + A	50	200	120,0 ± 9,70	121	0,009
Extracto + A	150	170	103,6 ± 8,38	99	0,009
Extracto + A	300	220	117,8 ± 11,05	114	0,009
Glibenclamida + A	5	216	87,6 ± 5,85	85	0,009
Insulina + A	4 UI/Kg	220	81,4 ± 2,70	81	0,009

Los datos de ninguno de los extractos presentó distribución normal ($p < 0,05$, Shapiro Wilk) X: media; DE: desviación estándar; Med: mediana; A: aloxano; p: comparación entre las medianas de las dosis del extracto y del aloxano 100 mg/kg, ($p < 0,05$, Prueba de Mann-Whitney)

1.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Geranium ruizii* Hieron "Pasuchaca".

El extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "Pasuchaca" se determinó mediante el ensayo de captación del radical DPPH según Brand y Williams.

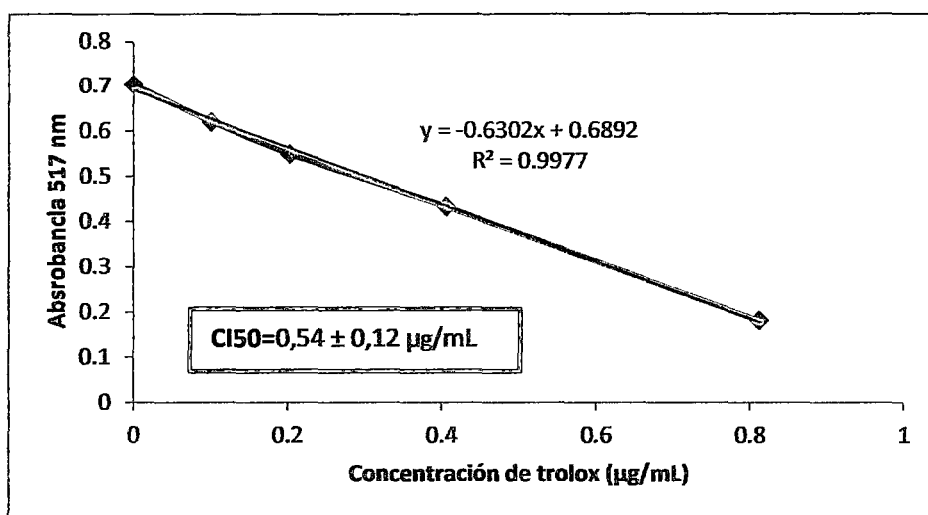


Figura 12. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del Trolox

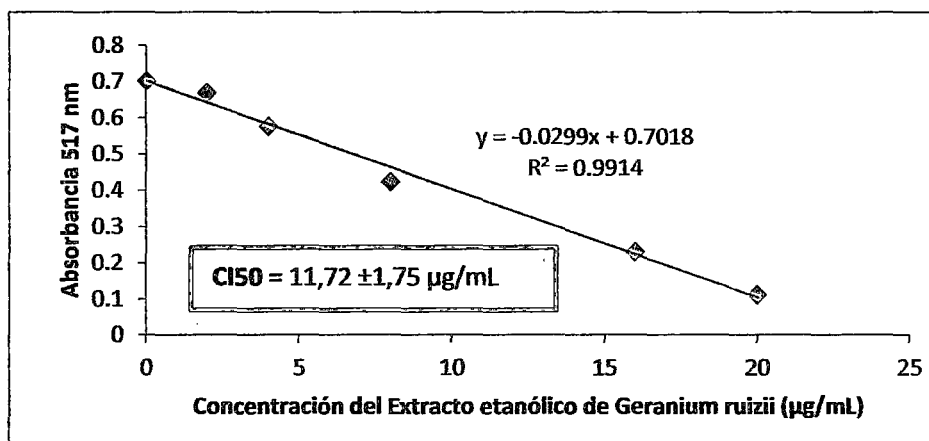


Figura 13. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de "pasuchaca".

