

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL**

**DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE**

**FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antioxidante e hipoglucemiante del  
extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia  
alata* L "mutuy". Ayacucho 2012.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. HUAMÁN PALOMINO, RENÉ FRAXÍMIDEZ**

**AYACUCHO – PERÚ**

**2013**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

**R. D. N° 125-UNSCH-2013-FCB-D**

**Bach. RENÉ FRAXÍMDEZ HUAMÁN PALOMINO**

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día Jueves veintidós de Agosto del dos mil trece en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga reunidos los miembros de sustentación de tesis presidida por el Dr. Segundo Tomas Castro Carranza, en calidad de Decano de la Facultad de Ciencia Biológicas y con la asistencia de los docentes miembros Magister Enrique Javier Aguilar Felices; Magister José Manuel Diez Macavilca; Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo (Miembro - Asesor) y Magister Raúl Antonio Mamani Aycachi como Cuarto Jurado Calificador, actuando como Secretaria Docente, para recepcionar la tesis titulada: Actividad antioxidante e hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy". Ayacucho -2012, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica René Fraxímidez Huamán Palomino, con cuya sustentación pretende obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Luego de la revisión de la documentación en mesa el Decano apertura el acto de sustentación recomendando a la sustentante sobre el tiempo de sustentación (Máximo cuarenta y Cinco minutos), recomienda además que proceda la exposición y explicación evitando limitarse a "solo" la lectura de las diapositivas: enseguida solicita a la Secretaria Docente y miembro del jurado calificador Magister Raúl Antonio Mamani Aycachi para que dé la lectura a la Resolución Decanal N° 125-UNSCH-2013-FCB-D

Luego autoriza a la sustentante de inicio a la exposición del trabajo de investigación, quien lo realiza en el tiempo correspondiente. Culminada la exposición el Decano apertura la segunda etapa en la que los miembros del Jurado Calificador, realizaron las observaciones, preguntas y evaluación correspondiente, iniciando su participación el Magister Raúl Antonio Mamani Aycachi, seguido por el Magister Enrique Javier Aguilar Felices; Magister José Manuel Diez Macavilca y finalmente el Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo en calidad de Asesor.

Acto seguido el Decano solicita al sustentante y público en general abandonar el auditorio momentáneamente para que el Jurado Calificador pueda deliberar y calificar como sigue:

| <b>JURADO CALIFICADOR</b>          | <b>EXPOSICIÓN</b> | <b>RPTA</b> | <b>PREGUNTAS</b> | <b>PROMEDIO</b> |
|------------------------------------|-------------------|-------------|------------------|-----------------|
| Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES | 17                | 17          | 17               | 17              |
| Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA     | 17                | 17          | 17               | 17              |
| Mg. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI    | 17                | 16          | 17               | 17              |
| Dr. Johnny Aldo TINCO JAYO         | 18                | 18          | 18               | 18              |

De la calificación obtenida, el sustentante obtiene la calificación promedio de **DIECISIETE (17)** de lo cual dan Fe los miembros estampando su firma al pie de la presente.

Culminó el acto de sustentación siendo las seis y quince de la tarde.



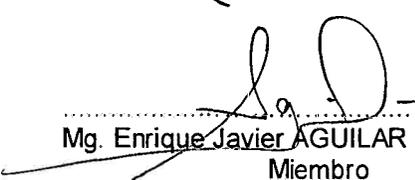
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**



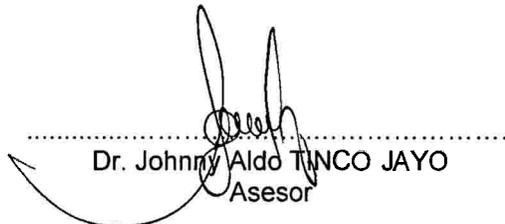
.....  
Dr. Segundo Tomás CASTRO CARRANZA  
Presidente



.....  
Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA  
Miembro



.....  
Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES  
Miembro



.....  
Dr. Johnny Aldo TINCO JAYO  
Asesor



.....  
Mg. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI  
Miembro

**DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres, y hermanos.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por darme la oportunidad para mi formación profesional impartiendo conocimientos y principios éticos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica por acogerme en sus aulas y a los profesores quienes con sus amplios conocimientos me formaron y guiaron en mi formación profesional.

Al Dr. QF. Tinco Jayo, Johnny Aldo docente de la EFP de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH, por su apoyo y asesoramiento incondicional en el presente trabajo.

A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo, sugerencias y consejos durante la ejecución del presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

|   | Página |
|---|--------|
| DEDICATORIA   | ii     |
| AGRADECIMIENTO  | iii    |
| ÍNDICE DE TABLAS                                      | v      |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                     | vi     |
| ÍNDICE DE ANEXOS                                      | vii    |
| RESUMEN   | viii   |
| I. INTRODUCCIÓN                                       | 1      |
| II. MARCO TEÓRICO                                     | 3      |
| 2.1. Antecedentes                                     | 3      |
| 2.2. <i>Cassia alata</i> L "mutuy"                    | 5      |
| 2.3. Radicales libres                                 | 7      |
| 2.3.1. Estrés oxidativo                               | 7      |
| 2.3.2. Antioxidantes                                  | 8      |
| 2.4. Diabetes mellitus                                | 8      |
| 2.5. Tratamiento de la diabetes mellitus              | 9      |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS                             | 11     |
| 3.1. Ubicación del trabajo de investigación           | 11     |
| 3.2. Población y muestra                              | 11     |
| 3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos | 12     |
| 3.4. Determinación de la actividad antioxidante       | 13     |
| 3.5. Determinación de la actividad hipoglucemiante    | 14     |
| 3.6. Diseño experimental                              | 16     |
| 3.7. Análisis estadístico                             | 16     |
| IV. RESULTADOS  | 17     |
| V. DISCUSIÓN  | 22     |
| VI. CONCLUSIONES                                      | 28     |
| VII. RECOMENDACIONES                                  | 29     |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS                      | 30     |
| ANEXOS  | 35     |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Capacidad antioxidante de las hojas de <i>Cassia alata</i> según compuesto                         | 4      |
| Tabla 2. Clasificación de la diabetes   | 8      |
| Tabla 3. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Cassia alata</i> L "mutuy" | 18     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Estructura química de la glibenclamida   | 10     |
| Figura 2. Porcentaje de captación del radical libre DPPH del extracto hidroalcohólico según concentraciones                                      | 19     |
| Figura 3. Variación de los niveles de glucosa sanguínea en ratas Holtzman en función del tiempo  | 20     |
| Figura 4. Porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Cassia alata</i> L "mutuy" | 21     |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  | Página |
|--|--------|
| Anexo 1. Certificado de identificación botánica  | 36     |
| Anexo 2. Certificado sanitario del material biológico  | 37     |
| Anexo 3. Flujograma del diseño metodológico  | 38     |
| Anexo 4. Características de los metabolitos secundarios  | 39     |
| Anexo 5. Flujograma para el método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)  | 40     |
| Anexo 6. Recolección de las hojas de <i>Cassia alata</i> L "mutuy"   | 41     |
| Anexo 7. Maceración, filtrado, percolación y concentración de la muestra en el equipo del rotavapor                                    | 42     |
| Anexo 8. Extracto concentrado de las hojas de <i>Cassia alata</i> L "mutuy"  | 43     |
| Anexo 9. Tubos de prueba con el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico  | 44     |
| Anexo 10. Materiales de vidrio con reactivos para determinar la capacidad secuestradora del radical libre                              | 45     |
| Anexo 11. Equipo UV-Vis Thermo Scientific S10  | 46     |
| Anexo 12. Tableta de glibenclamida 5 mg (Laboratorio IQfarma)  | 47     |
| Anexo 13. Glucómetro ACCU - CHECK® Perfoma Nano  | 48     |
| Anexo 14. Valores descriptivos del porcentaje de captación del radical libre DPPH según muestra  | 49     |
| Anexo 15. Análisis de varianza y las comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de captación del radical libre DPPH según muestra | 50     |
| Anexo 16. Valores descriptivos del porcentaje de disminución de los niveles de glucosa sanguínea en función del tiempo de tratamiento  | 51     |
| Anexo 17. Análisis de varianza del porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos según tiempo                            | 52     |
| Anexo 18. Comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos según tiempo                | 53     |
| Anexo 19. Matriz de consistencia   | 54     |

## RESUMEN

La diabetes es un trastorno metabólico más frecuente que se relaciona con secreción alterada de la hormona endocrina, con generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres; es considerada actualmente un problema de salud pública. El objetivo fue determinar la actividad antioxidante e hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L. "mutuy", durante los meses de noviembre de 2012 a marzo de 2013. El tipo de investigación realizado fue básico experimental, la muestra fue colectada en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga y se obtuvo el extracto hidroalcohólico. La determinación de la actividad antioxidante se desarrolló mediante el método de secuestro del radical libre DPPH.<sup>1</sup> El efecto hipoglucemiante fue determinado mediante el método descrito por Kameswara y modificado por Palomino<sup>2, 3</sup> en ratas Holtzman machos, distribuidos en seis grupos de cinco cada uno; se les administró aloxano a una dosis de 150 mg/kg disuelto en agua destilada por vía intraperitoneal. Al grupo I se administró SSF 1,0 ml/kg (blanco), grupo II (aloxano control), grupo III, IV, V (aloxano + extractos a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg), grupo VI (aloxano + glibenclamida 5 mg/kg estándar). El nivel de glucosa sanguínea se determinó a 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas. Los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico fueron: flavonoides, taninos, polifenoles, triterpenos y/o esteroides, azúcares reductores, alcaloides, quinonas, antocianinas, catequinas y saponinas. Todas las muestras fueron activas al decolorar el DPPH, con una actividad de 95,8 %, 94 % y 53,4 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml, respectivamente. Los resultados fueron comparados con los estándares ácido ascórbico y ácido tánico en las mismas concentraciones y poseen actividad de 99,1 %, 98,4 %, 99 % y 96,2 %, 96,5 %, 94,6 %. A cinco horas del tratamiento el porcentaje de actividad hipoglucemiante a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg del extracto fue de 60,6 %, 72,4 % y 55,6 % respectivamente y 70 % para el estándar existiendo estadísticamente diferencia significativa. Se concluye que el extracto hidroalcohólico posee actividad antioxidante y a dosis de 200 mg/kg posee mejor actividad hipoglucemiante.

Palabras clave: Actividad antioxidante e hipoglucemiante, *Cassia alata* L.

## I. INTRODUCCIÓN

*Cassia alata* L, es utilizado por la gran variedad de compuestos que sintetiza con propiedades terapéuticas en enfermedades de la piel, antibacteriano, diurético, antidiarreica, febrífuga, analgésico, laxante, antiparasitaria, sudorífica, purgante depurativa de la sangre e hipoglucemiante, las hojas son ricas en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos.<sup>4</sup> El estrés oxidativo se origina por desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante celular (CAC), la producción de ROS mitocondrial es constante, entre 2 % y 5 % del oxígeno para la cadena respiratoria se reduce para generar el anión superóxido,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  radicales libres potencialmente dañinos para la célula.<sup>5</sup> La diabetes es una enfermedad metabólica que se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre, secundaria a una alteración absoluta o relativa de la secreción de insulina,<sup>6</sup> y se clasifican en diabetes de tipo 1 y 2.<sup>7</sup> El estrés oxidativo esta íntimamente relacionado con la diabetes mellitus en la cual el óxido nítrico es el principal factor comprometido con las propiedades antiateroscleróticas del endotelio, la diabetes, hipertensión o las dislipemias, aumentan la producción de anión superóxido que inactiva al óxido nítrico.<sup>6</sup> Las elevadas concentraciones de glucosa sanguínea incrementan los niveles de ROS, por diferentes vías, aumentando la formación de los productos de glicosilación avanzada; activando a la proteína quinasa C, disminuyendo el

NADPH,  $H^+$  intracelular, activando la posición de ROS en la mitocondria y participan en la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas por tanto en el desarrollo de la diabetes mellitus.<sup>8,9</sup> La búsqueda de nuevos antioxidantes naturales es el interés para la investigación, por que interrumpe el proceso de oxidación radicalaria de lípidos, proteínas, ADN y enzimas, los compuestos fenólicos son reconocidos antioxidantes.<sup>10</sup> La diabetes mellitus es una enfermedad crónica considerada actualmente como un problema de salud pública.<sup>11</sup> Se calcula que en el mundo hay aproximadamente 314 millones de personas con alteración de la glucosa y se pronostica que esta cifra se incrementará a los 500 millones en el año 2025, como consecuencia del descenso de la actividad física, el aumento de la ingesta calórica y de los índices de obesidad.<sup>12, 13</sup> El presente trabajo de investigación propone los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

Determinar la actividad antioxidante e hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy".

**Objetivos específicos:**

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy", mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar el porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" y comparar con el estándar ácido ascórbico y ácido tánico.
- Evaluar la dosis con mejor actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy", respecto al estándar glibenclamida.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Las propiedades antioxidantes y antiinfecciosas, antibacterianas, analgésica, laxante, antiparasitaria e hipoglucemiante de los extractos de *Cassia alata* L, se documentan bien en la literatura.<sup>4</sup> El porcentaje de inhibición del radical libre, se determinó mediante la curva de calibración para cada estándar (ácido ascórbico, Trolox) y de *Cassia alata* RP, éstas curvas demostraron ser lineales en el rango de la concentración, mostrada en la Tabla 1; *Cassia alata* RP mostró la actividad antioxidante más alta que el ácido ascórbico y el de Trolox, también demostró que repara el ADN en *Saccharomyces cerevisiae* por su actividad antes mencionada. Comparando con la literatura, el presente estudio demuestra que una concentración de 2,25 µg/ml del extracto produce 50 % de inhibición del radical libre DPPH, uno de los flavonoides importante de las hojas de *Cassia alata* RP que se determinó mediante la cresta de HPLC en concentración superior fue el Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside.<sup>14</sup>

Tabla 1. Capacidad antioxidante de las hojas de *Cassia alata* según compuesto.<sup>14</sup>

| Compuesto           | IC <sub>50</sub><br>µg.mL <sup>-1</sup> | AEC<br>(g) | TEAC<br>(g) | Rango<br>lineal<br>µg.mL <sup>-1</sup> | M      | Intercept | R <sup>2</sup> |
|---------------------|---|------------|-------------|--|--------|-----------|----------------|
| Á. ascórbico        | 3.99 ± 0.09                             | 1.00       | 0.89        | 2.0–4.7                                | -12.13 | 98.4      | 0.998          |
| Trolox              | 4.50 ± 0.08                             | 1.13       | 1.00        | 2.7–5.3                                | -12.27 | 105.2     | 0.997          |
| <i>Cassia alata</i> | 2.25 ± 0.28                             | 0.56       | 0.50        | 2.0–4.7                                | -14.73 | 83.46     | 0.999          |

En la extracción y determinación cuantitativa por HPLC de antraquinonas en hojas de *Senna alata*, determinaron cuatro antraquinonas: rhein, aloe-emodina, emodina, y crisofanol. El método implica el uso de una columna TSK-GEL ODS-80TM a 25 °C con la mezcla de metanol y de ácido acético acuoso 2 % (70:30, v/v) como fase móvil y la detección a 254 nm, se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y especificidad del método. La recuperación del método es 100,3 – 100,5 %, con una linealidad de ( $r^2 > 0,9998$ ) se obtuvo para todas las antraquinonas. También se han logrado un alto grado de especificidad, así como la repetibilidad y la reproducibilidad (desviación típica relativa de los valores inferiores a 5 %).<sup>15</sup>

Utilizando el radical libre DPPH evaluaron la actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas, flores y vainas de *Cassia alata*, encontrándose; que el extracto de las hojas exhibió actividad antioxidante más fuerte que los extractos de las flores y vainas; mediante cromatografía se identificó un flavonoide específico el kaempferol, éste compuesto mostró tener actividad antioxidante.<sup>16</sup>

En la revisión de antraquinonas aisladas de las especies de *Cassia* y sus aplicaciones, encontraron diferentes compuestos antraquinónicos como constituyente principal, el extracto acuoso de las hojas mostró reducir los niveles de glucemia en los animales, inducidos por estreptozotocina y se encontró que tiene efecto para producir la caída de los niveles de azúcar en la sangre en

perros y ratas, que puede relacionarse con antraquinonas, en las hojas de estas plantas es reportado también antraquinona, agliconas y glicosidos libres las cuales tienen efecto laxante.<sup>17</sup>

Se realizó un estudio fitoquímico a la droga cruda del extracto fluido de *Cassia alata*, los resultados obtenidos permitieron comprobar la alta variabilidad de compuestos químicos presentes, como los alcaloides, compuestos reductores, taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas, se comprobó tanto en la droga cruda como en el extracto fluido la presencia de quinonas, las que poseen efecto antimicótico demostrado.<sup>18</sup> No habiendo más antecedentes se complementó con *Cassia fistula* en la cual determinaron los diferentes compuestos químicos como emodin, aloemodin, ácido crisofánico, rhein, antraquinonas, sennósidos, glicósidos, kaempferol es utilizado en diversas enfermedades como la diabetes y la constipación.<sup>19</sup> El extracto acuoso de flores de *Cassia auriculata* se administró por vía oral a diferentes dosis en las ratas diabéticas inducida por estreptozotocina, se utilizó glibenclamida como estándar de referencia. Dicho extracto administrado durante 30 días, suprimió la glucosa en sangre y los niveles de lípidos en ratas diabéticas. *Cassia auriculata* a 0,45 g/kg resultó ser comparable a la glibenclamida. Los resultados indican que las flores de *Cassia auriculata* poseen efecto antihiperlipidémico e hipoglucemiante.<sup>20</sup>

## **2.2. *Cassia alata* L “mutuy”**

*Cassia alata* L, es originario de América tropical, perteneciente a la familia Caesalpiniaceae, crece en Cuba, África occidental, India y Brasil. Las flores y hojas de *Cassia alata* L “mutuy” son usadas para el tratamiento de afecciones dérmicas, además, se considera un poderoso antiherpético. Estudios culminados recientemente en los laboratorios han corroborado su acción antimicrobiana.<sup>17, 21</sup>

### 2.2.1. Clasificación taxonómica

|           |   |                       |
|-----------|---|-----------------------|
| DIVISIÓN  | : | MAGNOLIOPHYTA         |
| CLASE     | : | MAGNOLIOPSIDA         |
| SUB CLASE | : | ROSIDAE               |
| ORDEN     | : | FABALES               |
| FAMILIA   | : | CAESALPINIACEAE       |
| GÉNERO    | : | CASSIA                |
| ESPECIE   | : | <i>Cassia alata</i> L |
| N. V.     | : | "mutuy"               |

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo 1).

