



1 INFORMACION GENERAL

1.1 TITULO DEL PROYECTO

SEGURIDAD Y EFECTO SINÉRGICO DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DEL *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) Y DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS SEMILLAS DEL *Vitis vinífera* (Uva) EN RATAS CON INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

1.2 AUTORES DEL PROYECTO

- Dr. Q.F. Vilchez Cáceda Héctor (Secretario Academico)
- Q.F. Pineda Pérez Neuman Mario
- Dra. Laura Villanueva Blas
- Mg. Tasayco Yataco Nesquen
- Mg. Jacinto Hervias Pedro
- Q.F. Ninantay De La Vega Florencio
- Q.F. Flores López Óscar

1.3 FACULTAD

Ciencias Farmaceuticas y Bioquimica

1.4 LINEA DE INVESTIGACION

Productos Naturales

1.5 CODIGO CTI

0401 0005 - Bioprospección de compuestos activos con aplicaciones en salud, procesos industriales y otros.

1.6 LUGAR EJECUTIVO

Laboratorios de Especialidad de la Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

2 RESUMEN EJECUTIVO

Objetivo: El objetivo fue determinar en qué medida el extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) y el extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinífera* (Uva) es segura y eficaz en el efecto sinérgico frente a la actividad hipoglucemiante en ratas con inducción experimental de diabetes mellitus tipo 2.

Material y Método: La seguridad en animales vía oral se realizó a dosis única en ratones albinos y a dosis repetidas durante 28 días en ratas Holtzman. La inducción de diabetes mellitus tipo 2 a ratas se realizó con el aloxano a dosis única de 100 mg/kg de peso.



Resultados y Discusión: Los resultados indicaron una dosis letal 50 (DL₅₀) por encima de los 2000 mg/kg para ambos extractos por lo que son sustancias no tóxicas y; en el ensayo de toxicidad a dosis repetidas, se hallaron ligero incremento de Alaninoaminotransferasa, no se encontraron lesiones microscópicas ni macroscópicas relacionados con los tratamientos.

En el ensayo sobre la diabetes mellitus tipo 2, los grupos de glibenclamida, Yacón, uva y la sinergia de Yacón + uva disminuyeron la glucemia, siendo significativo comparado con el grupo control positivo SSF ($p < 0.05$). La sinergia de los extractos de Yacón + uva representa mayor disminución de la glucemia ($p < 0.05$). El posible mecanismo de acción de la sinergia de los extractos es que mejoraría la secreción de insulina por el páncreas.

Conclusiones: En las condiciones experimentales la sinergia de los extractos hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) y el extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinífera* (Uva) ha evidenciado ser segura y tener efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas inducidas por aloxano.

3 PALABRAS CLAVES

Smallanthus sonchifolius, *Vitis vinífera*, diabetes mellitus, aloxano, dosis letal.

4 INTRODUCCION

La diabetes mellitus es un trastorno heterogéneo definido por la presencia de hiperglucemia. La hiperglucemia en todos los casos se debe a una deficiencia funcional de acción de la insulina. La acción deficiente de la insulina puede deberse a una disminución de su secreción por las células beta del páncreas, una reducción en la respuesta de tejidos blanco a la insulina (resistencia a la insulina), o un aumento en las hormonas contra reguladoras que se oponen a los efectos de la insulina¹.

La insulina es una hormona proteica segregada, en el hombre y los mamíferos, por las células beta de los islotes de Langerhans² se encarga de controlar la captación, utilización y almacenamiento de nutrientes por las células³ su estructura molecular está compuesta por dos cadenas polipeptídicas: alfa con 21 aminoácidos y beta con 30 aminoácidos unidos por puentes disulfuro⁴. La liberación de insulina a la sangre para ejercer su acción endocrina se produce principalmente como respuesta al aumento de glucosa en la circulación. Su concentración en sangre es de 0.4 ng/ml. Después de comidas ricas en carbohidratos, esta cifra puede aumentar 3 a 4 veces, la vida media de la insulina en sangre es de 3 a 4 minutos.

Diariamente el páncreas segrega a la sangre 1 a 2 mg de insulina².

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) hace parte de un grupo de desórdenes heterogéneos que comparten el fenotipo de hiperglucemia y son causados por una interacción de factores genéticos, ambientales y estilos de vida⁵.



Diferentes entidades mundialmente reconocidas en el estudio y seguimiento de la DM2, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF), consideran esta enfermedad como una pandemia por la alta tasa de incidencia; sin embargo, algunos estudios europeos y norteamericanos han demostrado la presencia de diabetes no diagnosticada en cerca de 50% de pacientes declarados como sanos⁶. Para el año 2011 se reportaron entre 346 (OMS) y 366 (IDF) millones de pacientes afectados por DM2, aproximadamente 6.4% de la población mundial, con una estimación para 2030 de 552 millones de personas afectadas⁷.