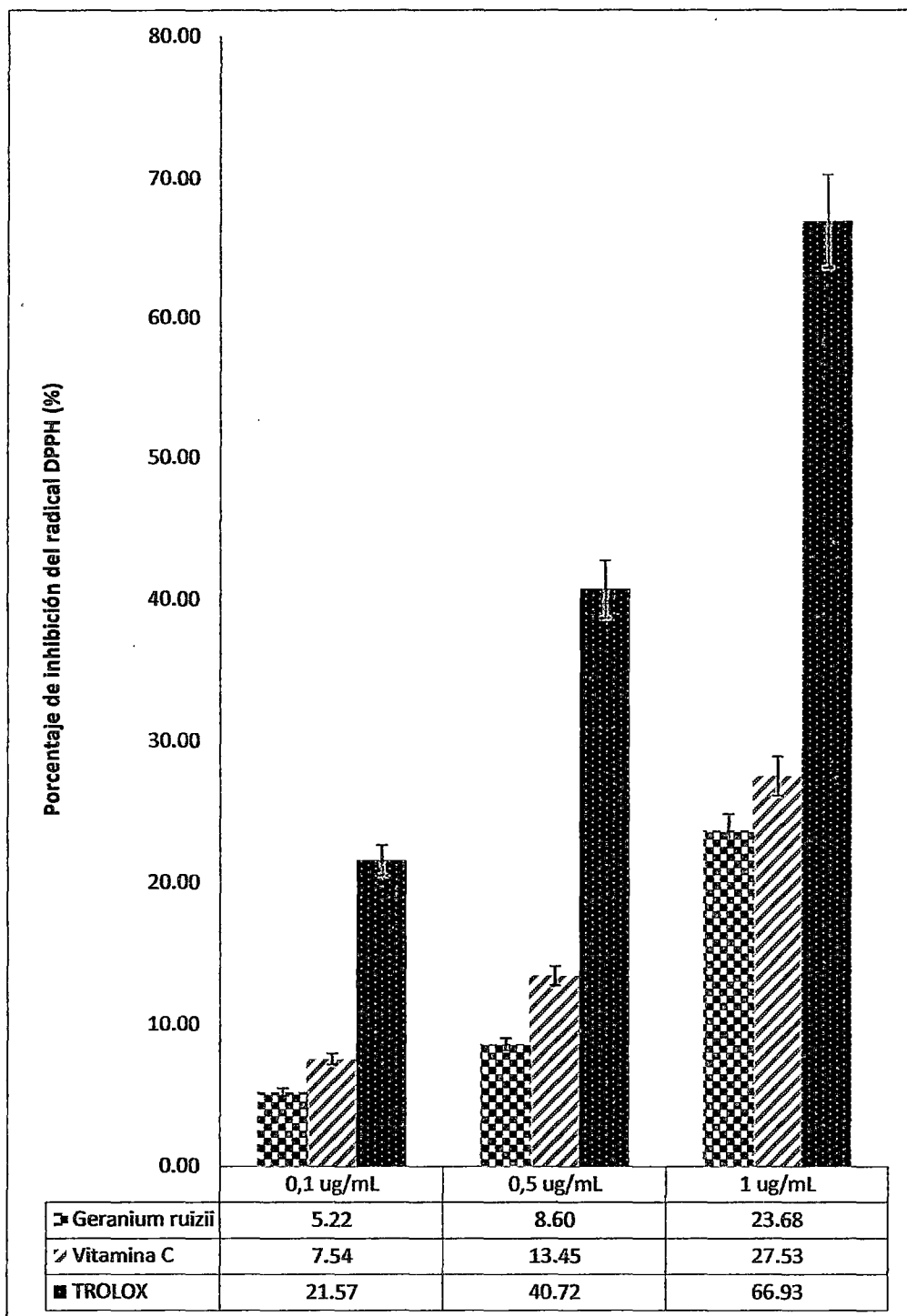


Figura 14. Comparación de la Actividad Antioxidante de Geranium ruizii “Pasuchaca”, Trolox y Vitamina C a diferentes concentraciones.

1.8. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VIVO (MALONDIALDEHIDO).

Tabla 11. Niveles de malondialdehído expresados en nmoles/mL de plasma a las 98 horas pos-inducción de hiperglicemia

Grupo experimental*	x ± DE	P.R. (%)	I.C. 95%		
			P	LI	LS
Aloxano 100 mg/Kg	0,94 ± 0,35	-	-	0,89	0,98
Geranium ruizii 50 mg/Kg	0,78 ± 0,21	17,02	0,007	0,75	0,81
Geranium ruizii 150 mg/Kg	0,73 ± 0,26	22,34	0,008	0,69	0,76
Geranium ruizii 300 mg/Kg	0,81 ± 0,18	13,83	0,007	0,79	0,83
Glibenclamida 5 mg/Kg	0,88 ± 0,36	6,38	0,063	0,83	0,92
Insulina 4UI/kg	0,87 ± 0,39	7,44	0,023	0,82	0,92

Los datos de ninguno de los extractos presentó distribución normal ($p < 0,05$, Shapiro Wilk) X: media; DE: desviación estándar; P.R: Porcentaje de reducción; IC: Intervalo de confianza; LI: límite inferior; LS: Límite superior, p: comparación entre las medianas de las dosis del extracto y del aloxano 100 mg/kg, ($p < 0,05$, Prueba de Mann-Whitney).

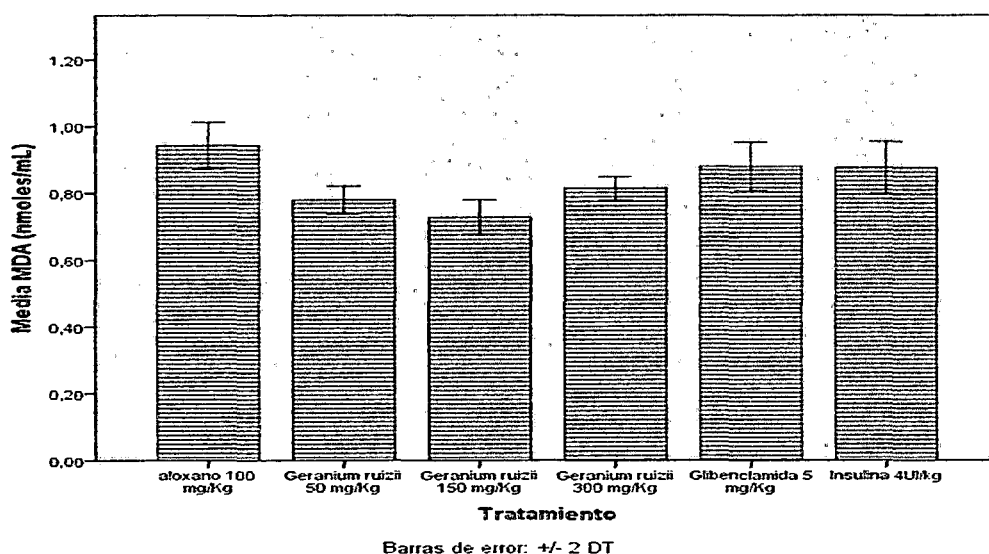


Figura 15. Evaluación de los niveles de Malondialdehído (MDA) en suero a los diferentes grupos experimentales.

1.9. EVALUACION HISTOPATOLÓGICA DEL PÁNCREAS DE RATAS HIPERGLICÉMICAS TRATADAS CON EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Geranium ruizii* Hieron.