#### Sinonimia botánica:

*Senna alata*.<sup>22</sup>

### 2.2.2. Descripción botánica

*Cassia alata* L, es un arbusto, presenta hojas compuestas paripinnadas, folíolos de 6 a 14 pares emarginados, la inflorescencia es en racimos terminales con numerosas flores de color amarillo, presenta sépalos ligeramente distintos entre sí con cinco pétalos casi iguales en forma de uña, el fruto es vaina plana linear y la semillas es de color café oscuro.<sup>23</sup>

### 2.2.3. Composición química

Presenta una gran variedad de clases químicas, entre ellas los alcaloides, taninos, saponinas, terpenoides, flavonoides, glicosidos cardíacos,<sup>24</sup> cumarinas, sustancias fenólicas y polifenoles,<sup>25</sup> antraquinonas (rhein, aloe-emodina, emodina, crisofanol y physcion), kaempferol,<sup>26</sup> mucilagos, alantoina, ribarina, ácido crisofánico, azúcares reductores.<sup>21</sup>

#### **2.2.4. Propiedades medicinales**

Se emplean en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel, es además antimicrobiana,<sup>27,28</sup> fungicida,<sup>29</sup> diurética, anticatarral, febrífuga, antidiarreica, analgésica, antiparasitaria, laxante, depurativa de la sangre e hipoglucemiante.<sup>4</sup>

#### **2.3. Radicales libres**

Son especies químicas (átomos, iones y moléculas) con un electrón desapareado en su orbital más externo lo que le da una configuración espacial inestable, por lo tanto una gran capacidad para reaccionar con otras sustancias.<sup>30</sup> En ese estado, el radical es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos) en especial con moléculas claves de las membranas y con ácidos nucleicos, además; los radicales libres inician reacciones autocatalíticas, estas especies se producen de manera fisiológica como parte de las reacciones orgánicas de óxido-reducción.<sup>31</sup>

##### **2.3.1. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante de las células. En el paso a la vida oxigenada las células se dotaron de sistemas antioxidantes que pueden ser enzimáticos y por lo tanto involucran mecanismos complejos, y no enzimáticos en los que participan biomoléculas que generalmente poseen menor peso molecular que las enzimas. Los ROS, se producen constantemente en la mitocondria, entre 2 a 5% del oxígeno que entra en la cadena respiratoria se reduce de forma univalente para dar radical superóxido. Las sustancias que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante se inactivan o deterioran en determinadas situaciones, este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria que

provoca incrementos sustanciales en la producción de oxidantes y prooxidantes.<sup>32</sup>

### 2.3.2. Antioxidantes

Aproximadamente el 5 % o más del oxígeno inhalado ( $O_2$ ) se convierten en especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$ , por reducción univalente del oxígeno molecular ( $O_2$ ), los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de prevenir o retardar la oxidación de sustratos biológicos generalmente, lípidos y ácidos nucleicos, el antioxidante al reaccionar con un radical libre le cede un electrón oxidándose y se transforma en un radical débil, con escasos o nulos efectos tóxicos.<sup>33</sup>

### 2.4. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica definida por la presencia de la hiperglucemia. La hiperglucemia en todos los casos se debe a una deficiencia funcional de la acción de la insulina, lo cual puede deberse a una disminución de su secreción por las células beta del páncreas.<sup>34</sup>

Tabla 2. Clasificación de la diabetes

| Tipos de diabetes        | Concepto  |
|--------------------------|---|
| Diabetes mellitus tipo 1 | Se caracteriza por la deficiencia de insulina y una tendencia a sufrir cetosis, por la destrucción de las células $\beta$ pancreáticas. Es autoinmune e idiopática.   |
| Diabetes mellitus tipo 2 | Es un grupo heterogéneo de trastornos que se caracteriza por grados variables de resistencia a la insulina, alteraciones en la secreción de insulina y una producción excesiva de glucosa hepática.   |
| Otros tipos específicos  | Comprenden la diabetes mellitus causada por defectos genéticos (diabetes del adulto de inicio juvenil), enfermedades del páncreas exocrino (pancreatitis crónica, fibrosis quística y hemocromatosis), endocrinopatías (acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma e hipertiroidismo), fármacos (ácido nicotínico, glucocorticoides, tiazidas e inhibidores de la proteasa), y embarazo (diabetes mellitus gestacional). <sup>35</sup> |

## **2.5. Tratamiento de la diabetes mellitus**

El tratamiento de la diabetes es complejo, que incluye medidas terapéuticas, no farmacológico y farmacológico.<sup>36</sup>

### **2.5.1. Tratamiento no farmacológico, control dietético**

Reducir la ingestión total de grasas, aumento de la ingestión de proteínas, y un aumento de la ingestión de los alimentos ricos en fibra, que enlentecen la velocidad de absorción en el tubo digestivo. Evitar el consumo de azúcares simples.<sup>37</sup>

### **2.5.2. Tratamiento no farmacológico, ejercicio físico**

Constituye una medida no farmacológica fundamental. El esfuerzo físico controla e incrementa la utilización de glucosa por el músculo, mejora la sensibilidad tisular a la insulina.<sup>36</sup>

## **2.6. Tratamiento farmacológico**

### **2.6.1. Hipoglucemiantes orales**

Los antidiabéticos orales también conocidos como "hipoglucemiantes orales" son un conjunto heterogéneo de fármacos que, administrados por vía oral, producen una disminución de los niveles de glucemia a través de mecanismos pancreáticos y/o extrapancreáticos, lo cual las hace útil en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 como, secretagogos o insulínotropicos (estimulan la secreción de insulina) como las sulfonilureas, meglitinidas, los insulinosensibilizadores (disminuyen la resistencia insulínica), las biguanidas, tiazolidinedionas (glitazonas) y reductores o enlentecedores de la absorción intestinal de glucosa como los inhibidores de la alfa-glucosidasas.<sup>38</sup>

### **2.6.2. Sulfonilureas**

Son derivados de las sulfamidas, en los cuales la estructura sulfonilurea constituye el grupo esencial de la actividad hipoglucemiante. Diversas sustituciones en el anillo bencénico y en el grupo urea han originado compuestos

cuya potencia y propiedades farmacocinéticas difieren notablemente. Es preciso distinguir entre la acción a corto y a largo plazo. A corto plazo, las sulfonilureas provocan la liberación de insulina preformada en las células  $\beta$  del páncreas porque aumentan su sensibilidad a la glucosa. Para ello, las sulfonilureas actúan con gran afinidad sobre receptores asociados a los canales de  $K^+$  sensibles a ATP (KATP), fijándose de manera específica a la proteína SUR1 adjunta a dicho canal. A estos receptores puede unirse también la meglitinida, fracción no sulfonilureica de la glibenclamida, que estimula igualmente la liberación de insulina. Como consecuencia de esta acción, el canal se cierra y la despolarización causada facilita la secreción de insulina. Para ello es preciso que las células  $\beta$  sean funcionantes.<sup>39</sup>

### 2.6.3. Glibenclamida

La glibenclamida es una sulfonilúrea, que disminuye la glucosa sanguínea en la diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), por estimulación directa de la liberación de insulina a partir de las células funcionales beta del tejido pancreático.<sup>40</sup>

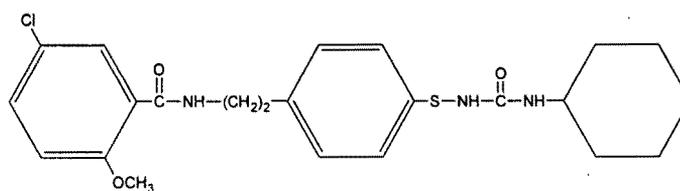


Figura 1. Estructura química de la glibenclamida<sup>39</sup>

### 2.6.4. Otros

Biguadinas: Metformina, inhibidores de las alfa-glucosidasas como la acarbosa y el miglitol, meglitinidas como la repaglinida y nateglinida y las tiazolidindionas como las rosiglitazona y pioglitazona, fibras como la goma guar.<sup>41</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del trabajo de investigación**

El presente trabajo de Investigación se realizó en los laboratorios de Farmacología, Farmacognosia, Toxicología y en Laboratorio del Centro de Producción del área académica de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de noviembre de 2012 a marzo de 2013.

#### **3.2. Población y muestra**

##### **3.2.1. Población**

*Cassia alata* L “mutuy” que crece en el distrito de Ayacucho provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho ubicado a 2100 m.s.n.m.

##### **3.2.2. Muestra**

La muestra que se utilizó fue un kg de hojas secas de *Cassia alata* L “mutuy” recolectadas en el distrito de Ayacucho provincia de Huamanga, el sistema de muestreo fue por conveniencia y una parte de la planta recolectada se llevó al *Herbarium Huamangensis* para su identificación y su clasificación botánica.

##### **3.2.3. Unidad experimental**

Constituido por 30 ratas albinas machos de cepa Holtzman edad adulta y pesos entre 200 a 250 g procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Lima, los mismos que fueron

acondicionados con alimentación balanceada y agua a libertad en el bioterio del Laboratorio de Farmacología del área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

### **3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos**

#### **3.3.1. Procedimiento para la recolección, selección y secado de la muestra**

La recolección, selección y secado de la muestra se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Villar del Fresno.<sup>42</sup> La planta se recolectó manualmente, en las horas de la mañana en un clima templado en su estadio de floración, durante el mes de noviembre del 2012. Se seleccionaron las hojas de la planta intacta y se secaron a la sombra en una habitación ventilada sobre papel periódico, aproximadamente por diez días, para su posterior reducción de tamaño de partículas haciendo uso de un molino, hasta obtener un polvo fino (Anexo 3).

#### **3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico**

Se sometió a maceración un kilogramo de polvo fino de muestra, en frascos de color ámbar durante una semana aproximadamente en tres litros de alcohol de 70° el mismo que la cubrió por completo. Durante el macerado el frasco se agitó periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Una vez obtenido el extracto se procedió a la filtración y percolación, a continuación se concentró en el equipo del rota vapor a una temperatura de 40 °C y se secó en una estufa a una temperatura de 40 °C, bajo especificaciones y procedimientos que exige dicha marca. Una vez obtenido el extracto concentrado, se envasó en un frasco de vidrio color ámbar, herméticamente cerrado, y se conservó en la refrigeradora hasta su empleo.

#### **3.3.3. Tamizaje fitoquímico**

Las reacciones se realizó mediante coloración de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico<sup>43</sup> (Anexos 4 y 9).

### **3.4. Determinación de la actividad antioxidante mediante secuestro del radical libre (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), DPPH.<sup>1</sup>**

**Fundamento:** Consiste en determinar la pérdida de la coloración violeta intensa de DPPH, cuando éste es capturado por un antioxidante reduciéndose a DPPH-H dando una coloración amarilla (Anexos 5, 10 y 11).

#### **Procedimiento:**

1. Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l
  2. Se preparó una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A)
  3. Se calibró el espectrofotómetro a cero con una solución blanco de metanol: agua (2:1)
  4. Se preparó un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) y 1,5 ml de metanol
  5. Se preparó un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH y 0.75 ml de agua destilada
  6. Luego se procedió a preparar la muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml. Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura de las absorbancias a 517 nm en el espectrofotómetro
  7. Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra
  8. Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una concentración final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C)
  9. Con las soluciones B y C se procedió igual a los puntos 6 y 7
- Para la comparación, el estándar ácido ascórbico y el ácido tánico se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml. Los extractos fueron evaluados por triplicado a

diferentes concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml. Utilizando como estándar ácido ascórbico y ácido tánico.

Posteriormente con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de captación de radicales libres DPPH, mediante la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{(A_m - A_b)}{A_c} \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia del DPPH

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco de la muestra

%AA: Porcentaje de captación del radical libre

### **3.5. Determinación de la actividad hipoglucemiante**

#### **3.5.1. Preparación del aloxano**

Se preparó una solución al tres por ciento de aloxano (Sigma-Aldrich), disuelto en 50 ml de agua destilada, de esta solución madre se tomaron, para su administración, dosis correspondientes de 150 mg/kg de peso.

#### **3.5.2. Preparación del estándar**

Se preparó una solución de glibenclamida 5 mg (Laboratorio IQfarma - Anexo 12) disuelto en 10 ml de agua destilada, para su administración se tomó dosis correspondientes a 5 mg/kg de peso.

#### **3.5.3. Preparación de la muestra**

Se preparó una solución acuosa al tres por ciento del extracto hidroalcohólico concentrado, de esta solución madre se tomaron, para su administración, dosis correspondientes a 100, 200 y 400 mg/kg.

#### 3.5.4. Método de inducción de diabetes con aloxano.<sup>2' 3</sup>

**Fundamento:** El aloxano es una sustancia química que inyectado en los animales genera diabetes mellitus por destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas endocrino debido a la producción de radicales libres.

**Procedimiento:**

- Los animales fueron aclimatados en jaulas especiales con acceso a agua, alimento estándar y a temperatura ambiente ( $21 \pm 1$  °C) y 50 – 60 % de humedad con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad
- Luego de pesar a los animales se les administró por vía intraperitoneal solución de aloxano a 150 mg/kg
- Debido a que el aloxano es capaz de producir hipoglucemia letal, como resultado de la liberación de insulina pancreática masiva, las ratas fueron tratadas con solución de glucosa al 20 %, 10 ml en sus respectivos bebederos después de seis horas de la administración del aloxano monohidratado
- Luego de 24 horas se realizó la confirmación de la hiperglucemia. Los animales que presentaron glucemia superior a 200 mg/dl fueron incluidos en el estudio
- Los niveles de glucosa en sangre se determinó usando glucómetro ACCU - CHECK® Performa Nano
- 12 horas antes de la administración de los tratamientos, los animales fueron sometidos en ayuno con agua *ad libitum*
- Las ratas son distribuidas aleatoriamente en seis grupos de cinco cada uno
- Se realizaron las mediciones de glicemia a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas posteriores a la administración de los tratamientos.

Finalmente las muestras de sangre de los animales fueron colectadas de la vena caudal de la cola, la glucosa se determinó por el método de la glucosa oxidasa

con tiras reactivas del glucómetro, los valores de la glucemia se medió en mg/dl y el porcentaje de la actividad hipoglucemiante fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad hipoglucemiante} = \frac{\text{Control} - \text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100$$

### 3.6. Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó es completamente randomizado. Las concentraciones elaboradas fueron sometidas a la actividad hipoglucemiante, los animales de experimentación fueron divididas de manera aleatoria en seis grupos cada uno cinco repeticiones para cada grupo:

|         |           |   |
|---------|-----------|---|
| Grupo 1 | Blanco    | SSF 1,0 ml/kg                                     |
| Grupo 2 | Control   | Aloxano 150 mg/kg                                 |
| Grupo 3 | 100 mg/kg | Aloxano 150 mg/kg + extracto a dosis de 100 mg/kg |
| Grupo 4 | 200 mg/kg | Aloxano 150 mg/kg + extracto a dosis de 200 mg/kg |
| Grupo 5 | 400 mg/kg | Aloxano 150 mg/kg + extracto a dosis de 400 mg/kg |
| Grupo 6 | Estándar  | Aloxano 150 mg/kg + glibenclamida dosis a 5 mg/kg |

### 3.7. Análisis estadístico

Los resultados se expresan en gráficos. Se halló las medias  $\pm$  desviación estándar en cada uno de los ensayos de actividad antioxidante e hipoglucemiante. Para la actividad antioxidante se determinó el ANOVA para ver las diferencias entre el ácido ascórbico, ácido tánico y el extracto, así mismo, entre las tres concentraciones ensayadas de cada uno de ellos, para la actividad hipoglucemiante se determinó el ANOVA para ver las diferencias entre el estándar glibenclamida y las dosis del extracto hidroalcohólico con un nivel de significación estadística de 0,05. Las comparaciones se hacen entre cada tratamiento a través de la Prueba de Tukey el análisis estadístico se realizó utilizando el soporte informático SPSS, versión 21.