Para el tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2, los fármacos clásicos son las sulfonilureas y la metformina, pero estos fármacos no han logrado detener la progresión de la diabetes tipo 2, de esto se deduce la necesidad de desarrollar nuevos fármacos, es así que progresivamente en los últimos años se han desarrollado las tiazolidinedionas, inhibidores de dipeptidilpeptidasa 4 (iDPP- 4) y los inhibidores del SGLT-2 (1). En la actualidad se buscan y ensayan diversos estrategias médicas mediante una combinación de la dieta, educación, ejercicio físico, inmunoterapia, incluso trasplantes pancreáticos; no obstante la investigación está orientada principalmente en la obtención de nuevas drogas hipoglucemiantes que puedan ayudar al control de la diabetes⁸.

A nivel mundial, existen plantas de uso tradicional de las cuales se ha reportado algún efecto hipoglucemiante: la *Musa sp.* y la *Bidens spp.* son usadas en el Caribe y el Perú; el *Rubus sp.* es usado en Nepal; las moras (*Morus sp.*) se usan en el Mediterráneo y la *Mimosa sp.* es usada en la India⁹.

Esta información es importante, porque puede ser el inicio para el desarrollo de nuevos fármacos. También hay información de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes en el Perú, dentro de estas plantas está el *Geranium ayavacense*¹⁰.

El *Geranium ayavacense* Willd, es una planta de la sierra que pertenece a la familia Geraniaceae, tradicionalmente se ha reportado que la flor y raíz tienen efecto hipoglucemiante y astringente, así también, es útil en el tratamiento de estomatitis ulcerosa, la gastritis, la gingivitis y lesiones gástricas¹¹.

Las plantas medicinales con actividad antidiabética, pueden constituir una fuente importante de nuevos compuestos orales hipoglicemiantes, ya sea como compuestos de primera línea, en el tratamiento de la diabetes, o como coadyuvantes de las terapias existentes^{12,13}. Para ello es muy importante, validar científicamente la efectividad y la seguridad (relativa inocuidad) de estas plantas como son, el Yacón y la Uva, para garantizar su uso, a bajo costo, por la población de pacientes diabéticos; lo que justifica, la realización de estudios de este tipo. La asociación conocida del estrés oxidativo a enfermedades metabólicas como diabetes mellitus, degenerativas, como el cáncer y otras como las enfermedades cardiovasculares, estimulan la investigación de compuestos, fármacos y alimentos con capacidad antioxidante, a partir de diversos productos naturales, tales como la uva y sus derivados¹⁴.



Las uvas y vinos contienen una gran variedad de compuestos fenólicos, de muy diversas estructuras químicas y pesos moleculares, cuya cantidad total y la proporción en que aparecen dependen de una serie de factores, como la variedad de la uva, el área de producción, la climatología, las técnicas agrícolas, los métodos de vinificación, el procedimiento de prensado de la uva y el tiempo de fermentación del mosto con la piel y las semillas. Los compuestos fenólicos de la uva se localizan en las partes sólidas: cáscara, semilla y tejido vascular. En la pulpa, destaca la presencia de ácidos fenólicos y sus derivados. Los flavonoles y antocianos se encuentran localizados en las células de la cáscara de la uva, siendo estos últimos responsables del color rojo de los vinos tintos. Las procianidinas y flavanoles se localizan en las semillas de las uvas. En los vinos blancos, los fenoles mayoritarios son aquellos procedentes de la pulpa, mientras que en los tintos, la maceración alcohólica de los hollejos y las semillas permite la liberación y solubilización de los flavonoides¹⁵.

La protección del organismo frente al estrés oxidativo es natural, pero se encuentra relacionada a las moléculas que se ingiere en la dieta y las cáscaras y semillas de la uva; al tener entre sus componentes sustancias antioxidantes, pueden ser una alternativa de protección natural. La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura. Además de su actividad antioxidante, se ha atribuido las siguientes propiedades biológicas a los compuestos fenólicos: indica que estos compuestos inhiben la agregación plaquetaria; indican su función como agentes vasodilatadores, antiinflamatorios y anticancerígenos¹⁶.

Los radicales libres (RL) son moléculas que se derivan del oxígeno, están en continua formación en las células del organismo y en pequeñas cantidades no producen efectos tóxicos. En situación normal, la producción de radicales libres es constante en una concentración determinada y son neutralizados por las defensas antioxidantes, que pueden ser sustancias propias del organismo (las enzimas antioxidantes) o pueden ser sustancias presentes en algunos alimentos, como la vitamina C, vitamina E, el beta caroteno, flavonoides, entre otros¹⁷.