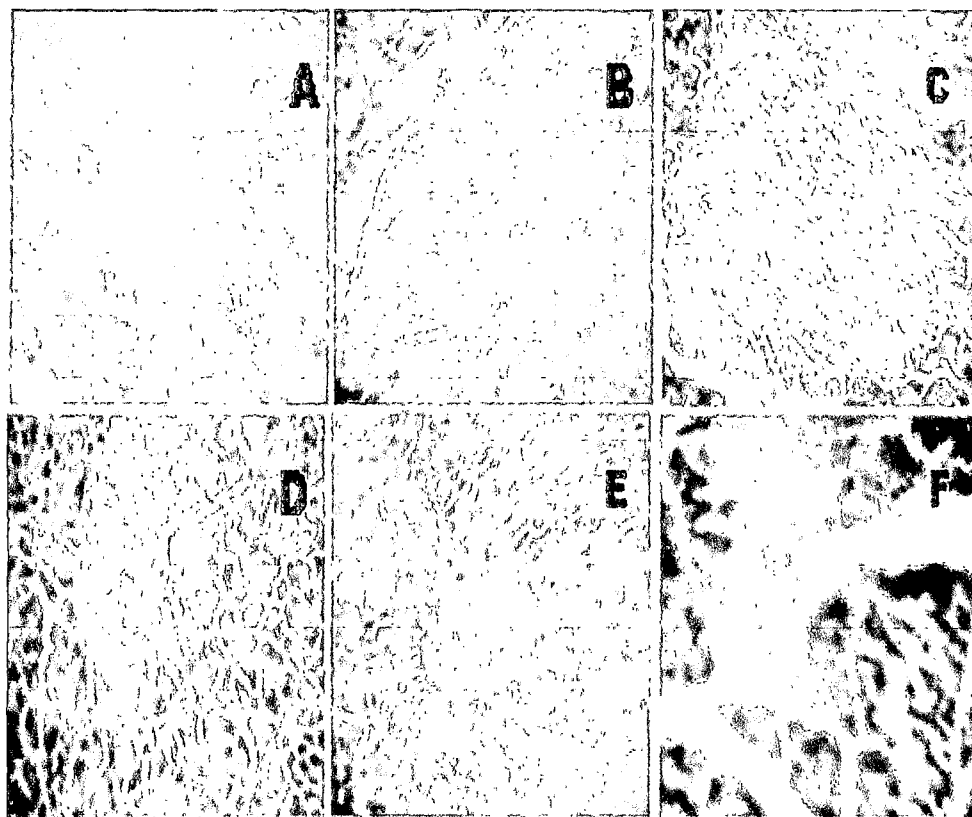


Figura 16. Microfotografías de páncreas (Islotes de Langerhans) de ratas tratadas con el extracto etanólico de *G. ruizii* en un modelo de hiperglicemia inducida por aloxano. 400 X

A: Grupo tratado con aloxano; se observa Islote de Langerhans esclerosado y gran congestión intersticial, **B:** Grupo tratado con *G.ruizii* 50 mg/Kg; páncreas normal, **C:** Grupo tratado con *G. ruizii* 150 mg/Kg, páncreas normal, **D:** Grupo tratado con *G. ruizii* 300 mg/Kg, páncreas normal **E:** Grupo tratado con glibenclamida 5mg/Kg, se observa páncreas muy pequeño esclerosado, **F:** Grupo tratado con Insulina 4UI/Kg; se observa islotes de Langerhans lisándose.

VIII. DISCUSIÓN

La hiperglicemia experimental fue inducida utilizando el método de Kamesguara Rao et al. 1999 ⁽¹¹⁶⁾ teniendo como inductor el aloxano; el cual produce toxicidad de las células beta del páncreas, lo que conlleva a un descenso del nivel de insulina induciendo un estado de Hiperglicemia y dependiendo de la exposición a la cual el animal ha sido sometido al inductor puede llevar a producir diabetes(tipo I) experimental. El mecanismo de acción del aloxano se produce por su semejanza con la estructura química de la glucosa, de esta manera el aloxano es recaptado por la célula beta del páncreas vía transportador de GLUT2, de baja afinidad en la membrana plasmática ⁽¹¹⁸⁾.

Se ha demostrado que el aloxano puede producir especies reactiva oxigenadas (EROs) en una reacción cíclica de redox, produciendo el ácido dialúrico (AH₂), de esta manera el aloxano produce radicales libres intracelularmente en la célula beta pancreática. La autooxidación del ácido dialúrico (AH₂), genera radicales superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y finalmente radical hidróxilo (OH). La reducción de aloxano a AH₂ en la célula beta pancreática requiere de grupos tioles como el tripéptido de glutatión (GSH) y de otros tioles intracelulares presentes en mínimas concentraciones como el monotiol de cisteína y ditiolos ⁽¹¹⁹⁾. Por lo tanto la capacidad de las células de captar aloxano vía GLUT-2, el cual disminuye el potencial de defensa antioxidante contra el estrés oxidativo y la formación de radicales hidróxilo explica la acción tóxica selectiva de las células beta del páncreas así como el efecto hiperglucémico del aloxano ^(120, 121).

En la presente investigación se ha demostrado que el aloxano produce lesión y muerte de las células Beta del páncreas en animales de experimentación sin recibir tratamiento, mientras que los grupos experimentales que recibieron el extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. "pasuchaca" evidenciaron protección (figura 13). El extracto etanólico a dosis de 150 mg /kg redujo la hiperglicemia a un porcentaje de 12,15 %; 45,45 %; 49,09 %; 65,58 %, después de las 50, 56, 74,98 horas de la administración del extracto.

La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una enzima que degrada la incretina; siendo el principal tipo de incretina predominante el GLP-1 quien estimula la secreción de insulina, suprime la liberación de glucagón enlentece el vaciamiento gástrico y mejora la sensibilidad a la insulina, los flavonoides estarían favoreciendo la presencia del inhibidor de dipeptidil peptidasa IV ⁽¹²²⁾. Otros metabolitos secundarios que estarían coadyuvando con el efecto hipoglucemiante son los alcaloides quienes inducen la secreción de insulina solo en concentraciones altas de glucosa, lo cual disminuye el riesgo de hipoglucemia, lo que ha sido confirmado en estudios realizados por García López et al 2004, quien al aislar los islotes pancreáticos y someterlos al alcaloide tipo quinozilidina conlleva a la secreción de insulina ⁽¹²³⁾.

La presencia de compuestos fenólicos en el extracto de pasuchaca (42,07 mgEAG/g extracto) explicarían no solo el efecto hipoglucemiante si no el efecto antioxidante del extracto ya que los polifenoles son reconocidos por

su propiedad de barredores de radicales libres debido a la capacidad de donar electrones, su actividad antioxidante depende de la estabilidad de diferentes sistemas así como también del número y la localización de grupos hidróxilos ⁽¹²⁴⁾. Se ha comprobado que la quercetina activa la hexocinasa y glucocinasa e inhibe la α , β glucógeno fosforilasa y glucosa-6-fosfatasa hepática, considerando que la obesidad ligado a la diabetes tipo II está asociado con un bajo grado de inflamación, se han propuesto que los polifenoles pueden proteger de los daños producidos por la diabetes tipo II a través de sus efectos antiinflamatorios ⁽¹²⁵⁾. Actualmente los polifenoles como la curcumina, capsaicina, gingerol, catequinas, resveratrol y quercetina han demostrado sus efectos antiinflamatorios directamente bloqueando la ruta proteína Kinasa activada por mitógeno (MAPK), actividad NFkB y la expresión de citoquinas antiinflamatorias. Los efectos antiinflamatorios se han sugerido que involucran al menos en parte la activación directamente del receptor activador proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ) ⁽¹²⁶⁾, este receptor es el regulador en varios aspectos del metabolismo de lípidos y diferenciación de adipocitos ⁽¹²⁷⁾.