#### **IV. RESULTADOS**

Tabla 3. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico

| Metabolitos secundario        | Reactivos y/o reacciones | Resultados |
|-------------------------------|--------------------------|------------|
| Fenoles y/o taninos           | Tricloruro férrico       | ++         |
| Flavonoides                   | Shinoda                  | +++        |
| Triterpenoides y/o esteroides | Liebermann               | +++        |
| Azúcares reductores           | Fehling                  | ++         |
|                               | Dragendorff              | ++         |
| Alcaloides                    | Wagner                   | ++         |
|                               | Mayer                    | ++         |
| Quinonas                      | Borntrager               | ++         |
| Catequinas                    | Catequinas               | +          |
| Antocianinas                  | Antocianidina            | +          |
| Saponinas                     | Espumas                  | +          |

LEYENDA:  
 Escasa:(+)  
 Regular : (++)  
 Abundante: (+++)

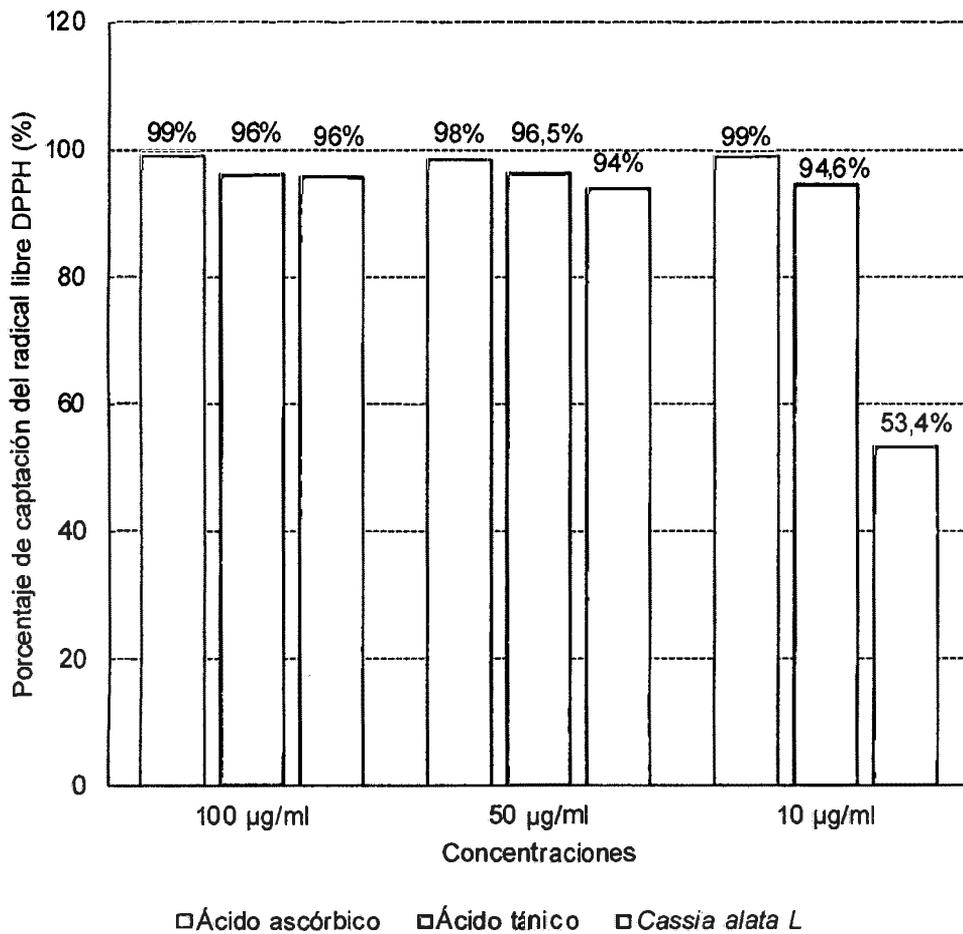


Figura 2. Porcentaje de captación del radical libre DPPH del extracto hidroalcohólico según concentraciones

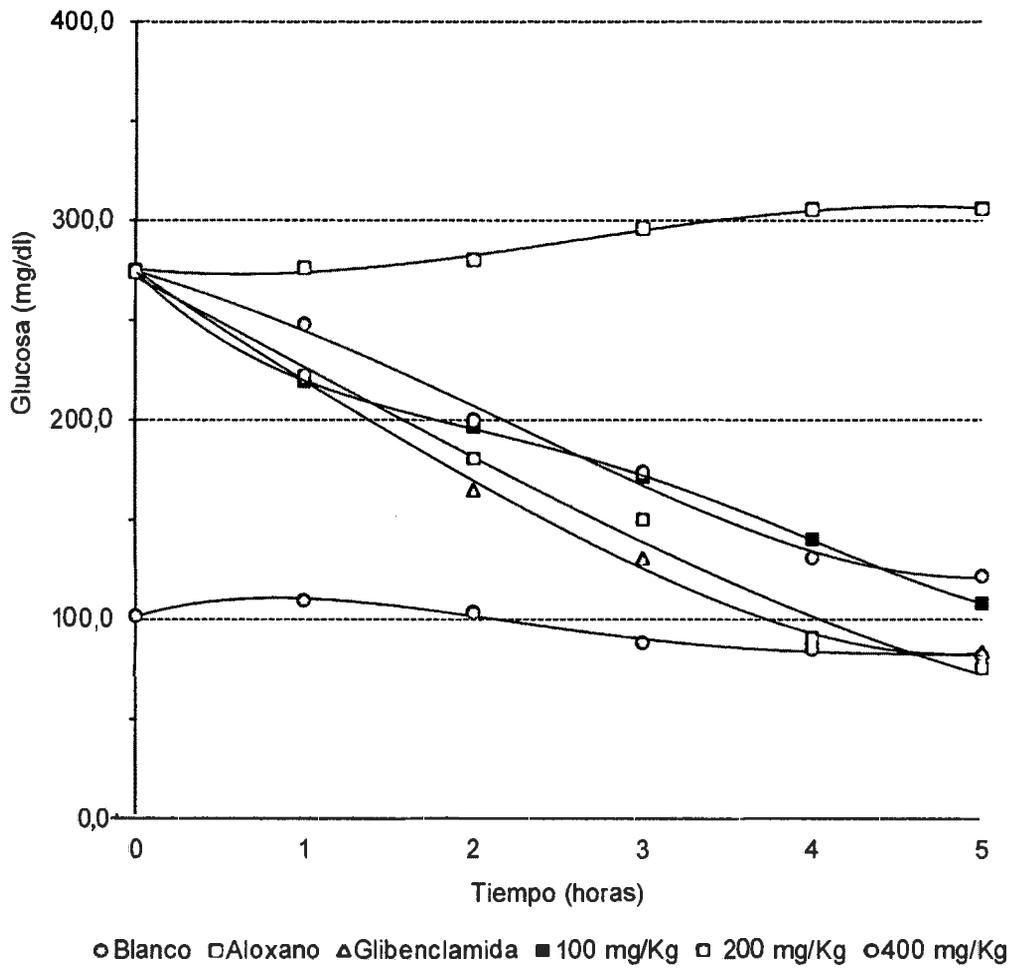


Figura 3. Variación de los niveles de glucosa sanguínea en ratas Holtzman en función del tiempo

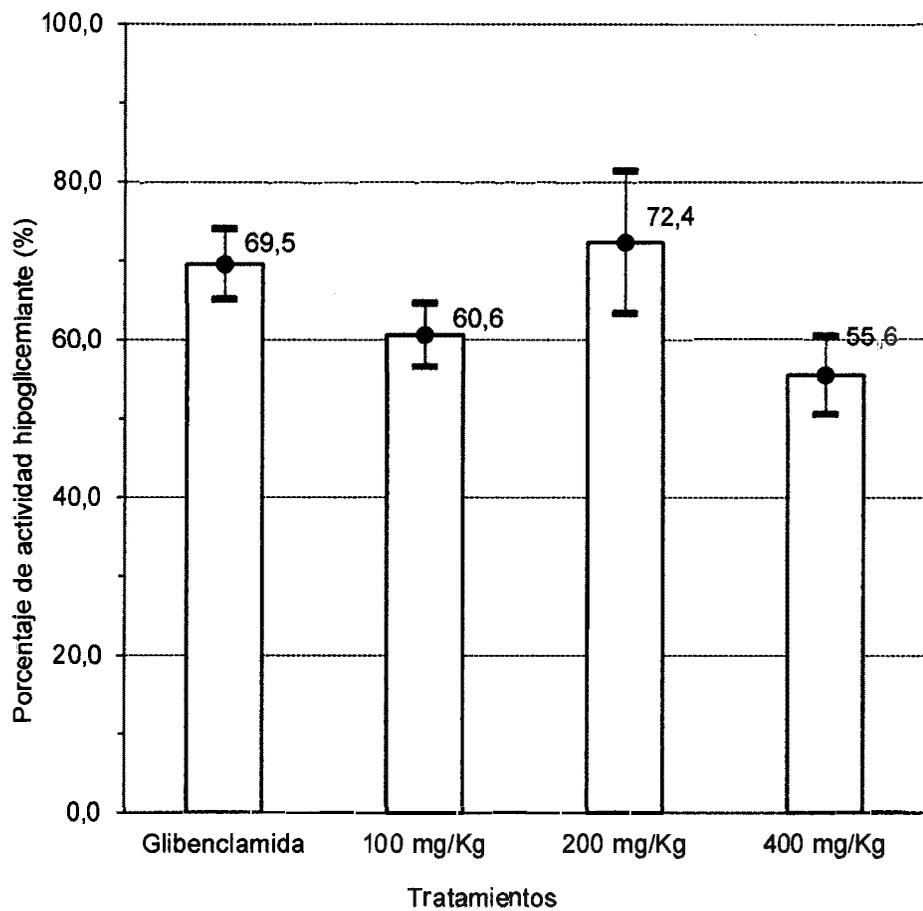


Figura 4. Porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy"

## V. DISCUSIÓN

*Cassia alata* L “mutuy” es una planta medicinal que constituye una fuente natural importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas de interés por la gran variedad de compuestos que sintetiza, desde hace mucho tiempo los extractos naturales son utilizados con propiedades terapéuticas de gran importancia para el control de muchas enfermedades en humanos.<sup>22</sup>

La Tabla 3, muestra los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L “mutuy” como: taninos, polifenoles, triterpenos, esteroides, flavonoides, azúcares reductores, alcaloides, quinonas, catequinas, antocianinas y saponinas; los resultados fueron corroborados con el tamizaje fitoquímico realizado por Barrese,<sup>18</sup> donde reporta la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas quinonas y triterpenos en el extracto acuoso de las hojas de *Cassia alata*. Fernand,<sup>23</sup> reportó en el extracto hidroalcohólico la presencia de alcaloides, triterpenos y/o esteroides, quinonas, taninos, azúcares reductores, saponinas en *Cassia alata* L “mutuy”.

Lo que más destaca del tamizaje fitoquímico es la presencia de flavonoides produciendo coloración rojo vino en la fase amílica y triterpenos y/o esteroides, dando coloración verde intensa, se comprobó la alta diversidad de compuestos químicos presentes en la especie bajo estudio, lo que fundamenta su empleo en

la cura de diversas afecciones, los resultados obtenidos fueron similares a otros reportes científicos y la literatura revisada.<sup>44</sup>

La Figura 2, muestra los resultados del porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico, todas las muestras fueron activas al decolorar el DPPH, con un porcentaje de captación del radical libre en 95,8 %, 94 % y 53,4 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml respectivamente. Los resultados fueron comparados con los estándares ácido ascórbico, que mostró tener actividad en un 99,1 %, 98,4 % y 99 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml; de igual manera el ácido tánico posee actividad secuestradora del radical libre DPPH con un porcentaje de 96,2 %, 96,5 % y 94,6 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml, encontrándose resultados similares a otros reportes científicos.<sup>14,18</sup> Es importante recalcar que la actividad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto y del microambiente en el que se encuentra el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios, los flavonoides se encuentran en los vegetales y se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes con capacidad para neutralizar los radicales libres responsables de determinadas patologías o del agravamiento de las mismas, cuando los flavonoides tienen orto sustituciones en anillo A o B, son aquellas estructuras que tienen una buena acción inhibitoria de la formación del radical hidroxilo,<sup>45, 46</sup> entonces la actividad antioxidante depende de la estructura química, posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide.<sup>47</sup> Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos para ( $p \leq 0.05$ ); como se observa en el Anexo15.

La Figura 3, muestra la variación de los niveles de glucosa sanguínea en función del tiempo como resultado del proceso metabólico normal de las unidades de experimentación, luego de haber producido una hiperglucemia. Así mismo, se muestra que las unidades de experimentación llegan a su estado basal de

glucosa en lapso de cinco horas. Este dato es muy importante porque nos permite comparar el efecto hipoglucemiante del extracto y el estándar, por presentar semejanzas clínicas e histopatológicas con la diabetes mellitus humana, el modelo experimental de diabetes inducida en ratas con aloxano han sido ampliamente utilizadas por investigadores en todo el mundo,<sup>48</sup> en el presente estudio se optó por el método químico de supresión endocrina del páncreas, los cuales exhiben todos los eventos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción del estado diabetogénico,<sup>49</sup> el aloxano inyectado en animales de experimentación, genera diabetes mellitus por destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas endocrino debido a la producción de radicales libres, designados en su mayoría especies de oxígeno reactivo (ROS), a la vez afecta la actividad de la glucoquinasa reduciendo la concentración del transportador de la glucosa (GLUT2) y del ARNm de la glucoquinasa 2 con acción a nivel nuclear DNA y/o mitocondrial.<sup>50</sup> Estudios demuestran amplia variación en la dosis y vía de administración del aloxano en la inducción de diabetes mellitus experimental, que por vía intravenosa se han empleado dosis de 40 mg/kg,<sup>51</sup> 100 mg/kg,<sup>52</sup> 50 mg/kg,<sup>53</sup> 42 mg/kg en solución acuosa al 2 %, <sup>49</sup> por vía subcutánea 175 mg/kg,<sup>54</sup> por vía intraperitoneal dosis de 200 mg/kg por medio de ayuno puede reducirse hasta 150 mg/kg que es la dosis diabetógena por vía intraperitoneal,<sup>55</sup> 100 mg/kg en buffer citrato pH 4,75.<sup>56</sup> Cualquiera que sea la vía de administración, las dosis diabetógenas siempre alteran en igual forma la glucosa sanguínea, inicialmente hay hiperglucemia, después hipoglucemia y finalmente aparecen la hiperglucemia diabética tercera y última fase consecutiva a la administración del aloxano y secundaria a la destrucción de los islotes de Langerhans que se debe a la exagerada gluconeogénesis, en el presente estudio se utilizó dosis de 150 mg/kg de aloxano diluidas en agua destilada estéril por vía intraperitoneal 24

horas antes, los animales estuvieron en ayunas 12 horas. El aloxano agente diabético con toxicidad selectiva sobre las células  $\beta$  pancreáticas, generan peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo que se acumula produciendo luego fragmentación del DNA; daño que no alcanza a ser reparado por las células  $\beta$ , llevando así a su destrucción.<sup>56</sup>

Así mismo, los animales diabéticos además de presentar hiperglucemia se caracterizaron por olor fuerte en la orina, aumento en el volumen de orina, caída de pelos, pérdida de peso y debilidad general, otros autores también lo mencionan el mismo fenómeno.<sup>49</sup> El síndrome clínico de la diabetes mellitus es caracterizada por disturbios continuos del metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y varias alteraciones tisulares, provocadas por deficiencia de la insulina, siendo caracterizada por hiperglucemia, glicosuria, y presenta cuadro clínico de poliúrea, polidipsia y polifagia,<sup>57</sup> en el ensayo experimental de diabetes mellitus tipo 1 se muestra evidencias que existe actividad hipoglucemiante por la administración del extracto, las elevadas concentraciones de glucosa sanguínea pueden aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), por diferentes vías. Aumentando la formación de los productos de glicosilación avanzada (PGA); activando a la proteína quinasa C (PQC); disminuyendo el NADPH,  $H^+$  intracelular; activando la posición de ROS en la mitocondria,<sup>8</sup> la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico fue con descenso gradual de la glucosa plasmática conforme avanzan las horas, estos resultados son compatibles con otros estudios científicos,<sup>58</sup> el estrés oxidativo y el desequilibrio entre formación de radicales libres derivados del oxígeno o del nitrógeno y su degradación, juega un papel relevante en el desarrollo de la insulinorresistencia. El incremento en radicales libres en estado prediabético se debe a la abundancia de ácidos grasos que causan alteraciones mitocondriales a través de una mayor beta oxidación.<sup>59</sup>

La Figura 4 muestra los resultados del porcentaje de actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico que fue similar al estándar, el mecanismo de acción por el cual ciertas especies vegetales disminuyen la glucosa sanguínea puede ser atribuido a los siguientes factores: aumento de la liberación de insulina a través de la estimulación de las células  $\beta$ -pancreáticas, resistencia a las hormonas que aumentan el nivel de glucosa, aumento de la sensibilidad de los receptores de insulina, disminución de gluconeogénesis, aumento del consumo de glucosa en tejidos y órganos, eliminación de radicales libres, resistencia a la peroxidación lipídica y la corrección del desorden metabólico en lípidos y proteínas,<sup>25</sup> el extracto hidroalcohólico presenta actividad hipoglucemiante, estadísticamente es significativa como se muestra en los Anexos 17 y 18, el porcentaje de la actividad hipoglucemiante de los tratamientos a cinco horas fue en un 72,4 %, para dosis de 200 mg/kg, 69,5 % para el estándar, 60,6 % y 55,6 % para dosis de 100 y 400 mg/kg. Es muy probable que los flavonoides sean responsables de esta actividad hipoglucemiante,<sup>25</sup> ya que participan en las etapas iniciales de acción de la insulina en el hígado y músculos de ratas *in vivo*, uno de sus mecanismos de acción es que se ligan a receptores de insulina,<sup>60</sup> potencializando las actividades de la enzima tirosina quinasa de los receptores de insulina,<sup>61</sup> esta enzima es fundamental para los efectos biológicos de la insulina para reducir la glucemia, el mecanismo exacto de acción sólo se puede explicar cuando los principios activos se encuentren aislados y se analicen en relación a esta actividad, los flavonoides son apreciados por su amplia actividad farmacológica; pueden unirse a los polímeros biológicos tales como enzimas, transportadores de hormonas, ADN y quelar iones metálicos transitorios tales como hierro, cobre y zinc, que catalizan el transporte de electrones y depuran radicales libres, debido a este hecho; se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas,

úlceras estomacal, duodenal e inflamaciones, los antioxidantes actúan en tres aspectos que se hayan alterado en la diabetes como la función endotelial, las moléculas pro inflamatorias y el estrés oxidativo generado por el aumento de ROS.<sup>62</sup> 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 (superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (Gpx) y glutatión reductasa, sustancias naturales con efecto antioxidante como la vitamina C, E, enzimas reparadoras de ADN), como consecuencia hay una modulación negativa de la actividad biológica del óxido nítrico (NO).<sup>30, 53</sup>

Los flavonoides desempeñan funciones esenciales en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, sus propiedades antirradicalarias se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidróxido y superóxido, especies altamente reactivas, de esta manera bloquean la acción de dichas sustancias sobre las células.<sup>63</sup> Entonces podría pensarse que la acción de *Cassia alata* L en la reducción de los niveles de glucemia sea por la presencia de flavonoides, sin excluir los demás compuestos que también protegen de las complicaciones producidas por la diabetes, desde el punto de vista químico este estudio sería la antesala al aislamiento del sistema de flavonoides presentes en la planta y comparar la bioactividad, un antioxidante debe ser capaz de reaccionar fácil y específicamente con un radical libre, neutralizando e impidiendo el daño oxidativo a las macromoléculas biológicas.<sup>64</sup>

## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" presenta metabolitos secundarios como taninos, polifenoles, triterpenos, esteroides, flavonoides, azúcares reductores, quinonas, alcaloides, catequinas, antocianinas y saponinas.
2. El porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" fue de 95,8 %, 94 % y 53,4 % de actividad a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml. Respecto a los estándares ácido ascórbico, que mostró tener actividad en un 99,1 %, 98,4 % y 99 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml; de igual manera el ácido tánico posee actividad secuestradora del radical libre DPPH con un porcentaje de 96,2 %, 96,5 % y 94,6 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml. Por ende, el extracto hidroalcohólico posee capacidad secuestradora del radical libre.
3. La dosis con mejor actividad hipoglucemiante fue a 200 mg/kg, dicha actividad fue similar al estándar.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar monitoreo continuo a la dosis de aloxano, previo a la administración en las unidades experimentales a 0, 6, 12 y 24 horas, con la finalidad de mejorar los errores debidos a la dosificación.
2. Realizar otros estudios *in vivo* e *in vitro* que ratifique la capacidad antioxidante de las hojas de *Cassia alata* L y continuar con estudios químicos que permitan el aislamiento de moléculas específicas con actividad antioxidante, utilizando cromatografía líquida de alta sensibilidad (HPLC), y obtener moléculas con mejor capacidad antioxidante.
3. Por los resultados obtenidos, podemos asumir que se trata de un importante recurso natural, por lo que se deben continuar con las investigaciones para conocerla mejor y aprovechar sus bondades farmacológicas a dosis adecuadas en infusiones y realizar estudios de toxicidad aguda y crónica.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar Enrique JF. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría]. Lima. Servicio de publicaciones e intercambio científico; UNMSM; 2007.
2. Kameswara R. Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momardica cimbalaria* Hook. Fruit in alloxan diabetic rats. *Journal Ethnopharmacology* [revista en internet]. 1999 [acceso, 02 de Octubre de 2012]. 67:103-109; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199000045>
3. Palomino C. Efecto del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. "guanábana" sobre la hiperglucemia inducida con aloxano en ratas. [Tesis de Maestría]. Lima: servicio de publicaciones e intercambio científico; UNMSM; 2007.
4. Sanabria O, Macías D, Ramírez B, Ramírez H, Varona G. Productos forestales no maderables en los resguardos de Guangüi y Calle Santa Rosa, Pacífico Caucaño. Colombia: Universidad del Cauca; 2012.
5. Lagos G, Cediel V, Villegas S. Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en pacientes VIH positivos y donantes voluntarios de sangre revista médica de Risaralda [revista en internet]; 2012. [acceso, 16 de Marzo de 2013]; 18(1):54-62. Disponible en: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3302/1/V18N1A9.pdf>
6. Dolores M, Fernández F, Tuneu L. Guía de seguimiento Farmacoterapéutico sobre diabetes. *Revista médica* [revista en internet]. 2011 [acceso, 14 de Marzo de 2013]; 1-64. Disponible en: [http://ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/GUIA\\_DIABETES.pdf](http://ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/GUIA_DIABETES.pdf)
7. Stephen J, Mcphee M, Maxine A, Papadakis M. Diagnóstico clínico y tratamiento. 49ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2010.
8. Díaz A. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* [revista en internet]. 2006 [acceso, 12 de Marzo de 2013]; 25(3). Disponible en: [http://www.scielo.sld.cu/cielo.php?pid=S086403002006000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sld.cu/cielo.php?pid=S086403002006000300009&script=sci_arttext)
9. García C, Díaz M, Morales F. Determinación de las especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus insulín dependiente. *Centro de Investigación y desarrollo de Medicamentos* [revista en internet]. 2005 [acceso, 18 de Marzo de 2013]; 21(2):145-148. Disponible en: <http://www.sediabetes.org/resources/revista/00011415archivoarticulo.pdf>
10. Quintanar MA, Calderón JV. La capacidad antioxidante total: Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica* [revista en internet]. 2009 [acceso, 10 de Marzo de 2013]; 28(3):89-101. Disponible en: [http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB/REB/2009/Septiembre/g\\_3erArticulo.pdf](http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB/REB/2009/Septiembre/g_3erArticulo.pdf)
11. Untiveros C, Nuñez O, Tapia L, Tapia G. Complicaciones tardías en diabetes mellitus tipo 2 en el Hospital II ESSALUD. *Revista médica heredia* [revista en internet]. 2004 [acceso, 10 de Marzo de 2013]; 15(2):64-69. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v15n2/v15n2ao1.pdf>
12. Pérez A, Lora S, Inclán A. Prediabetes: Antesala de La diabetes sacarina de tipo 2. *Revista Cuba MEDISAN* [revista en internet]. 2010 [acceso, 20 de Marzo de 2013]; 14(2):262. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v14n2/san18210.pdf>
13. Robert B, Raffa P, Scott M, Rawls P, Portyansky E, Netter. *Farmacología ilustrada*. España: Elsevier, 2008.
14. Saito S, Silva G, Regineide X, Gosmann G, Pungartnik C, Brendel M. Astragalin from *Cassia alata* Induces DNA Adducts in Vitro and Repairable

- DNA Damage in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Molecular Sciences [revista en internet]. 2012 [acceso, 25 de Marzo de 2013]; 13:2846-2862. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317691/pdf/ijms-13-02846.Pdf>
15. Panichayupakaranant P, Sakunpak A, Sakunphueak A. Quantitative HPLC Determination and Extraction of Anthraquinones in *Senna alata* Leaves. Journal of Chromatographic Science [revista en internet]. 2009 [acceso, 21 de Marzo de 2013]; Vol. 47:197-200 Disponible en: <http://chromsci.oxfordjournals.org/content/47/3/197.full.pdf>
  16. Kaewsuwam S, Panichayupakaranant P. Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves. J.Sci. Tehnol [revista en internet]. 2004 [acceso, 23 de Marzo de 2013]; 26(1):103-107. Disponible en: <http://rdo.ps.ac.th/sjstweb/journal/261/10Cassia%20alata%20L.%20leaves.pdf>
  17. Dave H, Ledwani L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. Indian Journal of Natural Products and Resources [revista en internet]. 2012 [acceso, 29 de Marzo de 2013]; 3(3):291-319. Disponible en: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14810/1/IJNPR%203\(3\)%20291-319.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14810/1/IJNPR%203(3)%20291-319.pdf)
  18. Barrese Y, Hernández M. Tamizaje fitoquímico de la droga cruda y extracto fluido de la *Guacamaya francesa*. Revista Plant Med [revista en internet]. 2002 [acceso, 01 de Noviembre de 2012]; 7(3):129-130. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla09205.pdf>
  19. Thirumal L, Srimanthula S, Kishore G. *Cassia fistula* Linn-pharmacognostical, Phytochemical and Pharmacological Review. J. Earth. Org Indian [revista en internet]. 2012 [acceso, 04 de Abril de 2013]; 1:43-65. Disponible en: <http://earthjournals.org/crps-7.pdf>
  20. Pari L, Latha M. Effect of *Cassia auriculata* flowers on blood sugar levels, serum and tissue lipids in streptozotocin diabetic rats. Singapur Med Journal [revista en internet]. 2002 [acceso, 25 de enero de 2012]; 43(12): 617-621. Disponible en: <http://www.diatea.com/files/testresults1.pdf>
  21. Lemes C, Rodriguez C, Hechevarría I. Estudios preliminares de la cosecha de follaje de *Senna alata* L. Roxb. (Guacamaya francesa) con propósitos medicinales. Revista Cubana Plant Med [revista en internet]. 1998 [acceso, 20 de Enero de 2012]; 3(1):18-21 disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3\\_1\\_98/pla04198.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3_1_98/pla04198.pdf)
  22. Mostacero J, Mejía F. Taxonomía de fanerógamas peruanas. Perú: Libertad EIRL Trujillo; 1993.
  23. TRAMIL. Programa de Investigación Aplicada a la Medicina Tradicional Popular del Caribe. Farmacopea caribeña. República Dominicana: Emile Désormeaux; 2011.
  24. Veerachari U, Bopaiah A. Phytochemical investigation of the ethanol, metanol and ethyl acetate leaf extracts of six *Cassia* species. International Journal of Pharma and Bio Sci [revista en internet]. 2012 [acceso, 29 de Noviembre de 2012]; 3(2):260-270. Disponible en: <http://www.ijpijournals.com/Articles/PDF/238.pdf>
  25. Negri G. Diabetes mellitus: plantas y principios activos naturales hipoglicemiantes. Journal of Pharmaceutical Sciences Brazilian [revista en internet]. 2005 [acceso, 25 de Noviembre de 2012]; 41(2):121-142. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n2/28034.pdf>
  26. Fernand V, Dinh D, Washington S, Fakayode S, Losso J, Ravenswaay R. Determination of Pharmacologically Active Compounds in Root Extracts of *Cassia alata* L by use of High Performance Liquid Chromatography. National

- Institutes of health Talanta [revista en internet]. 2008 [acceso, 03 de Febrero de 2013]; 74(4):896-902. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276639/pdf/nihms38701.pdf>
27. Guerra M, Sánchez E, Gálvez M. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. Revista Cubana Plant Med [revista en internet]. 2004 [acceso, 23 de Febrero de 2013]; 9(1). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962004000100005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962004000100005&lng=es).
  28. Somchit M, Reezal I, Nur I, Mutalib A. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. Journal Ethnopharmacol [revista en internet]. 2003 [acceso, 20 de Enero de 2013]; 84(1):1-4; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874102001460>
  29. Gevilbergue M, Cavalcanti C, Valente E, Arnaldo F, Barbosa S. Validación de potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monosporascus cannonballus*. Revista Ciênc. agrotec. Lavras [revista en internet]. 2008 [acceso, 28 de Febrero de 2013]; 32(5):1387-1393. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n5/05.pdf>
  30. Cruz J, Licea M, Hernández P, Enrique A, Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev. Mex Patol Clin [revista en internet]. 2011 [acceso, 05 de Abril de 2013]; 58(1):4-15. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2011/pt111b.pdf>
  31. Cotran R, Kumar V, Robbins T. Patología estructural y funcional. 6ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2000.
  32. Halliwell B. antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutri. [revista en internet]. 1996 [acceso, 28 de Febrero de 2013]; 16:33-50. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.Un.16.070196.000341>
  33. Kumar V, Kumar S. Plants as natural antioxidants. Revista Natural Product Radiance [revista en internet]. 2006 [acceso, 05 de Diciembre de 2013]; 5(4):326-334. Disponible en: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/7962/1/NPR%205\(4\)%20326-334.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/7962/1/NPR%205(4)%20326-334.pdf)
  34. Mcphee S, Ganong W, Lingappa V, Large J. Trastornos del páncreas endocrino: Fisiopatología médica. Una introducción a la medicina clínica 8ª ed. México: El Manual moderno S.A; 2000.
  35. Harrison J. Manual de Medicina Interna. 17ª ed. México: Mc. Graw. Hill; 2010.
  36. Malgor L, Valsecia E. Farmacología médica: Facultad de Medicina Universidad Nacional del Noreste; 1999
  37. Taylor M, Reide P. Farmacología. España: Harcourt Brace; 1999.
  38. Alvarado J. Apuntes de farmacología. Lima-Perú: Apuntes médicos del Perú. Vol.4; 2009.
  39. Flórez J. Farmacología humana. 3ª ed. Barcelona-España: Masson; 1997.
  40. Lépori L, Cohen A, Castagneto H, Benites S, Peyrás E, Novaro A. P.R. VADEMECUN. Perú: Científica Propesa; 2000.
  41. Fernández I, Martín J, Alvarez F. Tratamiento de la diabetes tipo 2. Estrategias terapéuticas con antidiabéticos orales. Revista el médico interactivo [revista en internet]. 2003 [acceso, 13 de Octubre de 2012]. Disponible en: <http://www.elmedicointeractivo.com>
  42. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. España: Síntesis S.A; 1999.
  43. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana; 2000.
  44. Elakkia S, Venkatesalu. Antimicrobial activity of different solvent extracts of some *Cassia* species. Revista internacional Journal of pharmaand Bio

- Sciences [revista en internet]. 2013 [acceso, 20 de Mayo de 2013]; 4 (3):728-736. Disponible en: [http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/2593\\_pdf.pdf](http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/2593_pdf.pdf)
45. Gola G. Tratado de Botánica" 2ª ed. Barcelona-España: Labor S.A; 1965.
  46. Martínez S, Gonzales J, Culebras M, Tuñon M. los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Revista nutrición hospitalaria [revista en internet]. 2002 [acceso, 25 de Marzo de 2013]; 27(6):271-279. Disponible en: [http://www.recursosdeenologia.com/doccs/2002/2002\\_los\\_flavonoidesn\\_propiedades\\_y\\_acciones\\_antioxidantes.pdf](http://www.recursosdeenologia.com/doccs/2002/2002_los_flavonoidesn_propiedades_y_acciones_antioxidantes.pdf)
  47. Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod [revista en internet]. 2000 [acceso, 09 de Enero de 2013]; 63(7):1035-1042. Disponible en: [http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/\(Pietta%20P-G2000\).Pdf](http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/(Pietta%20P-G2000).Pdf)
  48. Tasayco N. Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* "yacon" en ratas con diabetes tipo 1 y 2 [Tesis de Maestría]. Lima. UNMSM; 2007.
  49. Masson M, Tadeu C, Martins J, Artigli S, Padovani C. Caracterizacão de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. Acta cirúrgica Brasileira [revista online]. 2003 Mar-Abr; 18(2). Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n2/15197.Pdf>
  50. Howland B, zebrowski E. Hyposecretion of gonadotrophins in alloxan treated male rats. J. reprod. Fert. [revista en internet]. 1972 [acceso, 18 de Enero de 2013]; 31:115-118. Disponible en: <http://www.reproduction-online.org/content/31/1/115.full.pdf+html>
  51. Mello M, Luciano E. Effects of protein malnutrition on glucosa tolerance in rats with alloxan-induced. Braz. J. Med. [revista en internet]. 1995 [acceso, 21 de Enero de 2013]; 467-470. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8520544>
  52. Yegen E, Akcay F, Yigitoglu M. Plasma atrial natriuretic peptide levels in rabbits with alloxan monohydrate-induced diabetes mellitus. J Japan Heart [revista en internet]. 1995 [acceso, 10 de Marzo de 2013]; 789-795. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627984>
  53. Bustamante S, Muñoz J, Figueroa H, Morales M. Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. Revista de fitoterapia SEFIT [revista en internet]. 2003 [acceso, 17 de Marzo de 2013]; 3(2):135-144. Disponible en: [http://www.fitoterapia.Net/pdf\\_3\\_2/03/](http://www.fitoterapia.Net/pdf_3_2/03/)
  54. Gutiérrez N, Gonzales M. Diabetes aloxánica en la rata blanca. Revista hispanoamericana de ciencias puras y aplicadas [revista en internet]. 1953 [acceso, 28 de Mayo de 2013]; 13(4): 85-96. Disponible en: [http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ciencia/1953\\_13\\_04-06-z2.pdf](http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ciencia/1953_13_04-06-z2.pdf)
  55. Kodama T, Iwase M, Nunci K. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. J. Diabetes Res Clin Pract, Ireland [revista en internet]. 1993 [acceso, 28 de Mayo de 2013]; 20(3):183-189. Disponible en: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/01688227\\_9390076H](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/01688227_9390076H)
  56. López G, Ventura P, Rodríguez R, Casas B, Hernández P, Arias G. Efectos de un extracto hidroalcohólico de *Bidens alba* en ratas normales y con diabetes aloxánica. Acta Farm. Bonaerense. 2001; 20(2): 89-93. Disponible en: [http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/2/LAJOP\\_20\\_2\\_1\\_1\\_969WQFE\\_L19.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/2/LAJOP_20_2_1_1_969WQFE_L19.pdf)
  57. Ardvinho F. Diabetes Mellitus 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1980.
  58. Aybar M, Riera A, Grau A, Sánchez S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacón) leaves in normal and diabetic

- rats *Journal of Ethnopharmacology*. 2001. 74(2):125-132. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167030>
59. Arola L, Arroyo E, Bajes I, Bermejo M, Boada J, Belmonte S, Bellmunt M, et al. *Genética, Nutrición y Enfermedad*. España: EDIMSA; 2008.
  60. Cheeke P. *Alimentación y nutrición*. España: Academia Press Isla de Mallorca; 1987.
  61. Agullo G, Gamet L, Viala C, Rémesy C, Chap H. Relationship between flavonoids structure and inhibitions of phosphatidylinositol 3 Kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase on inhibition. *Biochem pharmacol [revista en internet]*. 1997 [acceso, 20 de Mayo de 2013]; 53: 1649-1657. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9264317>
  62. Hernandez P. Líneas de defensa contra la producción de radicales libres en diabéticos con retinopatía. *Revista de Ciencia y tecnología en salud visual y ocular [revista en internet]*. 2005 [acceso, 17 de Abril de 2013]; 5:59-69. Disponible en: [http://www.siben.net/archivos/seguisiben/guiaseg\\_esp.pdf](http://www.siben.net/archivos/seguisiben/guiaseg_esp.pdf)
  63. Han R, Zhang J, Skibsted L. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids. *Journals of Molecules Scientific [revista en internet]*. 2012 [acceso, 26 de Mayo de 2013]; 17:2140-2160. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/2/2140/pdf>
  64. Dragan A, Dusanka D, Drago B, Nenat T. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta [revista en internet]*. 2003 [acceso, 28 de Mayo de 2013]; 76(1):55-61. Disponible en: <http://www.hrcaik.srce.hr/file/pdf>

## **ANEXOS**

Anexo 1  
Tabla 4. Certificado de identificación botánica



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

### C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr René Fraxímidez, HUAMÁN PALOMINO, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

|          |   |                        |
|----------|---|------------------------|
| DIVISIÓN | : | MAGNOLIOPHYTA          |
| CLASE    | : | MAGNOLIOPSIDA          |
| SUBCLASE | : | ROSIDAE                |
| ORDEN    | : | FABALES                |
| FAMILIA  | : | CAESALPINIACEAE        |
| GENERO   | : | <i>Cassia</i>          |
| ESPECIE  | : | <i>Cassia alata</i> L. |
| N.V.     | : | "mutuy"                |

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 30 de Octubre del 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Blga. Laura Rocasina Medina  
JEFE

Anexo2  
Tabla 5. Certificado sanitario del material biológico



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación

## CERTIFICADO

San Martín de Porres, 13 de Diciembre del 2012

Mediante la Presente se certifica que las 25 ratas albinas de la cepa Holtzman, de sexo macho, edad adulta y pesos entre 200 a 250 gramos, adquiridas por el Sr. René Fraximidez Huamán Palomino, con DNI 43228832, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizados en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente



Hernando Benavides M.