Entre los componentes de las cáscaras y semillas de la uva se encuentra el resveratrol, que es un antioxidante natural; previene los cambios bioquímicos en ratas, señalando además que en los animales de experimentación se recupera la actividad de las especies del óxido nítrico, potente mediador del bienestar cardiovascular, y mejoran los niveles de peroxidación lipídica¹⁸.

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las semillas. Su concentración es baja en la pulpa. Esto explica por qué el vino blanco, que no se hace con la semilla ni la piel, presenta niveles bajos de polifenoles. En este sentido, el más rico en estas sustancias es el vino tinto. La cantidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo¹⁹. La contribución de cada compuesto en particular depende no solo de su concentración y de su calidad antioxidante, sino que también de su interacción con otros componentes.



Los compuestos interactúan entre sí, lo que puede producir efectos sinérgicos o inhibitorios como es caso con los componentes activos de las hojas del yacón. El yacón al que se le atribuye propiedades antidiabéticas puede tener efecto sinérgico con las semillas del *Vitis vinífera* que es motivo del presente estudio.

5 METODOLOGIA

Tipo y Diseño de Investigación

El presente estudio fue un estudio prospectivo, longitudinal experimental del tipo “casos y controles

Identificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Población y muestra de la investigación

Para el estudio de evaluación de seguridad en animales de experimentación y actividad hipoglucemiante, la población y muestra de investigación estuvo conformada por ratones, y ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 según criterios de observación descritas en el diseño de investigación para realizar estudio macroscópico y microscópico.

Técnicas para el procesamiento de datos

Los datos fueron expresados como media aritmética \pm error estándar, porcentajes, figuras, etc. Para el análisis estadístico de las variables cuantitativas se empleó el análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa para la variable evaluada intergrupos e intragrupos, luego se realizó un análisis post hoc mediante el test de Scheffé. El nivel de significancia fijado es $P < 0.05$. Se usó el software estadístico SPSS for Windows versión 19.

Preparación de los extractos:

a. Extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* (Yacón): Se usaron las hojas deshidratadas y micropulverizadas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) procedentes de Oxapampa. Se pesó 100g de hojas y se maceró en 1000 mL de alcohol 75% por 7 días, luego se filtró y se colocó a la estufa a menos de 40 °C hasta eliminación del solvente y obtención de peso constante, luego se pesó y almacenó en un envase de vidrio color ámbar y se colocó a refrigeración hasta su posterior uso.

b. Extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinífera* (Uva): Se usó las semillas del *Vitis vinífera* provenientes de vinificaciones realizadas en el Distrito de Grocio Prado, Provincia de Chincha, departamento de Ica, de los viñedos Terry ubicado en lateral 14 del mencionado distrito.



Las semillas fueron obtenidas al momento de realizar el descube de elaboración del vino, por lo tanto, habían sido sometidas a los procesos de maceración y fermentación alcohólica, en forma previa a su utilización. Se obtuvieron semillas de aproximadamente 20 vasijas alrededor de 20 kg por vasija. Las semillas obtenidas se mezclaron completamente y se secaron a estufa a 40 °C, hasta peso constante. Posteriormente se almaceno en la oscuridad, en envase de vidrio cerrados y a temperatura ambiente. El solvente a usar fue agua destilada a 90 °C, se colocó 1g de semilla por cada 10 mL de solvente, el tiempo de tratamiento fue de 4 horas, luego se filtró y se llevó a la estufa a 40 °C para obtener al final un extracto seco.

Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios (método Sanabria²⁰, 1983)

A una solución de los extractos en estudio se realizó las siguientes pruebas

a) Determinación de taninos

Con gelatina – cloruro de sodio

A 1mL de muestra se agrega 3 gotas de reactivo, en un principio se forma en la solución una sustancia en forma de nube, luego se centrifuga y si queda en el fondo un precipitado de color blanco confirma la presencia de taninos.

Con Cloruro Férrico o Alumbre férrico

A la muestra se agrega unas gotas de cloruro férrico o alumbre férrico; una coloración negra azulada nos indica que el tanino pertenece a los derivados del ácido pirogálico, mientras que la coloración verde nos indica que deriva de la catequina.

b) Determinación de flavonoides

Con R. Shinoda

En un tubo de ensayo se coloca 1mL de muestra con 1 limadura de magnesio pequeña, con un gotero se añade 3 gotas de HCl concentrado. Si se observa un intenso burbujeo por la reacción de las limaduras y la solución va adquiriendo una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando más, la coloración naranja se va intensificando, hasta que después de 10 minutos la solución tiene un color anaranjado intenso indica un resultado positivo.