Otro importante mecanismos de los polifenoles es a través de las proteínas conocidas como Sirtuinas; Sirtuina 1 (SIRT1) que es un tipo de proteínas tipo III deacetilasa implicado en el rol antienvjecimiento y antiinflamatorio evidenciando un rol protector en la enfermedad crónica de la diabetes, y la restricción calórica que produce al activarse directamente este receptor ⁽¹²⁸⁾.

Recientemente, una SIRT1 dependiente de la deacetilación del PPAR γ se ha demostrado como una forma de modulación selectiva para PPAR γ , permitiendo la inducción de los genes BAT y supresión de los genes WAT viscerales, asociados con la resistencia a insulina ⁽¹²⁹⁾, por ello los polifenoles estarían modulando los mecanismos dependientes de AMPK-SIRT1-PPAR γ , jugando un rol importante como antiinflamatorio, anti obesidad, anti esteatosis y efecto hipoglucémico, tales efectos son una consecuencia de la acción sinérgica de varios metabolitos tipo polifenoles ⁽¹³⁰⁾.

Es ampliamente aceptado que la diabetes mellitus incrementa la producción de radicales libres derivados del oxígeno, anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot) en cantidades superiores a los niveles fisiológicos, los que sobrepasan la capacidad antioxidante celular endógena (estrés oxidativo). Los flavonoides desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo ^(131, 132), sus propiedades antirradicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidróxido y superóxido, especies altamente reactivas, de esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células ⁽¹³³⁾. En su mecanismo de detoxificación, el aloxano puede sobrepasar las barreras antioxidantes y formar especies reactivas que tienen como su principal blanco los lípidos de las membranas celulares. Una manera de evaluar este daño es mediante la prueba de lipoperoxidación, en el ensayo in vivo, la dosis de 150 mg/Kg redujo el 22,34 % del contenido de

MDA. El ensayo de capacidad antioxidante in vitro comparado con el Trolox y vitamina C, el extracto etanólico inhibió en un 36 % el radical DPPH lo que demuestra que la actividad antioxidante in vitro se correlaciona a lo observado en el modelo de medición in vivo, esto se debería a que el extracto al contener compuestos fenólicos de naturaleza flavonoidal reduce la formación de la peroxidación lipídica al neutralizar la reacción en cadena de la formación de especies reactivas oxigenadas, puesto que los polifenoles son reconocidos por su propiedad de barredores de radicales libres debido a su propiedad de donar electrones, su actividad antioxidante depende de la estabilidad de diferentes sistemas así como también del número y la localización de grupos hidróxilos ⁽¹³⁴⁾.

En la Evaluación de la toxicidad oral aguda el extracto no evidenció la muerte o algún efecto Tóxico de los animales de experimentación, es por eso que se considera como no Tóxico.

La presente investigación será de gran utilidad a los pacientes diabéticos por comprobar el uso tradicional de la especie vegetal para el tratamiento coadyuvante de las complicaciones de la diabetes mellitus como es la hiperglucemia y el daño al páncreas endocrino.

Por lo anterior mencionado dado los resultados obtenidos y las limitaciones se recomienda realizar estudios con tratamiento crónico y elucidar los metabolitos bioactivos responsables de la actividad hipoglucemiante.

IX. SUGERENCIAS

Por lo anterior mencionado dado los resultados obtenidos y las limitaciones se recomienda realizar estudios con tratamiento crónico y elucidar los metabolitos bioactivos responsables de la actividad hipoglucemiante y antioxidante.

X. CONCLUSIONES

1. Como resultado del Tamizaje Fitoquímico realizado al extracto etanólico del ***Geranium ruizii* Hieron.** "pasuchaca" hemos identificado la presencia de los siguientes grupos de metabolitos secundarios: grupos aminos libres, taninos, compuestos fenólicos, triterpeno y/o esteroides, alcaloides, flavonoides, quinonas, y saponinas.
2. Del extracto etanólico de ***Geranium ruizii* Hieron.** "pasuchaca" se demostró que contiene 42,07 miligramos equivalente a Acido gálico por gramo de extracto.
3. Como resultado de la evaluación de la toxicidad subaguda del extracto etanólico de ***Geranium ruizii* Hieron** "pasuchaca", se determinó que a dosis menores de 2000 mg/Kg no evidencia signos de muerte.
4. El extracto etanólico del ***Geranium ruizii* Hieron** "pasuchaca" tiene efecto hipoglicemiante a dosis de 150mg/kg.
5. El extracto etanólico del ***Geranium ruizii Hieron*** "pasuchaca" presenta actividad antioxidante frente al radical DPPH, teniendo una CI50 de 11,52 y un 66 % de reducción de los niveles de Malondialdehído fue efectivo a una dosis de 1ug/mL. En el método in vivo el extracto etanólico a dosis de 150 mg/kg tuvo un porcentaje reducción de 22,34 de los niveles de MDA.
6. El extracto etanólico del ***Geranium ruizii Hieron*** "pasuchaca" presenta un efecto protector a nivel de páncreas a la dosis de 150 mg/Kg.

XI. REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Villena J. Epidemiología de la diabetes mellitus en el Perú. Rev Med Perú. 1992; 64(347):71-5.
2. Arbañil H, Valdivia H, Pando R. La diabetes mellitus en el Hospital Dos de Mayo. Aspectos epidemiológicos. Rev Med Perú. 1994; 66(350):6-9.
3. Charlton Fe, Núñez O, Tapia ZL, Tapia ZG. Complicaciones tardías en diabetes mellitus tipo 2 en el Hospital II Essalud – Cañete. Rev Med Hered. 2004; 15:64-9.
4. Untiveros F, Núñez O, Tapia L, Tapia G. Diabetes mellitus tipo 2 en el Hospital II Essalud – Cañete. Aspectos demográficos y clínicos. Rev Med Hered. 2004; 15(1):19-23.
5. WHO Media centre nota descriptiva N°312: Organización mundial de la salud [Internet]. Diabetes. [visitado 15/3/2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
6. Nissen S, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. NEJM 2007; 356:2457-71.
7. Jeddú H, Manuel L, Puig H, Pilar G, Enrique M, Marelis Q. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev Mex Patol Clin [internet]. 2011. [visitado 15/5/2014]; 58(1):4-15. Disponible en : <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2011/pt111b.pdf>
8. Rolo AP, Palmeria CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 2006; 212(2):167-78.
9. Bussmann RW, Glenn A. Traditional knowledge for modern ailments –