Jefe de Bioterio-LID

Vicerrectorado de Investigación-UPCH

Av. Honorio Delgado 430 - Lima 31 Aptdo. Postal 4314 - Lima 100  
Telef.: (51-1) 482-1524 Fax: (51-1) 319-0004

Anexo 3

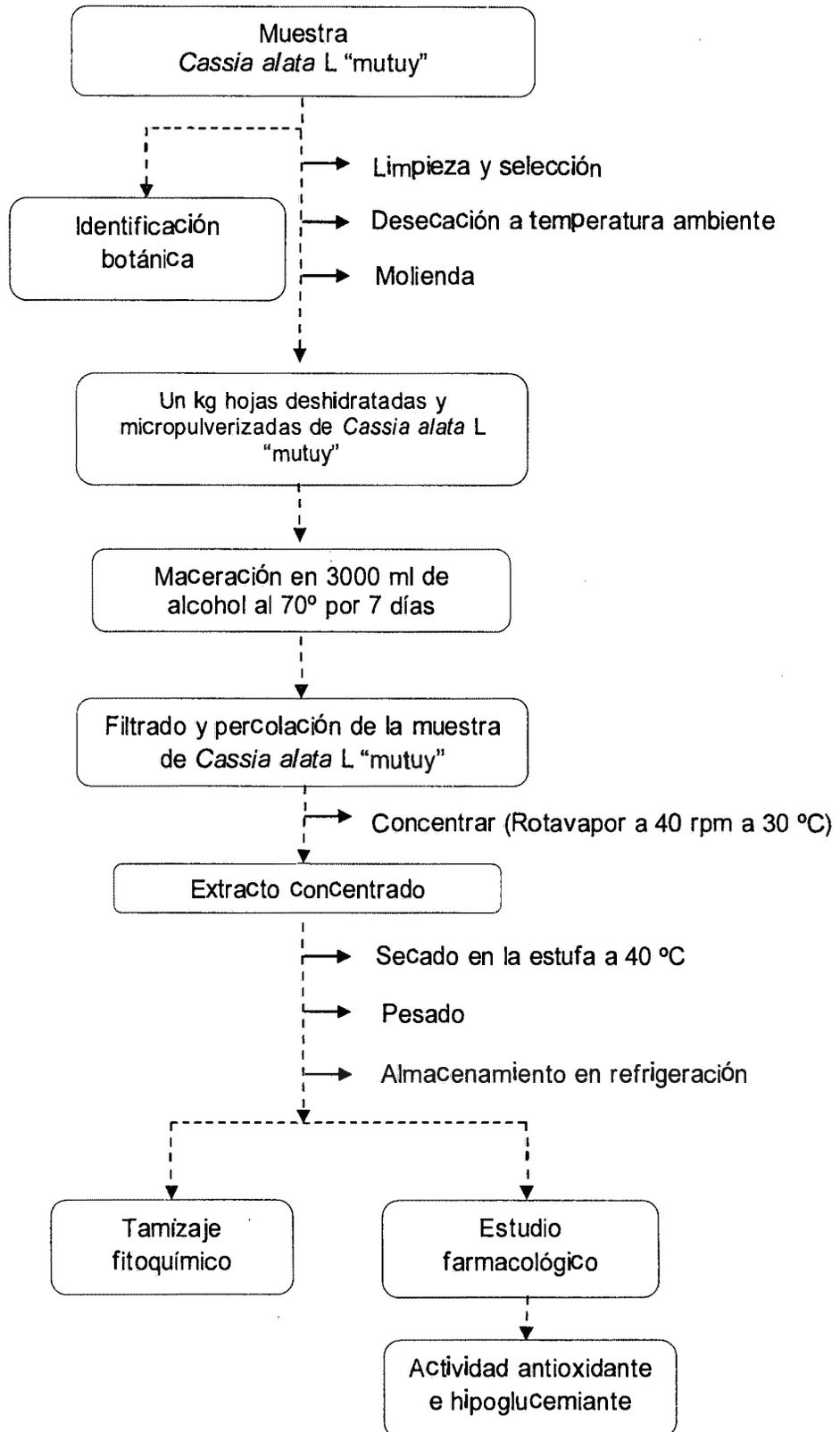


Figura 5. Flujograma del diseño metodológico<sup>42</sup>

Anexo 4  
 Tabla 6. Características de los metabolitos secundarios<sup>43</sup>

| <b>Metabolitos secundarios</b> | <b>Reactivos y/o reacciones</b> | <b>Cantidad para c/u</b> | <b>Observaciones</b>                         |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|--|
| Fenoles y/o taninos            | Tricloruro férrico              | 2 ml                     | Coloración verde tenue                       |
| Flavonoides                    | Shinoda                         | 2 ml                     | Coloración rojo vino en la fase amilica      |
| Triterpenoides y/o esteroides  | Liebermann                      | 2 ml                     | Coloración verde intensa visible             |
| Azúcares reductores            | Fehling                         | 2 ml                     | Coloración rojo                              |
|                                | Dragendorff                     | 2 ml                     | Precipitado marrón                           |
| Alcaloides                     | Wagner                          | 2 ml                     | Precipitado marrón                           |
|                                | Mayer                           | 2 ml                     | Precipitado blanco                           |
| Quinonas                       | Borntrager                      | 2 ml                     | Coloración rojizo                            |
| Catequinas                     | Catequinas                      | 2 ml                     | Fluorescencia verde carmelita a la luz UV    |
| Antocianinas                   | Antocianidina                   | 2 ml                     | Coloración rojo marrón en la fase amilica    |
| Saponinas                      | Espumas                         | 2 ml                     | Formación de espuma por más de cinco minutos |

## Anexo 5

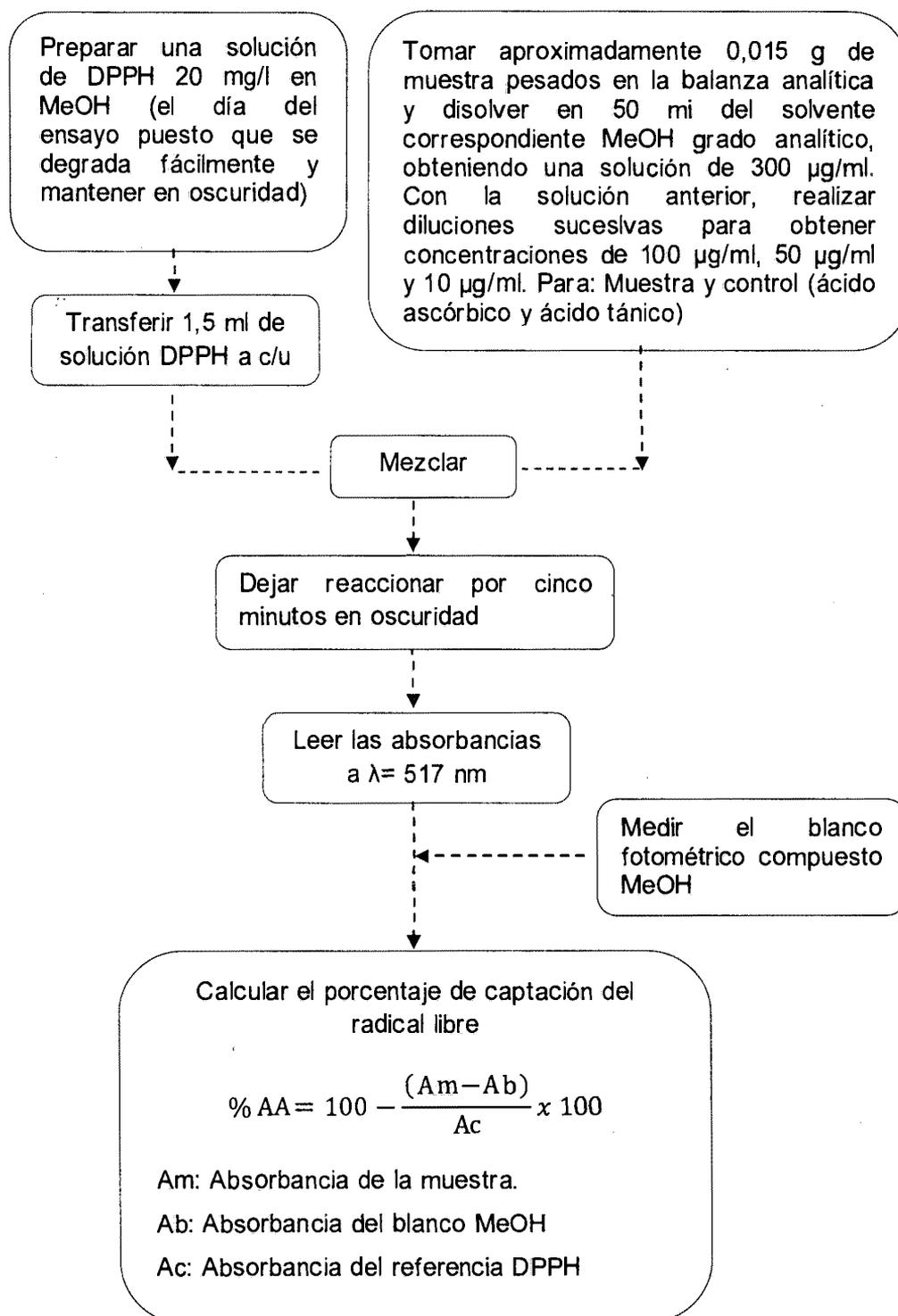


Figura 6. Flujograma para el método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)<sup>1</sup>

Anexo 6



Figura 7. Recolección de las hojas de *Cassia alata* L.  
"mutuy"

Anexo 7

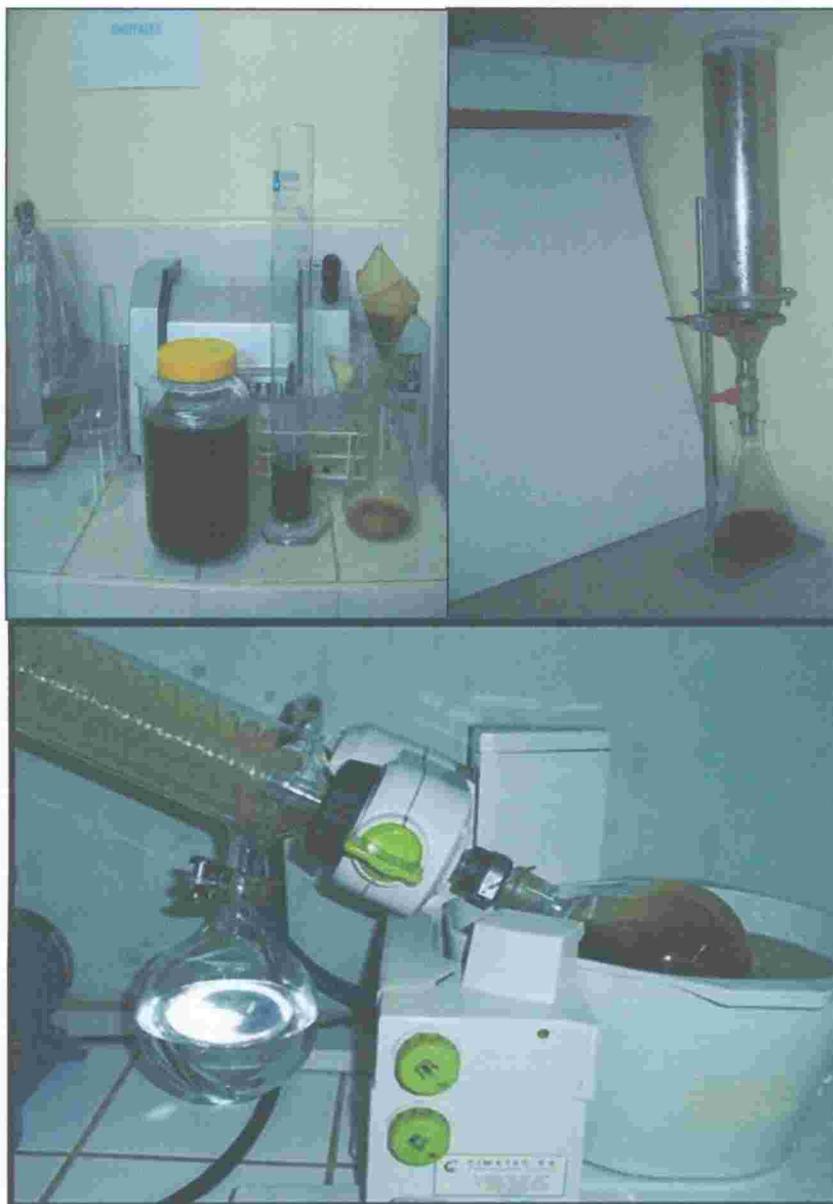


Figura 8. Maceración, filtrado, percolación y concentración de la muestra en el equipo del rota vapor

Anexo 8



Figura 9. Extracto concentrado de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy"

Anexo 9

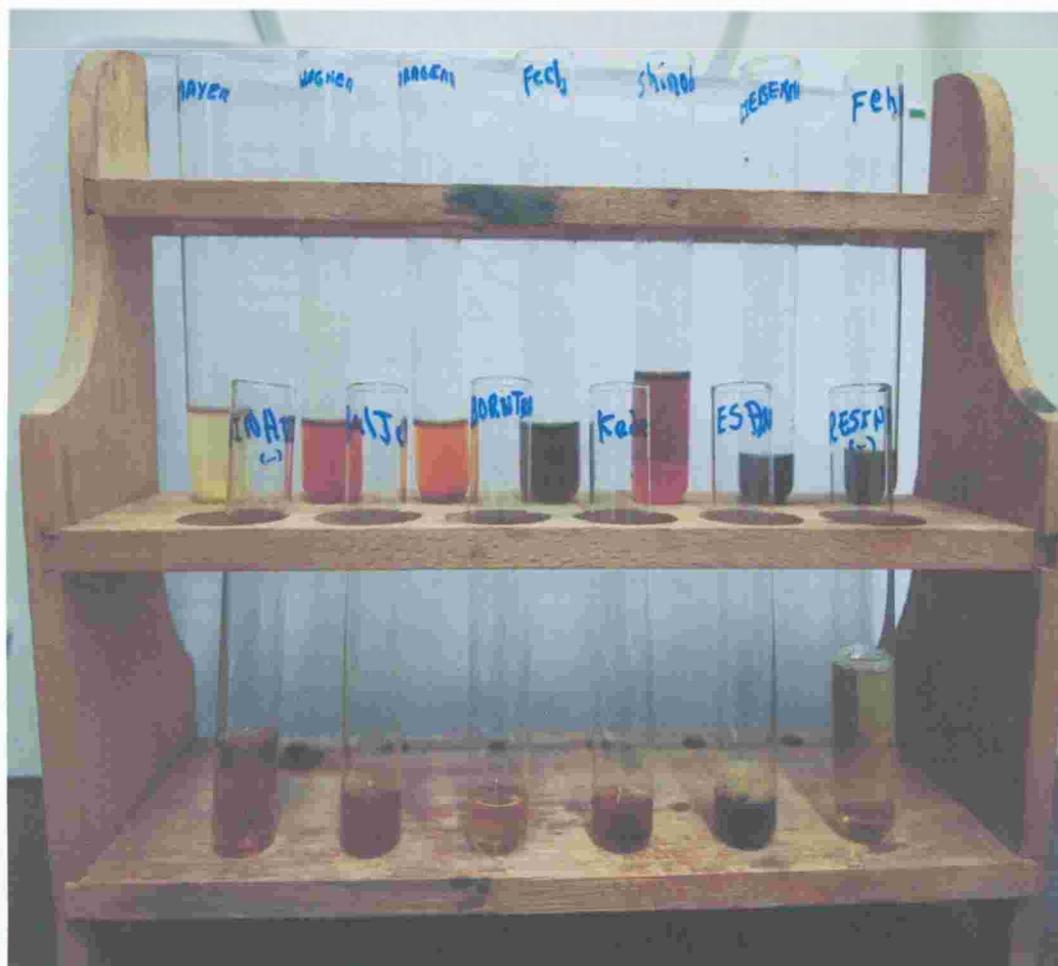


Figura 10. Tubos de prueba con el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico

Anexo 10



Figura 11. Materiales de vidrio con reactivos para determinar la capacidad secuestradora del radical libre

Anexo 11

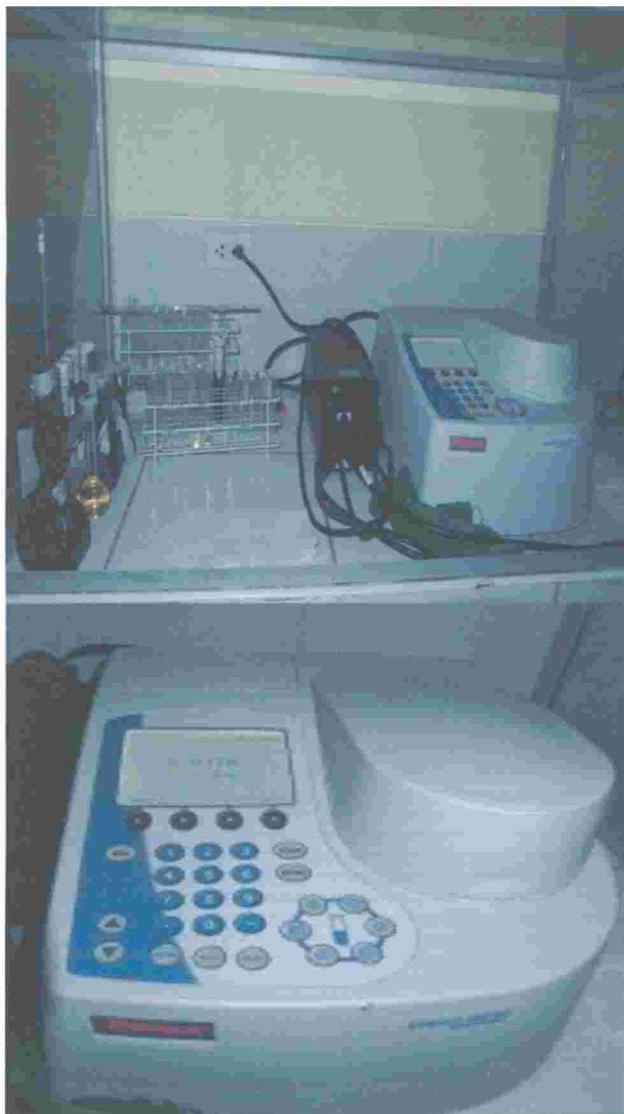


Figura 12. Equipo UV-Vis Thermo Scientific S10

Anexo 12



Figura 13. Tableta de glibenclamida 5 mg (Laboratorio IQfarma)

Anexo 13



Figura 14. Glucómetro ACCU - CHECK® Perfoma Nano

Anexo 14

Tabla 7. Valores descriptivos del porcentaje de captación del radical libre DPPH según muestra

| Muestra                    | N  | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% |                 | Mínimo | Máximo |
|----------------------------|----|-------|-------------------|--------------|---|-----------------|--------|--------|
|                            |    |       |                   |              | Límite inferior                             | Límite superior |        |        |
| Ácido ascórbico 100 µg     | 5  | 0,013 | 0,001             | 0,000        | 0,012                                       | 0,013           | 0,012  | 0,013  |
| Ácido tánico 100 µg        | 5  | 0,023 | 0,001             | 0,001        | 0,021                                       | 0,025           | 0,021  | 0,024  |
| <i>Cassia alata</i> 100 µg | 5  | 0,041 | 0,001             | 0,000        | 0,040                                       | 0,042           | 0,040  | 0,042  |
| Ácido ascórbico 50 µg      | 5  | 0,016 | 0,004             | 0,002        | 0,011                                       | 0,020           | 0,011  | 0,021  |
| Ácido tánico 50 µg         | 5  | 0,026 | 0,002             | 0,001        | 0,024                                       | 0,027           | 0,023  | 0,027  |
| <i>Cassia alata</i> 50 µg  | 5  | 0,042 | 0,002             | 0,001        | 0,040                                       | 0,045           | 0,040  | 0,045  |
| Ácido ascórbico 100 µg     | 5  | 0,016 | 0,003             | 0,001        | 0,012                                       | 0,020           | 0,014  | 0,022  |
| Ácido tánico 10 µg         | 5  | 0,028 | 0,002             | 0,001        | 0,025                                       | 0,031           | 0,025  | 0,030  |
| <i>Cassia alata</i> 10 µg  | 5  | 0,254 | 0,005             | 0,002        | 0,248                                       | 0,261           | 0,245  | 0,257  |
| Total                      | 45 | 0,051 | 0,073             | 0,011        | 0,029                                       | 0,073           | 0,011  | 0,257  |

Anexo 15

Tabla 8. Análisis de varianza y las comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de captación del radical libre DPPH según muestra

| Muestras     | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F         | Sig.  |
|--------------|-------------------|----|------------------|-----------|-------|
| Inter-grupos | 0,237             | 8  | 0,030            | 4,090.696 | 0,000 |
| Intra-grupos | 0,000             | 36 | 0,000            |           |       |
| Total        | 0,237             | 44 |                  |           |       |

| Muestras                     | N | Subconjunto para alfa = 0,05 |         |         |         |
|------------------------------|---|------------------------------|---------|---------|---------|
|                              |   | 1                            | 2       | 3       | 4       |
| Ácido ascórbico 100 µg       | 5 | 0,01260                      |         |         |         |
| Ácido ascórbico 50 µg        | 5 | 0,01586                      |         |         |         |
| Ácido ascórbico 10 µg        | 5 | 0,01640                      |         |         |         |
| Ácido tánico 100 µg          | 5 |                              | 0,02300 |         |         |
| Ácido tánico 50 µg           | 5 |                              | 0,02560 |         |         |
| Ácido tánico 10 µg           | 5 |                              | 0,02800 |         |         |
| <i>Cassia alata</i> L 100 µg | 5 |                              |         | 0,04080 |         |
| <i>Cassia alata</i> L 50 µg  | 5 |                              |         | 0,04240 |         |
| <i>Cassia alata</i> L 10 µg  | 5 |                              |         |         | 0,25440 |
| Sig.                         |   | 0,408                        | 0,113   | 0,989   | 1,000   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 16

Tabla 9. Valores descriptivos del porcentaje de disminución de los niveles de glucosa sanguínea en función del tiempo de tratamiento

| Tratamientos  | N  | Media | Desviación<br>típica | Error<br>típico | Intervalo de<br>confianza para la<br>media al 95% |                    | Mínimo | Máximo |
|---------------|----|-------|----------------------|-----------------|---|--------------------|--------|--------|
|               |    |       |                      |                 | Límite<br>inferior                                | Límite<br>superior |        |        |
| 1 Hora        |    |       |                      |                 |   |                    |        |        |
| Glibenclamida | 4  | 35,00 | 1,14                 | 0,57            | 33,18   | 36,82              | 34,00  | 36,60  |
| 100 mg/kg     | 5  | 41,00 | 1,71                 | 0,76            | 38,88   | 43,12              | 38,80  | 43,20  |
| 200 mg/kg     | 3  | 12,27 | 3,65                 | 2,11            | 3,20  | 21,33              | 8,60   | 15,90  |
| 400 mg/kg     | 3  | 19,10 | 2,75                 | 1,59            | 12,27   | 25,93              | 16,10  | 21,50  |
| Total         | 15 | 29,27 | 12,11                | 3,13            | 22,57   | 35,98              | 8,60   | 43,20  |
| 2 Horas       |    |       |                      |                 |   |                    |        |        |
| Glibenclamida | 3  | 48,13 | 6,18                 | 3,57            | 32,78   | 63,49              | 41,00  | 51,90  |
| 100 mg/kg     | 3  | 42,93 | 7,54                 | 4,36            | 24,19   | 61,67              | 34,80  | 49,70  |
| 200 mg/kg     | 3  | 29,93 | 8,99                 | 5,19            | 7,59  | 52,28              | 19,60  | 36,00  |
| 400 mg/kg     | 4  | 22,93 | 4,08                 | 2,04            | 16,43   | 29,42              | 17,50  | 27,40  |
| Total         | 13 | 34,98 | 12,14                | 3,37            | 27,64   | 42,31              | 17,50  | 51,90  |
| 3 Horas       |    |       |                      |                 |   |                    |        |        |
| Glibenclamida | 5  | 52,42 | 11,22                | 5,02            | 38,49   | 66,35              | 38,80  | 67,20  |
| 100 mg/kg     | 3  | 49,63 | 11,23                | 6,49            | 21,73   | 77,54              | 37,00  | 58,50  |
| 200 mg/kg     | 4  | 51,10 | 11,70                | 5,85            | 32,48   | 69,72              | 41,50  | 65,30  |
| 400 mg/kg     | 4  | 32,95 | 9,59                 | 4,80            | 17,69   | 48,21              | 27,00  | 47,10  |
| Total         | 16 | 46,70 | 12,82                | 3,21            | 39,87   | 53,53              | 27,00  | 67,20  |
| 4 Horas       |    |       |                      |                 |   |                    |        |        |
| Glibenclamida | 5  | 66,92 | 9,25                 | 4,14            | 55,43   | 78,41              | 53,40  | 78,50  |
| 100 mg/kg     | 5  | 48,86 | 11,53                | 5,15            | 34,55   | 63,17              | 33,70  | 62,50  |
| 200 mg/kg     | 5  | 66,76 | 9,22                 | 4,12            | 55,31   | 78,21              | 58,00  | 81,40  |
| 400 mg/kg     | 5  | 52,22 | 5,54                 | 2,48            | 45,34   | 59,10              | 45,30  | 59,90  |
| Total         | 20 | 58,69 | 11,91                | 2,66            | 53,12   | 64,26              | 33,70  | 81,40  |
| 5 Horas       |    |       |                      |                 |   |                    |        |        |
| Glibenclamida | 5  | 69,54 | 3,57                 | 1,60            | 65,11   | 73,97              | 66,50  | 73,40  |
| 100 mg/kg     | 5  | 60,56 | 3,21                 | 1,44            | 56,58   | 64,54              | 56,30  | 63,90  |
| 200 mg/kg     | 5  | 72,36 | 7,25                 | 3,24            | 63,36   | 81,36              | 66,40  | 84,30  |
| 400 mg/kg     | 5  | 55,56 | 4,00                 | 1,79            | 50,60   | 60,52              | 50,40  | 59,50  |
| Total         | 20 | 64,51 | 8,21                 | 1,83            | 60,66   | 68,35              | 50,40  | 84,30  |

Anexo 17

Tabla 10. Análisis de varianza del porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos según tiempo

| <b>Tiempo (h)</b> |              | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Gl</b> | <b>Media cuadrática</b> | <b>F</b> | <b>Sig.</b> |
|-------------------|--------------|--------------------------|-----------|-------------------------|----------|-------------|
| 1 hora            | Inter-grupos | 1996,923                 | 3         | 665,641                 | 127,636  | 0,000       |
|                   | Intra-grupos | 57,367                   | 11        | 5,215                   |          |             |
|                   | Total        | 2054,289                 | 14        |                         |          |             |
| 2 horas           | Inter-grupos | 1366,496                 | 3         | 455,499                 | 10,200   | 0,003       |
|                   | Intra-grupos | 401,908                  | 9         | 44,656                  |          |             |
|                   | Total        | 1768,403                 | 12        |                         |          |             |
| 3 horas           | Inter-grupos | 1023,095                 | 3         | 341,032                 | 2,836    | 0,005       |
|                   | Intra-grupos | 1443,165                 | 12        | 120,264                 |          |             |
|                   | Total        | 2466,260                 | 15        |                         |          |             |
| 4 horas           | Inter-grupos | 1356,738                 | 3         | 452,246                 | 5,413    | 0,009       |
|                   | Intra-grupos | 1336,680                 | 16        | 83,543                  |          |             |
|                   | Total        | 2693,418                 | 19        |                         |          |             |
| 5 horas           | Inter-grupos | 913,142                  | 3         | 304,381                 | 13,304   | 0,000       |
|                   | Intra-grupos | 366,068                  | 16        | 22,879                  |          |             |
|                   | Total        | 1279,210                 | 19        |                         |          |             |

Anexo 18

Tabla 11. Comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos según tiempo

| Tiempo (h) | Tratamiento   | N | Subconjunto homogéneos ( $\alpha = 0,05$ ) |       |       |       |
|------------|---------------|---|--|-------|-------|-------|
|            |               |   | 1  | 2     | 3     | 4     |
| 1 hora     | 200 mg/kg     | 3 | 12,27                                      |       |       |       |
|            | 400 mg/kg     | 3 |  | 19,10 |       |       |
|            | Glibenclamida | 4 |  |       | 35,00 |       |
|            | 100 mg/kg     | 5 |  |       |       | 41,00 |
|            | Sig.          |   | 1,00                                       | 1,00  | 1,00  | 1,00  |
| 2 horas    | 400 mg/kg     | 4 | 22,93                                      |       |       |       |
|            | 200 mg/kg     | 3 | 29,93                                      | 29,93 |       |       |
|            | 100 mg/kg     | 3 |  | 42,93 | 42,93 |       |
|            | Glibenclamida | 3 |  |       | 48,13 |       |
|            | Sig.          |   | 0,57                                       | 0,13  | 0,76  |       |
| 3 horas    | 400 mg/kg     | 4 | 32,95                                      |       |       |       |
|            | 100 mg/kg     | 3 | 49,63                                      |       |       |       |
|            | 200 mg/kg     | 4 | 51,10                                      |       |       |       |
|            | Glibenclamida | 5 | 52,42                                      |       |       |       |
|            | Sig.          |   | 0,12                                       |       |       |       |
| 4 horas    | 100 mg/kg     | 5 | 48,86                                      |       |       |       |
|            | 400 mg/kg     | 5 | 52,22                                      | 52,22 |       |       |
|            | 200 mg/kg     | 5 |  | 66,76 |       |       |
|            | Glibenclamida | 5 |  | 66,92 |       |       |
|            | Sig.          |   | 0,94                                       | 0,09  |       |       |
| 5 horas    | 400 mg/kg     | 5 | 55,56                                      |       |       |       |
|            | 100 mg/kg     | 5 | 60,56                                      |       |       |       |
|            | Glibenclamida | 5 |  | 69,54 |       |       |
|            | 200 mg/kg     | 5 |  | 72,36 |       |       |
|            | Sig.          |   | 0,38                                       | 0,79  |       |       |

Tabla 12. Matriz de consistencia

| TÍTULO   | PROBLEMA   | OBJETIVOS  | HIPÓTESIS   | VARIABLES  | MARCO TEÓRICO  | METODOLOGÍA  |
|--|--|--|---|--|--|--|
| "Actividad antioxidante e hipoglucémica del extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy". Ayacucho, 2012" | ¿Tendrá actividad antioxidante e hipoglucémica el extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy"? | <p><b>Objetivo general:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la actividad antioxidante e hipoglucémica del extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy".</li> </ul> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy", mediante tamizaje fitoquímico.</li> <li>Determinar el porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy" y compararlo con el estándar ácido ascórbico y ácido tánico.</li> <li>Evaluar la dosis con mejor actividad hipoglucémica del extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy", respecto al estándar glibencilamida.</li> </ul> | <p>El extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy" posee actividad antioxidante e hipoglucémica.</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Concentración de 10 µg/ml y 50 µg/ml.</li> <li>Dosis de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 400 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas de Cassia alata L "mutuy"</li> </ul> | <p>Cassia alata L "mutuy", es un arbusto, presenta hojas compuestas paripinnadas, folíolos de 6 a 14 pares emarginados, la inflorescencia es en racimos terminales con numerosas flores de color amarillo, presenta sépalos ligeramente distintos entre sí con cinco pétalos casi iguales en forma de uña, el fruto es vaina plana linear y la semillas es de color café oscuro. <b>Composición química y propiedades medicinales</b></p> <p>Entre sus componentes presenta flavonoides, taninos, alcaloides, azúcares reductores, antraquinonas, triterpenos y/o esteroides, saponinas, antocianinas, catequinas, alantoina, mucilagos y se usan en tratamientos de muchas enfermedades, antimicrobianos, diuréticos, anticatarrales, febrífugos, antidiarreico, analgésicos, laxantes, antiparasitario, depurativa de la sangre e hipoglucemiante.</p> <p><b>Radicales libres.</b> Especies químicas que tienen un único electrón no emparejado. Es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con proteínas, lípidos y carbohidratos.</p> <p><b>Estrés oxidativo</b> es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de las células.</p> <p>Los antioxidantes son sustancias que donan electrones y neutralizan a los radicales libres, quiebran metales y la reparación de los daños celulares.</p> <p>Diabetes mellitus</p> <p>La diabetes es una enfermedad metabólica con presencia de hiperglucemia.</p> <p>-Clasificación fisiopatológica</p> <p>- Tratamiento.</p> | <p><b>Nivel de investigación.</b> Básico - Experimental.</p> <p><b>Población.</b> Hojas de Cassia alata L "mutuy" que crecen en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a 2100 m.s.n.m.</p> <p><b>Muestra.</b> Un kg de hojas secas de Cassia alata L "mutuy"</p> <p><b>Unidad Experimental:</b> Se utilizó 30 ratas holzmann machos con pesos entre 200 - 250 g, que fueron adquiridos del biterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Peruana Cayetano Heredia - Lima.</p> <p><b>Modelo experimental.</b></p> <p><b>Actívador secuestradora del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo, DPPH (Aguilar, 2007)</b> Que emplea al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), que por su estabilidad es destruido solamente por antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH será el mejor antioxidante.</p> <p><b>Método de inducción de diabetes con aloxano (Kameswara y col., 1999; modificado por Palomino, 2007):</b> A las ratas se les administra aloxano monohidratado a una dosis de 150 mg/kg disuelto en agua destilada por vía intraperitoneal. Después de 24 horas las ratas mostraron una marcada hiperglucemia y los animales que presenten un nivel de glucosa sanguínea <math>\geq</math> 250 mg/dl fueron utilizados para el estudio.</p> <p><b>Diseño Experimental.</b> Ramdomizado. Las ratas fueron divididas de manera aleatoria en seis grupos, cada uno con repeticiones de cinco ratas.</p> <p><b>Análisis Estadístico.</b> Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS v.21 para PC. Estos se presentaron como valores medios +/- error estándar. Las diferencias significativas de los grupos que recibieron tratamientos se determinó con el análisis de varianza y las comparaciones múltiples de Tukey.</p> |

# Actividad antioxidante e hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L “mutuy”, Ayacucho 2012

René Fraxímidez Huamán Palomino<sup>1</sup>, Johnny Aldo Tinco Jayo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Farmacia y Bioquímica: UNSCH

## RESUMEN

La diabetes es un trastorno metabólico más frecuente que se relaciona con secreción alterada de la hormona endocrina, con generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres; es considerada actualmente un problema de salud pública. El objetivo fue determinar la actividad antioxidante e hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L “mutuy”, durante los meses de noviembre de 2012 a marzo de 2013. El tipo de investigación realizado fue básico experimental, la muestra fue colectada en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga y se obtuvo el extracto hidroalcohólico. La determinación de la actividad antioxidante se desarrolló mediante el método de secuestro del radical libre DPPH.<sup>1</sup> El efecto hipoglucemiante fue determinado mediante el método descrito por Kameswara y modificado por Palomino<sup>2,3</sup> en ratas Holtzman machos, distribuidos en seis grupos de cinco cada uno; se les administró aloxano a una dosis de 150 mg/kg disuelto en agua destilada por vía intraperitoneal. Al grupo I se administró SSF 1,0 ml/kg (blanco), grupo II (aloxano control), grupo III, IV, V (aloxano + extractos a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg), grupo V (aloxano + glibenclamida 5 mg/kg estándar). El nivel de glucosa sanguínea se determinó a 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas. Los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico fueron: flavonoides, taninos, polifenoles, triterpenos y/o esteroides, azúcares reductores, alcaloides, quinonas, antocianinas, catequinas y saponinas. Todas las muestras fueron activas al decolorar el DPPH, con una actividad de 95,8 %, 94 % y 53,4 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml, respectivamente. Los resultados fueron comparados con los estándares ácido ascórbico y ácido tánico en las mismas concentraciones y poseen actividad de 99,1 %, 98,4 %, 99 % y 96,2 %, 96,5 %, 94,6 %. A cinco horas del tratamiento el porcentaje de actividad hipoglucemiante a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg del extracto fue de 60,6 %, 72,4 % y 55,6 % respectivamente y 70 % para el estándar existiendo estadísticamente diferencia significativa. Se concluye que el extracto hidroalcohólico posee actividad antioxidante y a dosis de 200 mg/kg posee mejor actividad hipoglucemiante.

Palabras clave: Actividad antioxidante e hipoglucemiante, *Cassia alata* L.