- plants used for the treatment of diabetes and cancer in Northern Perú. *J Med Plants Res.* 2011; 5(31): 6916 – 6930
10. Kvist L, Oré I, Gonzales A, Llapapasca C. Estudio de plantas medicinales en la amazonía peruana: una evaluación de ocho métodos etnobotánicos. *Folia amazónica.* 2001.12 (1-2).
 11. Karato M, Yamaguchi K, Takei S, T Kino, Yazawa K. Inhibitory effects of pasuchaca (*Geranium dielsianum*) extract on alpha-glucosidase in mouse. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006; 70(6):1482-4.
 12. Miguel OG, Calixto JB, Santos AR, Messana I, Ferrari F, Cechinel Filho V, et al. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med* 1996; 62:146-149.
 13. Toshkova R, Nikolova N, Ivanova E, Ivancheva S, Serkedjieva J. In vitro investigation on the effect of a plant preparation with antiviral activity on the functions of mice phagocyte cells. *Pharmazie* 2004; 59:150-154.
 14. Jover A, García J. Páncreas. Generalidades sobre los Grupos Terapéuticos para los Técnicos en Farmacia. 1ª ed. España: editorial MA.2006.p.687.
 15. Latarjet M, Ruiz L. Páncreas. Anatomía Humana. Volumen 2, 4ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2008.p.1410-1586.
 16. Keith L, Moore A. Vísceras Abdominales. Fundamentos de la Anatomía con Orientación Clínica. 2ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2008. p. 144-184.

17. Michael H, Wojciech R. Aparato Digestivo III: hígado, vesícula biliar y Páncreas. En Negrete J, editor. Histología. 5ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2008. p.624-660.
18. Latarjet M, Ruiz A. Anatomía humana. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid 1999: 535-1546.
19. Moore K, Dalley A. Anatomía con orientación clínica. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid 2002: 262-266.
20. Dee S. Fisiología Humana: un enfoque integrado. 4ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2009; 860: 728-738.
21. Gartner L, Hiatt J. Histología: Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2008.p.624-652.
22. Segarra E. Secreción Exocrina del Páncreas .En: Fernanda S, Hernandez, editores. Fisiología de los Campos y Sistemas. Mexico: U. editores.2006; 436:91-97.
23. Jácome A. Islotes Pancreáticos. 3ª ed. Fisiología Endocrina. Colombia: Kimpres Lta. 2005. 117:67-78.
24. Universidad Clínica de Navarra. Diabetes Mellitus. Fisiología del Páncreas. [visitado 16/5] .Disponible en:
<http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/tercero/IntegradoTercero/ApSemiologia/ApSemiol00.html>
25. Voet D., Voet G.J. Biochemistry. 2th ed. John Wilwy & Sons, INC. E.U.1995.

26. Barbosa J, Castillo A, Fortich A, Vega F, García H, Medina A, et al. Fisiología de la Secreción de Insulina. Fascículo de Endocrinología. Asoc Col de Endocr.2009- 2011; 71:7-11.
27. Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake.
28. Park J, Rho H, Kim K, Choe S, Lee Y, Kim J. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. Mol. Cell. Biol 2005; 25: 5146 - 5157.
29. Lam T, Carpentier A, Lewis G, Van de Werve G. Mechanisms of the free fatty Acid-induced increase in hepatic glucose production. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 284:E863-E871.
30. Lehninger, AL. Catabolismo y producción de la energía del enlace fosfato. En: F. Calvert y J. Bozal; trads. Bioquímica.1995. Omega, Barcelona; 369-630.
31. Mayes, PA. Bioenergética y el metabolismo de carbohidratos y lípidos; Estructura y función de las vitaminas hidrosolubles. En: Murray, RK.; Mayes, PA.; Granner, DK. y Rodwell, VW. Bioquímica de Harper. Manual Moderno,.1997. México, D. F; 135-344; 706.
32. Mathews C, van Holde E.K., Aher G.K. Bioquímica. 3th ed. PearsonAddison Wesley, España 2004.
33. Stryer L, Berg, J, Tymoczko L.J. Bioquímica. 5th ed. Reverté, S.A.Barcelona, España 2002.

34. Stryer L. Glucólisis y Fosforilación oxidativa. 4^a ed. Bioquímica. Editorial Reverté, 1995. Barcelona; 483-509, 559-580.
35. Kahn, BB. Glucose transport: Pivotal step in insulin action. Diabetes. 1996. 45:1644-1654.
36. Ganong, WF. Funciones endócrinas del páncreas y regulación del metabolismo de los carbohidratos, Bases generales y celulares de la fisiología médica. En: Fisiología Médica; Manual Moderno, 2000. México, D.F; 3-20, 367-392.
37. Dombrowski L, Roy, D. y Marette, A. Selective impairment in GLUT4 translocation to transverse tubules in skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats. Diabetes. 1998; 47: 5-12.
38. Montgomery R, Conway T, Spector A. Bioquímica, Casos y controles. 5^{ta} ed . Mosby-year book wolfe publishing, 1993. Barcelona; 881pp.
39. Goodman HM. The pancreatic islets. En: Johnson LR. Essential medical physiology. Lippincott-Raven Publishers, 1998. New York; 565-581
40. Granner, DK. Bioquímica de la comunicación extracelular e intracelular. En: Murray, RK.; Mayes, PA.; Granner, DK. y Rodwell, VW. Bioquímica de Harper. Manual Moderno, 1997. México, D. F; 593-704.
41. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. . 2001. Physiol. Res. 50: 536-546.
42. Mendez D, Ramos G. Animal models in diabetes research. Arch Med Res 1994 :25, 367-375.

43. Tyrberg B, Andersson A, Borg L. Species differences in susceptibility of transplanted and cultured pancreatic islets to the beta-celltoxin alloxan. *Gen Comp Endocrinol* 2001. 122, 238-51.
44. Fleitas A, Carballo R, Almeida G, Quintela A, M Alfonso. Modelo experimental de diabetes en conejos. 2000. *Rev Cubana Angiol y Circ Vasc* 1, 10-14.
45. Reid P. Animal models of diabetes mellitus. A review. *Lab. Animal*, pp 40-45, May-June, 1981.
46. Konrad R, Mikolaenko, J, Tolar K, Liu, Kudlow J. The potential mechanism of the action of streptozotocin: inhibition of pancreatic β -cell O-GlcNac-selective Nacetyl- B-D-glucosaminidase. 2001. *Biochem. J.* 356: 31-41.
47. Bolzan A, Bianchi M. Genotoxicity of streptozotocin. 2002. *Mutat. Res.* 512: 121- 134.
48. Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nadkarni, M.V.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherap. Rep.*, 29: 91-98, 1963.
49. Agius C, Gidari A. Effect of streptozotocin on the glutathione s-transferases of mouse liver cytosol. 1985. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 811-819.
50. Axxora.com [Internet]. Perú: Aloxxan .com, 2014. [visitado 26/03]. Disponible en: <http://www.axxora.com/LKT-A4547>.