## SUMMARY

Diabetes is the most common metabolic disorder that is related to altered secretion of endocrine hormone, generating reactive oxygen species and free radicals, is currently considered a public health problem. The objective was to determine the antioxidant activity and hypoglycemic hydroalcoholic extract of the leaves of *Cassia alata* L “mutuy” during the months of November 2012 to March 2013. The type of basic experimental research was conducted, the sample was collected in the district of Ayacucho, province Huamanga and hydroalcoholic extract was obtained. Determination of antioxidant activity was developed by the method of free radical sequestration DPPH.<sup>1</sup> The hypoglycemic effect was determined by the method described by Kameswara and modified by Palomino<sup>2,3</sup> Holtzman male rats, divided into six groups of five each; alloxan was administered at a dose of 150 mg/kg dissolved in distilled water by the intraperitoneal route. Group I was given SSF 1,0 ml/kg (white), group II (alloxan control), group III, IV, V (alloxan + extracts at doses of 100, 200 and 400 mg/kg), group V (alloxan + glibenclamide 5 mg/kg standard). Blood glucose level was determined 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours. Metabolites present in the hydroalcoholic extract were: flavonoids, tannins, polyphenols, triterpenes and/or steroids, reducing sugars, alkaloids, quinones, anthocyanins, catechins and saponins. All samples were active at discolor DPPH with an activity of 95,8 %, 94 % and 53,4 % at concentrations of 100, 50 and 10 µg/ml, respectively. The results were compared with standards ascorbic acid and tannic acid in the same concentrations possess activity 99,1 %, 98,4 %, 99 % and

96,2 %, 96,5 %, 94,6 %. Five hours after treatment, the percentage of hypoglycemic activity at doses of 100, 200 and 400 mg/kg of the extract was 60,6 %, 72,4 % and 55,6 % and 70 % respectively for standard exists statistically significant difference. We conclude that the hydroalcoholic extract possesses antioxidant activity and doses of 200 mg/kg has better hypoglycemic activity.

**Key words:** Antioxidant activity and hypoglycemic, *Cassia alata* L.

## INTRODUCCIÓN

*Cassia alata* L, es utilizado por la gran variedad de compuestos que sintetiza con propiedades terapéuticas en enfermedades de la piel, antibacteriano, diurético, antidiarreica, febrífuga, analgésico, laxante, antiparasitaria, sudorífica, purgante depurativa de la sangre e hipoglucemiante, las hojas son ricas en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos.<sup>4</sup> El estrés oxidativo se origina por desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante celular (CAC), la producción de ROS mitocondrial es constante, entre 2 % y 5 % del oxígeno para la cadena respiratoria se reduce para generar el anión superóxido,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  radicales libres potencialmente dañinos para la célula.<sup>5</sup> La diabetes es una enfermedad metabólica que se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre, secundaria a una alteración absoluta o relativa de la secreción de insulina,<sup>6</sup> y se clasifican en diabetes de tipo 1 y 2.<sup>7</sup> El estrés oxidativo está íntimamente relacionado con la diabetes mellitus en la cual el óxido nítrico es el principal factor comprometido con las propiedades antiateroscleróticas del endotelio, la diabetes, hipertensión o las dislipemias, aumentan la producción de anión superóxido que inactiva al óxido nítrico.<sup>6</sup> Las elevadas concentraciones de glucosa sanguínea incrementan los niveles de ROS, por diferentes vías, aumentando la formación de los productos de glicosilación avanzada; activando a la proteína quinasa C, disminuyendo el NADPH,  $H^+$  intracelular, activando la posición de ROS en la mitocondria y participan en la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas por tanto en el desarrollo de la diabetes mellitus.<sup>8,9</sup> La búsqueda de nuevos antioxidantes naturales es el interés para la investigación, por que interrumpe el proceso de oxidación radicalaria de lípidos, proteínas, ADN y enzimas, los compuestos fenólicos son reconocidos antioxidantes.<sup>10</sup> La diabetes mellitus es una enfermedad crónica considerada actualmente como un problema de salud pública.<sup>11</sup> Se calcula que en el mundo hay aproximadamente 314 millones de personas con alteración de la glucosa y se pronostica que esta cifra se incrementará a los 500 millones en el año 2025, como consecuencia del descenso de la

actividad física, el aumento de la ingesta calórica y de los índices de obesidad. La acción terapéutica de los compuestos fenólicos comprende la interacción entre una sustancia química exógena y la diana bioquímica endógena.<sup>12, 13</sup> El presente trabajo de investigación propone los siguientes objetivos:

### Objetivo general:

Determinar la actividad antioxidante e hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy".

### Objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy", mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar el porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" y comparar con el estándar ácido ascórbico y ácido tánico.
- Evaluar la dosis con mejor actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy", respecto al estándar glibenclamida)

## MATERIALES Y METODOS

### Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Farmacología, Farmacognosia, Toxicología y en Laboratorio del Centro de Producción del área académica de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de noviembre de 2012 a marzo de 2013.

### Población y muestra

#### Población

*Cassia alata* L "mutuy" que crece en el distrito de Ayacucho provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho ubicado a 2100 m.s.n.m.

#### Muestra

La muestra que se utilizó fue un kilogramo de hojas secas de *Cassia alata* L "mutuy" recolectadas en el distrito de Ayacucho provincia de Huamanga, el sistema de muestreo fue por conveniencia y una parte de la planta recolectada se llevó al *Herbarium Huamangensis* para su identificación y su clasificación botánica.

### Unidad experimental

Constituido por 30 ratas albinas machos de cepa Holtzman edad adulta y con pesos de 200 a 250 g procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Peruana Cayetano Heredia - Lima. Los mismos que fueron acondicionados con alimentación balanceada y agua a libertad en el bioterio del Laboratorio de Farmacología en el área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

### Diseño metodológico para la recolección de datos Procedimiento para la recolección, selección y secado de la muestra

La recolección, selección y secado de la muestra se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Villar del Fresno.<sup>14</sup> La planta se recolectó manualmente, en las horas de la mañana en un clima templado en su estadio de floración, durante el mes de noviembre del 2012. Se seleccionaron las hojas de la planta intacta; y se secaron a la sombra en una habitación ventilada sobre papel periódico, aproximadamente por diez días, para su posterior reducción de tamaño de partículas haciendo uso de un molino, hasta obtener un polvo fino (Anexo 3).

### Preparación del extracto hidroalcohólico

Se sometió a maceración un kilogramo de polvo fino de muestra, en frascos de color ámbar durante una semana aproximadamente en tres litros de alcohol de 70° el mismo que la cubrió por completo. Durante el macerado el frasco se agitó periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Una vez obtenido el extracto se procedió a la percolación, filtración y a continuación se concentró en el rota vapor a una temperatura de 40 °C y se secó en una estufa a una temperatura de 40 °C, bajo especificaciones y procedimientos que exige dicha marca. Una vez obtenido el extracto concentrado, se envasó en un frasco de vidrio color ámbar, herméticamente cerrado, y se conservó en la refrigeradora hasta su empleo.

### Tamizaje fitoquímico

Las reacciones se realizó mediante coloración de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico, se realizó siguiendo los procedimientos establecidos<sup>15</sup> (Anexos 4 y 9).

### Determinación de la actividad antioxidante mediante secuestro del radical libre (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), DPPH.<sup>1</sup>

**Fundamento:** Consiste en determinar la pérdida de la coloración violeta intensa de DPPH, cuando éste es capturado por un antioxidante reduciéndose a DPPH-H dando una coloración amarilla.

### Procedimiento:

1. Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l
2. Se preparó una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A)

3. Se calibró el espectrofotómetro a cero con una solución blanco de metanol: agua (2:1)

4. Se preparó un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) y 1,5 ml de metanol

5. Se preparó un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH y 0.75 ml de agua destilada

6. Luego se procedió a preparar la muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml. Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura de las absorbancias a  $\lambda$ : 517 nm en el espectrofotómetro

7. Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra

8. Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una concentración final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C)

9. Con las soluciones B y C se procedió igual a los puntos 6 y 7

Para la comparación, el estándar ácido ascórbico y el ácido tánico se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml. Los extractos fueron evaluados por triplicado a diferentes concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml. Utilizando como estándar ácido ascórbico y ácido tánico.

Posteriormente con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de captación de radicales libres DPPH, mediante la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{(A_m - A_b)}{A_c} \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia del DPPH

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco de la muestra

%AA: Porcentaje de captación del radical libre.

### Determinación de la actividad hipoglucemiante

#### Preparación del aloxano

Se preparó una solución al tres por ciento de aloxano (Sigma-Aldrich), disuelto en 50 ml de agua destilada, de esta solución madre se tomaron, para su administración, dosis correspondientes de 150 mg/kg de peso.

#### Preparación del estándar

Se preparó una solución de glibenclamida 5 mg (Laboratorio IQfarma) disuelto en 10 ml de agua destilada, para su administración se tomó dosis correspondientes a 5 mg/kg de peso.

#### Preparación de la muestra

Se preparó una solución acuosa al tres por ciento del extracto hidroalcohólico concentrado, de esta solución madre se tomaron, para su administración, dosis correspondientes a 100, 200 y 400 mg/kg.

### Método de inducción de diabetes con aloxano.<sup>2,3</sup>

**Fundamento:** El aloxano es una sustancia química que inyectado en los animales genera diabetes mellitus por destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas endocrino debido a la producción de radicales libres.

#### Procedimiento:

- Los animales fueron aclimatados en jaulas especiales con acceso a agua, alimento estándar y a temperatura ambiente (21 $\pm$  1 °C) y 50 – 60 % de humedad con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad
- Luego de pesar a los animales se les administró por vía intraperitoneal solución de aloxano a 150 mg/kg
- Debido a que el aloxano es capaz de producir hipoglucemia letal, como resultado de la liberación de insulina pancreática masiva, las ratas fueron tratadas con solución de glucosa al 20 %, 10 ml en sus respectivos bebederos después de seis horas de la administración del aloxano monohidratado
- Luego de 24 horas se realizó la confirmación de la hiperglucemia. Los animales que presentaron glucemia superior a 200 mg/dl fueron incluidos en el estudio
- Los niveles de glucosa en sangre se determinó usando glucómetro ACCU - CHECK® Perfoma Nano
- 12 horas antes de la administración de los tratamientos, los animales fueron sometidos en ayuno con agua *ad libitum*.
- Las ratas son distribuidas aleatoriamente en seis grupos de cinco cada uno
- Se realizaron las mediciones de glicemia a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas posteriores a la administración de los tratamientos

Las muestras de sangre de los animales fueron colectadas de la vena caudal de la cola, la glucosa se determino por el método de la glucosa oxidasa con tiras reactivas del glucómetro, los valores de la glucemia se midió en mg/dl y el porcentaje de la actividad hipoglucemiante fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad hipoglucemiante} = \frac{\text{Control} - \text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100$$

#### Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó es completamente randomizado. Las concentraciones elaboradas fueron sometidas a la actividad hipoglucemiante, los animales de experimentación fueron divididas de manera aleatoria en seis grupos cada uno cinco repeticiones para cada grupo:

- Grupo I : Blanco (SSF 1,ml/kg)
- Grupo II : Control (aloxano 150 mg/kg).
- Grupo III : Aloxano 150 mg/kg + extracto a dosis de 100 mg/kg

- Grupo IV : Aloxano 150 mg/kg + extracto a dosis de 200 mg/kg
- Grupo V : Aloxano 150 mg/kg + extracto a dosis de 400 mg/kg
- Grupo VI : Aloxano 150 mg/kg + glibenclamida a dosis de 5 mg/kg estándar

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresan en gráficos. Se halló las medias  $\pm$  desviación estándar en cada uno de los ensayos de actividad antioxidante e hipoglucemiante. Para la actividad antioxidante se determinó el ANOVA para ver las diferencias entre el ácido ascórbico, ácido tánico y el extracto, así mismo, entre las tres concentraciones ensayadas de cada uno de ellos, para la actividad hipoglucemiante se determinó el ANOVA para ver las diferencias entre el estándar glibenclamida y las dosis del extracto hidroalcohólico con un nivel de significación estadística de 0,05. Las comparaciones se hacen entre cada tratamiento a través de la Prueba de Tukey el análisis estadístico se realizó utilizando el soporte informático SFSS, versión 21.

#### RESULTADOS

*Cassia alata* L “mutuy” es una planta medicinal que constituye una fuente natural importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas de interés por la gran variedad de compuestos que sintetiza, desde hace mucho tiempo los extractos naturales son utilizados con propiedades terapéuticas de gran importancia para el control de muchas enfermedades en humanos<sup>22</sup>

Tabla 3. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico

| Metabolitos secundario        | Reactivos y/o reacciones | Resultados |
|-------------------------------|--------------------------|------------|
| Fenoles y/o taninos           | Tricloruro férrico       | ++         |
| Flavonoides                   | Shinoda                  | +++        |
| Triterpenoides y/o esteroides | Liebermann               | +++        |
| Azúcares reductores           | Fehling                  | ++         |
| Alcaloides                    | Dragendorff              | ++         |
|                               | Wagner Mayer             | ++         |
| Quinonas                      | Borntrager               | ++         |
| Catequinas                    | Catequinas               | +          |
| Antocianinas                  | Antocianidina            | +          |
| Saponinas                     | Espumas                  | +          |

Escasa(+), regular(++) y abundante(+++)

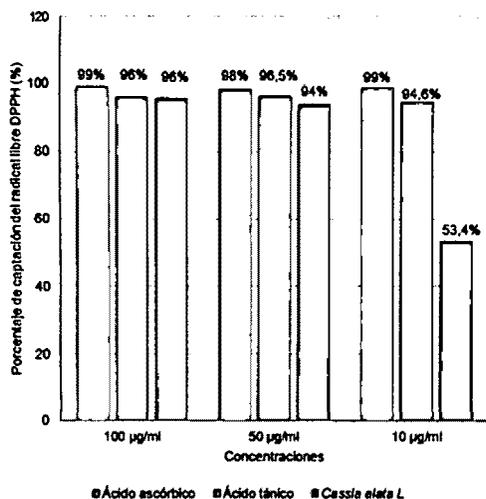


Figura 2. Porcentaje de captación del radical libre DPPH del extracto hidroalcohólico según concentraciones

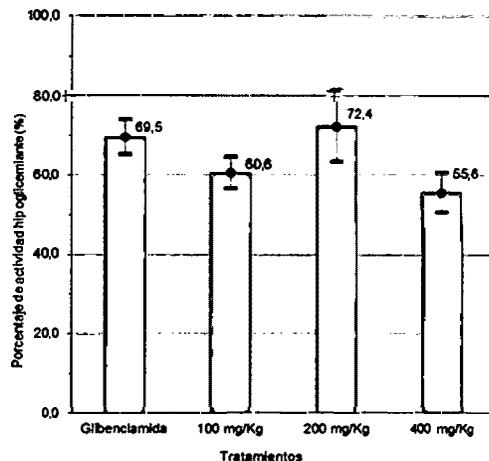


Figura 4. Porcentaje de actividad hipoglucemiante de los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy"

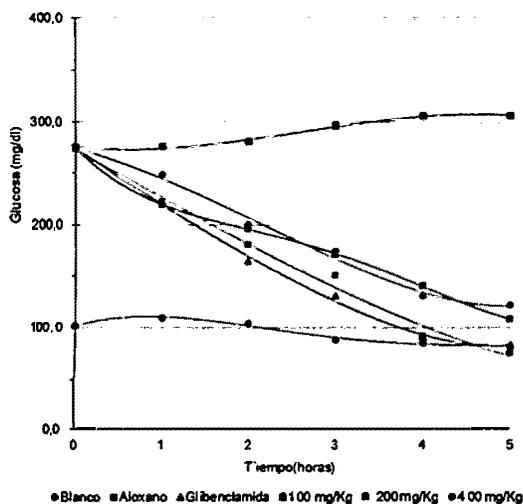


Figura 3. Variación de los niveles de glucosa sanguínea en ratas Holtzman en función del tiempo

## DISCUSIÓN

*Cassia alata* L "mutuy" es una plantas medicinal que constituye una fuente natural importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas de interés por la gran variedad de compuestos que sintetiza, desde hace mucho tiempo los extractos naturales con propiedades terapéuticas ha sido de gran importancia para el control de muchas enfermedades en humanos.<sup>16</sup>

La Tabla 3, muestra los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" como: taninos, polifenoles, triterpenos, esteroides, flavonoides, azúcares reductores, alcaloides, quinonas, catequinas, antocianinas y saponinas; los resultados fueron corroborados con el tamizaje fitoquímico realizado por Barrese,<sup>17</sup> donde reporta la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas quinonas y triterpenos en el extracto acuoso de las hojas de *Cassia alata*. Fernand,<sup>18</sup> reporta en el extracto hidroalcohólico la presencia de alcaloides, triterpenos y/o esteroides, quinonas, taninos, azúcares reductores, saponinas de *Cassia alata* L "mutuy".

Lo que más destaca del tamizaje fitoquímico es la presencia de flavonoides produciendo coloración rojo vino en la fase amilica y triterpenos y/o esteroides, dando coloración verde intensa, se comprobó la alta diversidad de compuestos químicos presentes en la especie bajo estudio, lo que fundamenta su empleo en la cura de diversas afecciones, los resultados obtenidos fueron similares a otros reportes científicos y la literatura revisada.<sup>19</sup>

La Figura 2, muestra los resultados del porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico, todas las muestras fueron activas al decolorar el DPPH, con un porcentaje de captación del radical libre en 95,8 %, 94 % y 53,4 % a concentraciones de 100, 50 y 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Los resultados fueron comparados con los estándares ácido ascórbico, que mostró tener actividad en un 99,1 %, 98,4 % y 99 % a concentraciones de 100, 50 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ; de igual manera el ácido tánico posee actividad secuestradora del radical libre DPPH con un porcentaje de 96,2 %, 96,5 % y 94,6 % a concentraciones de 100, 50 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , encontrándose resultados similares a otros reportes científicos.<sup>17,20</sup> Es importante recalcar que la actividad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto y del microambiente en el que se encuentra el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios, los flavonoides se encuentran en los vegetales y se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes con capacidad para neutralizar los radicales libres responsables de determinadas patologías o del agravamiento de las mismas, cuando los flavonoides tienen orto sustituciones en anillo A o B, son estructuras que tienen una buena acción inhibitoria de la formación del radical hidroxilo,<sup>21,22</sup> entonces la actividad antioxidante depende de la estructura química, posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide.<sup>23</sup> Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos para ( $p \leq 0,05$ ); Como se observa en el Anexo 15.