51. Wilson GL, Letter EH. Streptozotocin Interactions with Pancreatic b cells and the Induction of Insulin-Dependent Diabetes. *Curr Top in Microbio1 and Inmunol* 1990; 156: 27-54.
52. Al-Obaidy S, McKiernan P, Li Wan P, Glasgow J, Collier P. Metabolism of paracetamol in children with chronic liver disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1996;50:69.
53. Prescott L, Roscoe P, Wright N, Brown S. Plasma paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *The Lancet.* 1971;519-522
54. Van Acquire SA, Van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:331-42.
55. Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Krok A. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss* 1998;2:147-63.
56. Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 1998;3:249-55.
57. He, K. Flavonoides. *Phytochemistry.* 1996; 42 (4) 1199-1201.
58. Pan H. Flavonoides. *phytochemistry.* 1996; 42 (4) 1185.
59. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56:317-33.

60. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2003; 22(1).
61. Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Krok A. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss* 1998;2:147-63.
62. Pietta PG. Flavonoids as antioxidant. *J Nat Prod* 2000;63:1035-42.
63. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:91-8.
64. Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 1998;3:249-55.
65. Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* 1997;21:347-56.
66. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2003; 22(1).
67. Frankel E, Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80:1925-41.
68. Mantle D. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 1998;121:385-91.
69. Yu T, Ong C. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid):

- rationale, application and limitation. *Analytical Biochemistry*. 1999;275:217-23.
70. Frankel E, Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80:1925-41.
71. Bompadre S, Leone L, Politi A, Battino M. Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples. *Free Radical Research*. 2004; 38(8):831-838.
72. Mukhopadhyay S, Luthria D, Robbins R. Optimization of extraction process for phenolic acids from cohosh by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86:156-162.
73. Villaño D, Fernández M, Troncoso A, García-Parrilla M. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*. 2005;538:391-98.
74. Scott J, Cort W, Harley H, Parrish D, Saucy G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. *J. Am. Oil Chem*. 1974;51:200-203.
75. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 1995; 28 (1): 25 -30.
76. Bisby R, Cundall R, Tomaszewski K, Coleman M, Gould G. *Proc. Symp. Radiation Chemistry*. 1982;5:1053-106.
77. Bisby R, Ahmed S, Cundall R. Repair of amino acid radicals by a vitamin E analogue. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1984;119:245-51.

78. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11:81-128.
79. Thomas M. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nut* 1995; 35: 21-39.
80. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43: 1209-1214
81. Asociación Latinoamericana de Diabetes. Guías ALAD sobre el Diagnostico Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. [Internet]. 2013. [visitado el 26 de marzo del 2014]. Disponible en: http://issuu.com/aladdiabetes/docs/guias_alad_2013?e=3438350/5608514
82. Organización Panamericana de la Salud. Acerca de diabetes: ¿Qué es diabetes? [Internet]. Washington DC, USA. 2013. [visitado 26/2/2014]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6717&Itemid=39447&lang=es
83. Ministerio de Salud de Chile. Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 1: Descripción de la Diabetes. [Internet]. 2ª ed. Santiago, MINSAL 2013, [visitado 26/2/2014]. Disponible en : <http://web.minsal.cl/portal/url/item/b554e8e580878b63e04001011e017f1e.pdf>

84. Ginogino F, Laviola L, Leonardini A. Pathophysiology of type 2 diabetes: Pathophysiology of type 2: Rationale for different oral antidiabetic treatment strategists. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005; 68:S22-S29.
85. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000; 408: 239-247.
86. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc*. 2000; 100: 621-633.
87. Asenjo S, Muzzo S, Pérez MV, Ugarte F, Willshaw ME. Consenso en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1 del niño y del adolescente. *Rev Chil Pediatr* 2007; 78 (5): 534-541.
88. Eisenbarth GS, Polonsky KS, Buse JB. Type 2 diabetes mellitus. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011:chap 31
89. Olefsky JM, Nolan JJ. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanism. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:980-84
90. Rull J. SAM, Diabetes. Libro 1, Evaluación del Paciente con Diabetes. Clasificación y Diagnóstico de la Diabetes. Editores Inter Sistema, México 2000, pp 9-30.
91. Tong P. Cell membrane dynamics and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1995; 345:357-8.

92. Bergendi L, Benes L, Duraccik M. Chemistry physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65: 1865-1874.
93. Moskovitz J, Yim BM, Chock BP. Free radicals and disease. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 397: 354-359.
94. Rosado-Pérez J, Mendoza-Núñez VM. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 2007; 32(2):58-69.
95. Evans JL, Goldfine IP, Maddus BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1-8.
96. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-67.
97. Yu Y, Lyons TJ. A lethal tread in diabetes, hyperglycemia, dyslipemia, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am J Med Sci* 2005; 330: 227-
98. Mc Cord J. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108: 652-659.
99. Johanse SJ, Harris KA, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovas Diabetol* 2005; 4: 5-16.
100. Villa-Caballero L, Nava-Ocampo A, Ponce-Monter H, Frati- Munari A. El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético? *Gac Med Mex.* 2000; 136: 249-255.

101. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003; 216: 1589-1596.
102. Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit*, 2001;30:36-44
103. Sánchez-Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*, 2004; 29:81-90.
104. Robertson PR, Harmon J, Tran OP, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in B-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, end the glutathione connection. *Diabetes* 2003; 52: 581-587.
105. Baynes WJ, Thorpe RS. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*. 1999; 48:1-9.
106. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc*. 2000; 100: 621-633.
107. Villavicencio-Núñez Marino. Mecanismos moleculares y bioquímicos de la acción de la insulina. La diabetes mellitus y los avances en su tratamiento. Editorial Buenaventura. Perú. 1995.
108. Rodríguez LG. Insulinoterapia. *Rev. Med. Herd*. 2003; 14(3):140-144.
109. DCCT Group. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-term Complications

- in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. N Engl J Med. 1993 [visitado 22/11/2013]. 329:977-86. disponible en :
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199309303291401#t=article>
110. DCCT Group. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. N Engl J Med. 2005. [visitado 21/11]; 353:2643-2653. disponible en:
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa052187>
111. Minsal /OPS. Programa salud cardiovascular: Programa de actividad física en la prevención y control de factores de riesgo cardiovasculares. 2004, [26/1/2014] ; 52:7-9 disponible en:
<http://web.minsal.cl/porta1/ur1/item/75fe622727752266e04001011f0169d2.pdf>
112. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2^{da} ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994. p.1-7
113. García M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. [visitado 29/5/2014]. Disponible en:
www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/56_IUAQGaiciaNava.pdf.
114. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol.1978; 52: 302-10.
115. Vega R, Carrillo C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). Rev 2(2-3)Cubana Plant Med. 1997;; 14-18.

116. Kameswara Rao B, Kessabulu M. Antidiabetic and hypolipemic effect of *Momordica cymbalaria* Hook. Fruit powder in aloxan diabetics rats. *Journals Ethnopharmacology*. 1999; 67:103-109.
117. Devi RS, Narayan S, Vani G, Shyamala Devi CS. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem Biol Interact* 167(1); 2007;71-83.
118. Elsner M, Gurgul-Conwey E, Lenzen S, Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of aloxan and dialuric acid to insulin producing cells. *Journal Biology and Medicine*. 2006; 41: 825-834.
119. Nakamura U, Iwase M, Uchizono Y, Sonoki K, Sasaki N, Imoto H, et al. Rapid intracellular acidification and cell death by H₂O₂ and aloxan in pancreatic β cells. *Journal Biology and Medicine*. 2006; 40: 2047-2055.
120. Prabhakar PK, Doble M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine* 2009;16(12):1119-26.
121. Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkanen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 2010; 11 (4):1365-402.
122. Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic β -cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol* 2010;224(2):423-32.

123. Simsek N, Kaya M, Kara A, Can I, Karadeniz A, Kalkan Y, Effects of melatonin on islet neogenesis and beta cell apoptosis in streptozotocin induced diabetic rats: an immunohistochemical study. *Domestic Anim. Endocrinol.* 2012; 43, 47–57.
124. Garcia L, Garzón M, Wysocka W, Maiztegui B, Alzugaray M, Hector del Zotto H, et al. Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology.* 2004; 504:139-142.
125. Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol Nutr Food Res* 2005;50:52–7.
126. Floyd ZE, Wang ZQ, Kilroy G, Cefalu WT. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol. *Metabolism* 2008; 57:S32–8.
127. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:1007–22.
128. Morimoto A, Ohno Y, Tatsumi Y, Mizuno S, Watanabe S. Effects of healthy dietary pattern and other lifestyle factors on incidence of diabetes in a rural Japanese population. *Asia Pac J Clin Nutr* 2012;21:601–8.
129. Penumetcha M, Santanam N. Nutraceuticals as ligands of PPAR γ . *PPAR Res* 2012; 858-352.

130. Prior RLE, Wilkes SR, Rogers T, Khanal RC, Wu X, Howard LR. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J Agric Food Chem* 2010;58:3970–6.
131. Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, et al. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des* 2009;74:619–24.
132. Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol* 2010;10:11.
133. Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of PPAR gamma. *Cell* 2012;150:620–32.
134. Ghule A, Jadhav S, Bodhankar S. Effect of ethanolic extract of seeds of *Linum usitatissimum* (Linn.) in hyperglycaemia associated ROS production in PBMNCs and pancreatic tissue of alloxan induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012; 405-410.

XII. ANEXOS

ANEXO 01

Clasificación taxonómica de *Geranium ruizii* Hieron."pasuchaca"



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

CONSTANCIA N° 127-USM-2013

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Rosa Madeline CHINCHAY SALAZAR**; de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, ha sido estudiada y clasificada como: ***Geranium ruizii* Hieron.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: GERANIALES

FAMILIA: GERANIACEAE

GENERO: Geranium

ESPECIE: *Geranium ruizii* Hieron

Nombre vulgar: "Pasuchaca".
Determinado por: Mg. María Isabel La Torre.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 28 de mayo de 2013



ANEXO 04

Obtención del extracto etanólico del *Geranium ruizii* Hieron "pasuchaca"



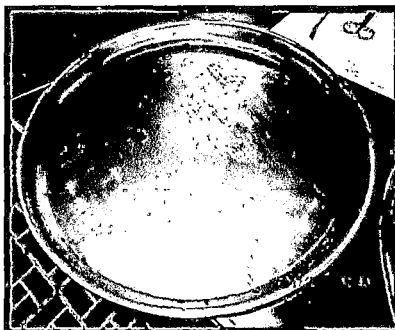
Obtención de la
planta



Maceración



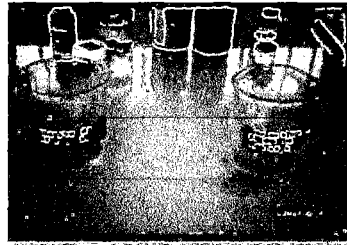
Filtración



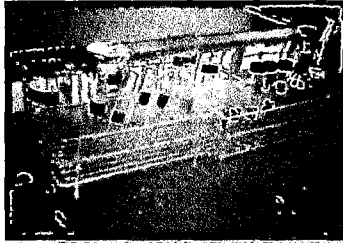
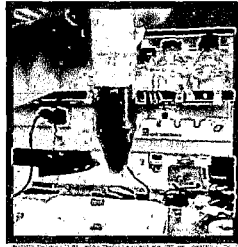
Extracto

ANEXO 05

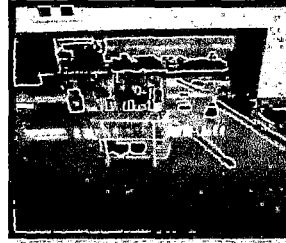
DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS



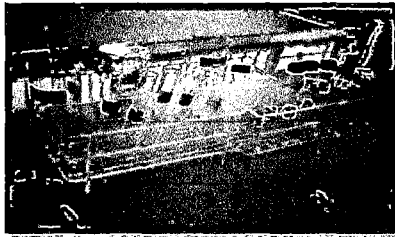
PREPARACIÓN
DEL REACTIVO
DE FOLIN
CIOCALTEU.



PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR
DE POLIFENOLES: ÁCIDO
GÁLICO.



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



PREPARACION DE LA CURVA DE
CALIBRACIÓN



Medición del contenido de
compuestos fenólicos del
extracto etanólico del
Geranium ruizii Hieron
"pasuchaca".

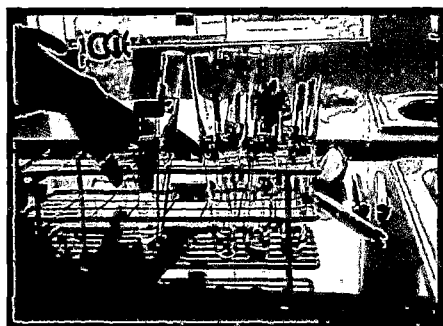
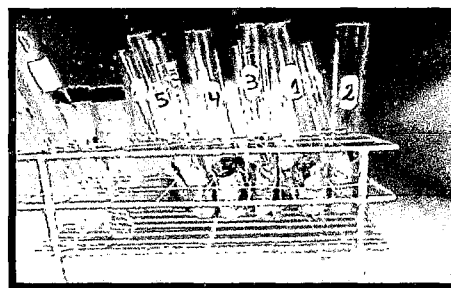
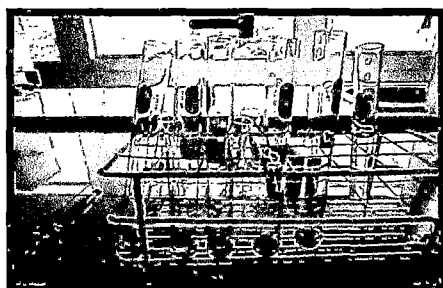
ANEXO 06

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.

PREPARACION DE LOS
REACTIVOS: TROLOX, DPPH,
VITAMINA C



PREPARACION DE LA
MUESTRA



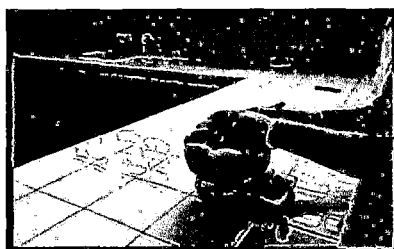
REACCION DE LA MUESTRA,
VITAMINA C Y TROLOX

LECTURA DE LAS
REACCIONES

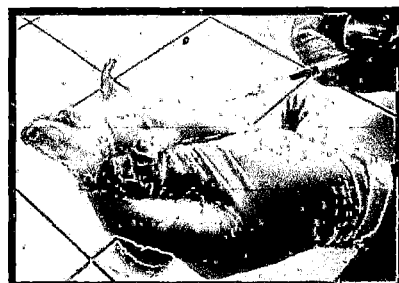


ANEXO 09

ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE



PESO Y MEDIDA DE LA GLUCOSA



ADMINISTRACION DEL ALOXANO



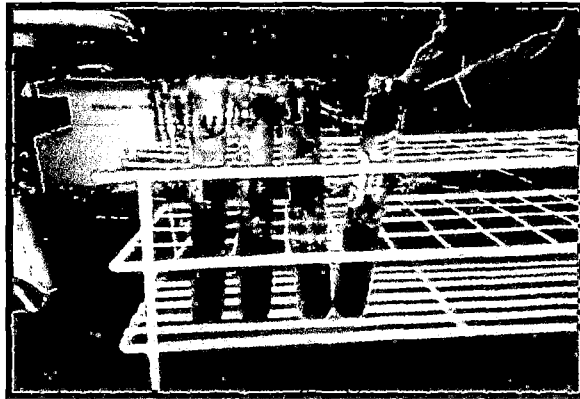
**ADMINISTRACION DEL
TRATAMIENTO
RESPECTIVAMENTE A CADA
GRUPO DE
EXPERIMENTACION.**



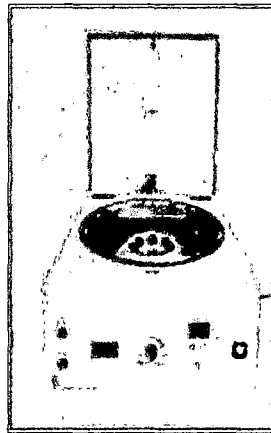
**MEDIDA DE LA GLUCOSA A
CADA GRUPO DE
EXPERIMENTACION DESPUES
DE LA ADMINISTRACION DEL
TRATAMIENTO.**

ANEXO 07

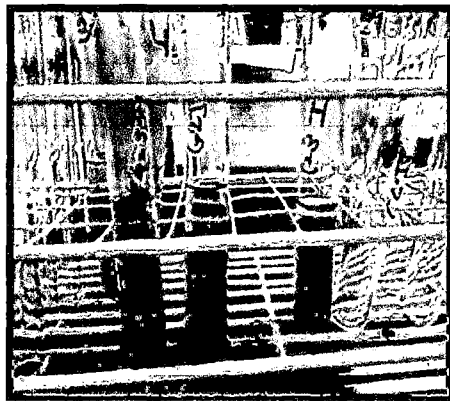
EXTRACÓN DEL SUERO DE LA SANGRE DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION



OBTENCIÓN DE LA SANGRE

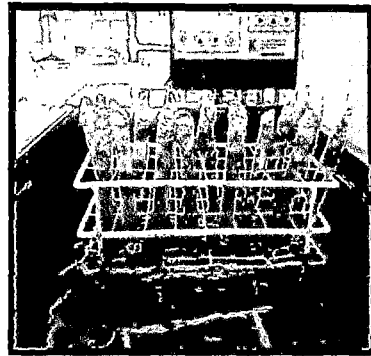


CENTRIFUGAR

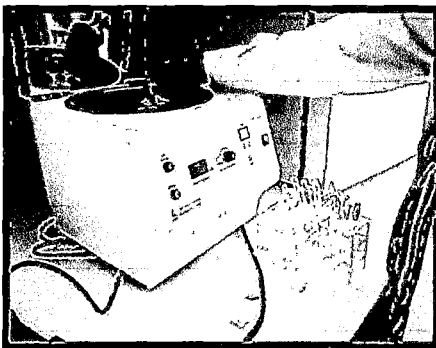


OBTENCIÓN DEL SUERO

ANEXO 08
DETERMINACIÓN DEL MDA



**MESCLA DE LOS REACTIVOS CON EL
SUERO**



CENTRIFUGACIÓN



**LECTURA DE LAS
REACCIONES**