La Figura 3, muestra la variación de los niveles de glucosa sanguínea en función del tiempo como resultado del proceso metabólico normal de las unidades de experimentación, luego de haber producido una hiperglucemia. Así mismo, se muestra que las unidades de experimentación llegan a su estado basal de glucosa en lapso de cinco horas. Este dato es muy importante porque nos permite comparar el efecto hipoglucemiante del extracto y el estándar, por presentar semejanzas clínicas e histopatológicas con la diabetes mellitus humana, el modelo experimental de diabetes inducida a ratas con aloxano han sido ampliamente utilizadas por investigadores en todo el mundo,<sup>24</sup> en el presente estudio se optó por el método químico de supresión endocrina del páncreas, los cuales exhiben todos los eventos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción del estado diabetogénico,<sup>25</sup> el aloxano inyectado en animales de experimentación, genera diabetes mellitus por destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas endocrino debido a la producción de radicales libres, designados en su mayoría especies de oxígeno reactivo (ROS), a la vez afecta la actividad de la glucoquinasa reduciendo la concentración del transportador de la glucosa

(GLUT2) y del ARNm de la glucoquinasa 2 con acción a nivel nuclear DNA y/o mitocondrial.<sup>26</sup> Estudios demuestran amplia variación en la dosis y vía de administración del aloxano en la inducción de diabetes mellitus experimental, que por vía intravenosa se han empleado dosis de 40 mg/kg,<sup>27</sup> 100 mg/kg,<sup>28</sup> 50 mg/kg,<sup>29</sup> 42 mg/kg en solución acuosa al 2 %, <sup>25</sup> por vía subcutánea 175 mg/kg,<sup>30</sup> por vía intraperitoneal dosis de 200 mg/kg por medio de ayuno puede reducirse hasta 150 mg/kg que es la dosis diabetógena por vía intraperitoneal,<sup>31</sup> 100 mg/kg en buffer citrato pH 4.75.<sup>32</sup> Cualquiera que sea la vía de administración las dosis diabetógenas siempre alteran en igual forma la glucosa sanguínea, inicialmente hay hiperglucemia, después hipoglucemia y finalmente aparecen la hiperglucemia diabética tercera y última fase consecutiva a la administración del aloxano y secundaria a la destrucción de los islotes de Langerhans que se debe a la exagerada gluconeogénesis, en el presente estudio se utilizó dosis de 150 mg/kg de aloxano diluidas en agua destilada estéril por vía intraperitoneal 24 horas antes, los animales estuvieron en ayunas 12 horas. El aloxano agente diabetógeno con toxicidad selectiva sobre las células  $\beta$  pancreáticas, generan peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo que se acumula produciendo luego fragmentación del DNA; daño que no alcanza a ser reparado por las células  $\beta$ , llevando así a su destrucción.<sup>32</sup> Así mismo, los animales diabéticos además de presentar hiperglucemia se caracterizaron por olor fuerte en la orina, aumento en el volumen de orina, caída de pelos, pérdida de peso y debilidad general, otros autores también mencionan el mismo fenómeno.<sup>25</sup> El síndrome clínico de la diabetes mellitus es caracterizada por disturbios continuos del metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y varias alteraciones tisulares, provocadas por deficiencia de la insulínica, siendo caracterizada por hiperglucemia, glicosuria, y presenta cuadro clínico de poliúrea, polidipsia y polifagia,<sup>33</sup> en el ensayo experimental de diabetes mellitus tipo 1 se muestra evidencias que existe actividad hipoglucemiante por la administración del extracto, las elevadas concentraciones de glucosa sanguínea pueden aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), por diferentes vías. Aumentando la formación de los productos de glicosilación avanzada (PGA); activando a la proteína quinasa C (PQC); disminuyendo el NADPH,  $\text{H}^+$  intracelular; activando la posición de ROS en la mitocondria,<sup>8</sup> la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico fue con descenso gradual de la glucosa plasmática conforme avanzan las horas, estos resultados son compatibles con otros estudios científicos,<sup>34</sup> el estrés oxidativo y el desequilibrio entre formación de radicales libres derivados del oxígeno o del nitrógeno y su degradación, juega un

papel relevante en el desarrollo de la insulinorresistencia. El incremento en radicales libres en estado prediabético se debe a la abundancia de ácidos grasos que causan alteraciones mitocondriales a través de una mayor beta oxidación.<sup>35</sup>

La Figura 4 muestra los resultados del porcentaje de actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico que fue similar al estándar, el mecanismo de acción por el cual ciertas especies vegetales disminuyen la glucosa sanguínea puede ser atribuido a los siguientes factores: aumento de la liberación de insulina a través de la estimulación de las células  $\beta$ -pancreáticas, resistencia a las hormonas que aumentan el nivel de glucosa, aumento de la sensibilidad de los receptores de insulina, disminución de gluconeogénesis, aumento del consumo de glucosa en tejidos y órganos, eliminación de radicales libres, resistencia a la peroxidación lipídica y la corrección del desorden metabólico en lípidos y proteínas,<sup>36</sup> el extracto hidroalcohólico presenta actividad hipoglucemiante, estadísticamente es significativa como se muestra en los Anexos 17 y 18, el porcentaje de la actividad hipoglucemiante de los tratamientos a cinco horas fue en un 72,4 %, para dosis de 200 mg/kg, 69,5 % para el estándar, 60,6 % y 55,6 % para dosis de 100 y 400 mg/kg. Es muy probable que los flavonoides sean responsables de esta actividad hipoglucemiante,<sup>36</sup> ya que participan en las etapas iniciales de acción de la insulina en el hígado y músculos de ratas in vivo, uno de sus mecanismos de acción es que se ligan a receptores de insulina,<sup>37</sup> potencializando las actividades de la enzima tirosina quinasa de los receptores de insulina,<sup>38</sup> esta enzima es fundamental para los efectos biológicos de la insulina para reducir la glucemia, el mecanismo exacto de acción sólo se puede explicar cuando los principios activos se encuentren aislados y se analicen en relación a esta actividad, los flavonoides son apreciados por su amplia actividad farmacológica pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN, quelar iones metálicos transitorios, tales como hierro, cobre y zinc, catalizan el transporte de electrones y depurar radicales libres debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal, duodenal e inflamaciones, los antioxidantes actúan en tres aspectos que se hayan alterado en la diabetes como la función endotelial, las moléculas pro inflamatorias y el estrés oxidativo generado por el aumento de ROS.<sup>39</sup> 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 (superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (Gpx) y glutatión reductasa, sustancias naturales con efecto antioxidante como la vitamina C, E, enzimas reparadoras de ADN), como consecuencia hay una modulación negativa de la actividad biológica del óxido nítrico (NO).<sup>40, 29</sup>

Los flavonoides desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, sus propiedades antirradicalarias se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidróxido y superóxido, especies altamente reactivas, de esta manera bloquean la acción de dichas sustancias sobre las células.<sup>41</sup> Entonces podría pensarse que la acción de *Cassia alata* L en la reducción de los niveles de glucemia sea por la presencia de flavonoides, sin excluir los demás compuestos que también protegen de las complicaciones producidas por la diabetes, desde el punto de vista químico este estudio sería la antesala al aislamiento del sistema de flavonoides presentes en la planta y comparar la bioactividad de estos metabolitos aislado con el extracto crudo, un antioxidante debe ser capaz de reaccionar fácil y específicamente con un radical libre, neutralizando e impidiendo el daño oxidativo a las macromoléculas biológicas.<sup>42</sup>

#### CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" presenta metabolitos secundarios como taninos, polifenoles, triterpenos, esteroides, flavonoides, azúcares reductores, quinonas, alcaloides, catequinas, antocianinas y saponinas.
2. El porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cassia alata* L "mutuy" fue de 95,8 %, 94 % y 53,4 % de actividad a concentraciones de 100, 50 y 10  $\mu$ g/ml. Respecto a los estándares ácido ascórbico, que mostró tener actividad en un 99,1 %, 98,4 % y 99 % a concentraciones de 100, 50 y 10  $\mu$ g/ml; de igual manera el ácido tánico posee actividad secuestradora del radical libre DPPH con un porcentaje de 96,2 %, 96,5 % y 94,6 % a concentraciones de 100, 50 y 10  $\mu$ g/ml. Por ende, el extracto hidroalcohólico posee capacidad secuestradora del radical libre.
3. La dosis con mejor actividad hipoglucemiante fue a 200 mg/kg, dicha actividad fue similar al estándar.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar Enrique JF. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilaxnthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría]. Lima. Servicio de publicaciones e intercambio científico; UNMSM; 2007.

2. Kameswara R. Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cimbalaria* Hook. Fruit in alloxan diabetic rats. *Journal Ethnopharmacology* [revista en internet]. 1999 [acceso, 02 de Octubre de 2012]. 67:103-109; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199000045>
3. Palomino C. Efecto del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. "guanábana" sobre la hiperglucemia inducida con aloxano en ratas. [Tesis de Maestría]. Lima: servicio de publicaciones e intercambio científico; UNMSM; 2007.
4. Sanabria O, Macías D, Ramírez B, Ramírez H, Varona G. Productos forestales no maderables en los resguardos de Guanguñi y Calle Santa Rosa, Pacífico Caucaño. Colombia: Universidad del Cauca; 2012.
5. Lagos G, Cediel V, Villegas S. Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en pacientes VIH positivos y donantes voluntarios de sangre revista médica de Risaralda [revista en internet]; 2012. [acceso, 16 de Marzo de 2013]; 18(1):54-62. Disponible en: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3302/1/V18N1A9.pdf>
6. Dolores M, Fernández F, Tuneu L. Guía de seguimiento Farmacoterapéutico sobre diabetes. *Revista médica* [revista en internet]. 2011 [acceso, 14 de Marzo de 2013]; 1-64. Disponible en: [http://ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/GUÍA\\_DIABETES.pdf](http://ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/GUÍA_DIABETES.pdf)
7. Stephen J, Mcphee M, Maxine A, Papadakis M. Diagnóstico clínico y tratamiento. 49ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2010.
8. Díaz A. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* [revista en internet]. 2006 [acceso, 12 de Marzo de 2013]; 25(3). Disponible en: [http://www.scielo.sld.cu/cielo.php?pid=S086403002006000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sld.cu/cielo.php?pid=S086403002006000300009&script=sci_arttext)
9. García C, Díaz M, Morales F. Determinación de las especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus insulino dependiente. Centro de Investigación y desarrollo de Medicamentos [revista en internet]. 2005 [acceso, 18 de Marzo de 2013]; 21(2):145-148. Disponible en: <http://www.sediabetes.org/resources/revista/00011415archivoarticulo.pdf>
10. Quintanar MA, Calderón JV. La capacidad antioxidante total: Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica* [revista en internet]. 2009 [acceso, 10 de Marzo de 2013]; 28(3):89-101. Disponible en: [http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB/REB/2009/Septiembre/g\\_3erArticulo.pdf](http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB/REB/2009/Septiembre/g_3erArticulo.pdf)
11. Untiveros C, Nuñez O, Tapia L, Tapia G. Complicaciones tardías en diabetes mellitus tipo 2 en el Hospital II ESSALUD. *Revista médica herediana* [revista en internet]. 2004 [acceso, 10 de Marzo de 2013]; 15(2):64-69. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v15n2/v15n2a01.pdf>
12. Pérez A, Lora S, Inclán A. Prediabetes: Antesala de La diabetes sacarina de tipo 2. *Revista Cuba MEDISAN* [revista en internet]. 2010 [acceso, 20 de Marzo de 2013]; 14(2):262. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v14n2/san18210.pdf>
13. Robert B, Raffa P, Scott M, Rawls P, Portyansky, E. Netter. *Farmacología ilustrada*. España: Elsevier, 2008.
14. Villar del Fresno A. *Farmacognosia General*. España: Síntesis S.A; 1999.
15. Miranda M, Cuellar A. *Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales*. Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana; 2000.
16. Mostacero J, Mejía F. *Taxonomía de fanerógamas peruanas*. Perú: Libertad EIRL Trujillo; 1993.
17. Barrese Y, Hernández M. Tamizaje fitoquímico de la droga cruda y extracto fluido de la *Guacamaya francesa*. *Revista Plant Med* [revista en internet]. 2002 [acceso, 01 de Noviembre de 2012]; 7(3):129-130. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla09205.pdf>
18. Fernand V, Dinh D, Washington S, Fakayode S, Losso J, Ravenswaay R, *et al.* Determination of Pharmacologically Active Compounds in Root Extracts of *Cassia alata* L by use of High Performance Liquid Chromatography. *National Institutes of Health Talanta* [revista en internet]. 2008 [acceso, 03 de Febrero de 2013]; 74(4):896-902. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276639/pdf/nihms38701.pdf>
19. Elakkia S, Venkatesalu. Antimicrobial activity of different solvent extracts of some *Cassia* species. *Revista internacional Journal of Pharmaand Bio Sciences* [revista en internet]. 2013 [acceso, 20 de Mayo de 2013]; 4 (3):728-736. Disponible en: [http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/2593\\_pdf.pdf](http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/2593_pdf.pdf)
20. Saito S, Silva G, Regineide X, Gosmann G, Pungartnik C, Brendel M. Astragalin from *Cassia alata* Induces DNA Adducts in Vitro and Repairable DNA Damage in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences* [revista en internet]. 2012 [acceso, 25 de Marzo de 2013]; 13:2846-2862. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317691/pdf/ijms-13-02846.pdf>
21. Gola G. *Tratado de Botánica* 2ª ed. Barcelona-España: Labor S.A; 1965.

22. Martínez S, Gonzales J, Culebras M, Tuñón M. los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Revista nutrición hospitalaria [revista en internet]*. 2002 [acceso, 25 de Marzo de 2013]; 27(6):271-279. Disponible en: [http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002\\_los\\_flavonoidesn\\_propiedades\\_y\\_acciones\\_antioxidantes.pdf](http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002_los_flavonoidesn_propiedades_y_acciones_antioxidantes.pdf)
23. Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod [revista en internet]*. 2000 [acceso, 09 de Enero de 2013]; 63(7):1035-1042. Disponible en: [http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/\(Pietta%20P-G2000\).Pdf](http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/(Pietta%20P-G2000).Pdf)
24. Tasayco N. Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* "yacon" en ratas con diabetes tipo 1 y 2 [Tesis de Maestría]. Lima. UNMSM; 2007.
25. Masson M, Tadeu C, Martins J, Artioli S, Padovani C. Caracterizacao de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta cirúrgica Brasileira [revista online]*. 2003 Mar-Abr; 18(2). Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n2/15197.Pdf>
26. Howland B, zebrowski E. Hyposecretion of gonadotrophins in alloxan treated male rats. *J. reprod. Fert. [revista en internet]*. 1972 [acceso, 18 de Enero de 2013]; 31:115-118. Disponible en: <http://www.reproduction-online.org/content/31/1/115.full.pdf+html>
27. Mello M, Luciano E. Effects of protein malnutrition on glucosa tolerance in rats with alloxan-induced. *Braz. J. Med. [revista en internet]*. 1995 [acceso, 21 de Enero de 2013]; 467-470. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8520544>
28. Yegen E, Akcay F, Yigitoglu M. Plasma atrial natriuretic peptide levels in rabbits with alloxan monohydrate-induced diabetes mellitus. *J Japan Heart [revista en internet]*. 1995 [acceso, 10 de Marzo de 2013]; 789-795. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627984>
29. Bustamante S, Muñoz J, Figueroa H, Morales M. bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. *Revista de fitoterapia SEFIT [revista en internet]*. 2003 [acceso, 17 de Marzo de 2013]; 3(2):135-144. Disponible en: [http://www.fitoterapia.Net/pdf\\_3\\_2/03/](http://www.fitoterapia.Net/pdf_3_2/03/)
30. Gutierrez N, Gonzales M. Diabetes aloxánica en la rata blanca. *Revista hispanoamericana de ciencias puras y aplicadas [revista en internet]*. 1953 [acceso, 28 de Mayo de 2013]; 13(4): 85-96. Disponible en: [http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ciencia/1953\\_13\\_04-06-z2.pdf](http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ciencia/1953_13_04-06-z2.pdf)
31. Kodama T, Iwase M, Nunoi K. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. *J. Diabetes Res Clin Pract, Ireland [revista en internet]*. 1993 [acceso, 28 de Mayo de 2013]; 20(3):183-189. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016882279390076H>
32. López G, Ventura P, Rodríguez R, Casas B, Hernández P, Arias G. Efectos de un extracto hidroalcohólico de *Bidens alba* en ratas normales y con diabetes aloxánica. *Acta Farm. Bonaerense*. 2001; 20(2): 89-93. Disponible en: [http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/2/LAJOP\\_20\\_2\\_1\\_1\\_969WQFE L19.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/2/LAJOP_20_2_1_1_969WQFE L19.pdf)
33. Ardvinio F. *Diabetes Mellitus 6<sup>a</sup> ed.* Río de Janeiro: Guanabara Koogan 1980.
34. Aybar M, Riera A, Grau A, Sánchez S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacón) leaves in normal and diabetic rats *Journal of Ethnopharmacology*. 2001. 74(2):125-132. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167030>
35. Arola L, Arroyo E, Baijes I, Bermejo M, Boada J, Belmonte S, Bellmunt M, et al. *Genética, Nutrición y Enfermedad*. España: EDIMSA; 2008.
36. Negri G. Diabetes mellitus: plantas y principios activos naturales hipoglicemiantes. *Journal of Pharmaceutical Sciences Brazilian [revista en internet]*. 2005 [acceso, 25 de Noviembre de 2012]; 41(2):121-142. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n2/28034.pdf>
37. Cheeke P. *Alimentación y nutrición*. España: Academia Press Isla de Mallorca; 1987.
38. Agullo G, Gamet L, Viala C, Rémesy C, Chap H. Relationship between flavonoids structure and inhibitions of phosphatidylinositol 3 Kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase on inhibition. *Biochem pharmacol [revista en internet]*. 1997 [acceso, 20 de Mayo de 2013]; 53: 1649-1657. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9264317>
39. Hernandez P. Líneas de defensa contra la producción de radicales libres en diabéticos con retinopatía. *Revista de Ciencia y tecnología en salud visual y ocular [revista en internet]*. 2005 [acceso, 17 de Abril de 2013]; 5:59-69. Disponible en: [http://www.siben.net/archivos/seguisiben/guiaseg\\_esp.pdf](http://www.siben.net/archivos/seguisiben/guiaseg_esp.pdf)
40. Cruz J, Licea M, Hernández P, Enrique A, Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev. Mex Patol Clin [revista en internet]*. 2011 [acceso, 05 de Abril de 2013]; 58(1):4-15. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2011/pt111b.pdf>
41. Han R, Zhang J, Skibsted L. *Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids*.

- Journals of Molecules Scientific [revista en internet]. 2012 [acceso, 26 de Mayo de 2013]; 17:2140-2160. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/2/2140/pdf>
42. Dragan A, Dusanka D, Drago B, Nenat T. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta* [revista en internet]. 2003 [acceso, 28 de Mayo de 2013]; 76(1):55-61. Disponible en: <http://www.hrcaik.srce.hr/file/pdf>