c) Determinación de cumarinas

Se coloca 2 gotas de la muestra en una tira de papel Whatman o algodón y se añade sobre ella una gota de NaOH 10 %. La observación de fluorescencia verde amarillenta bajo la lámpara UV 365 nm indica la presencia de cumarinas fijas.

d) Determinación de quinonas

Se pesan dos gramos de muestra y se tritura hasta un polvo muy fino en un mortero, luego se realizará los siguientes ensayos químicos:



Solubilidad en NaOH al 5%

En un tubo de ensayo se introducen 10 mg de la muestra, se añade 0,2mL de etanol y 0,4mL de NaOH al 5%. El cambio de coloración indica la presencia de compuestos quinónicos.

Reacción de Bornträger

Un gramo de muestra se trata con NaOH 5% en caliente, se filtra, enfria y se acidula con HCl 20%, se añade benceno, se agita y se deja en reposo. Luego se separa la fase bencénica a la cual se le añade NH₄OH. La formación de una coloración rosada a roja, indica la presencia de antraquinonas. Si es necesario se deja un buen tiempo, para que la reacción ocurra.

e) Determinación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff.

Se disuelve 8g de Bi(NO₃)₃·5H₂O en 20 mL de HNO₃ se mezcla con 50 mL de una solución acuosa conteniendo 27,2 g de KI, se deja reposar la solución, se decanta el sobrenadante y diluye a un volumen de 100 mL. Al agregar unas cuantas gotas de este reactivo a una solución ácida de la muestra se observa la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo.

Reactivo de Mayer.

Se disuelve 1,36 g de HgCl₂ en 60 mL de agua y se adiciona 10 mL de una solución conteniendo 5g de KI y se diluye hasta un volumen de 100mL. Al agregar un exceso de reactivo a una solución acidulada de la muestra se debe observar la aparición de un precipitado de blanco a crema.

Evaluación de la seguridad en animales

a. Toxicidad aguda oral: determinación de la DL₅₀ (Método Vega²¹, 1997)

Se utilizan 120 ratones albinos de 18 – 22 g de peso corporal, adquirido del Instituto Nacional de Salud. Después de una semana de aclimatación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 12 grupos (n = 10) según el siguiente diseño experimental:

Grupo 1: 2500 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas
Grupo 2: 5000 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas
Grupo 3: 10000 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas
Grupo 4: 15000 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas

Grupo 5: 2500 mg/kg Extracto acuoso de las semillas
Grupo 6: 5000 mg/kg Extracto acuoso de las semillas
Grupo 7: 10000 mg/kg Extracto acuoso de las semillas
Grupo 8: 15000 mg/kg Extracto acuoso de las semillas

Grupo 9: 2500 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas y acuoso de las semillas
Grupo 10: 5000 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas y acuoso de las semillas
Grupo 11: 10000 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas y acuoso de las semillas.



Grupo 12: 15000 mg/kg Extracto hidroalcohólico de las hojas y acuoso de las semillas

Toxicidad oral a dosis repetidas durante 28 días (Método OECD²², 2008)

Se utilizan 20 ratas holtzmann (10 de cada sexo), con un peso promedio de 250g; los animales fueron aclimatados por un período de 5 días. Un día antes del inicio del ensayo se conformaron 2 grupos experimentales de 10 animales (5 de cada sexo). Un grupo para el control (Grupo control I), al cual se le administró vehículo (agua destilada) y al otro grupo (Grupo tratado II) al cual se le administró 500 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas de yacón y X mg/kg del extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinífera* una vez al día vía oral durante 28 días. Se realizó diariamente observaciones clínicas a los animales, las mismas que incluye fundamentalmente cambios en la piel y el pelaje, ocurrencia de secreciones y excreciones, actividad autonómica (ejemplo lacrimación, piloerección, tamaño de pupila, patrón respiratorio inusual). Cambios en el peso, postura, y respuesta a la manipulación, también como la presencia de movimientos tónicos o clónicos, estereotipias (ejemplo acicalamiento excesivo, dar vueltas repetitivas) o comportamiento extraño (ejemplo automutilación, caminar hacia atrás). En la cuarta semana de exposición, evaluación de la fuerza de agarre y evaluación de la actividad motora. Los animales fueron pesados al inicio del estudio y los días 7, 14, 21 así como al terminar el mismo. Al finalizar el estudio se promedia el peso de los animales por semana y grupo, teniendo en cuenta el sexo para observar cómo se comportó este parámetro durante el ensayo.

Las determinaciones hematológicas y de bioquímica clínica se llevaron a cabo a los 28 días de exposición de la savia liofilizada. La obtención de sangre se realizó por punción cardíaca previo ayuno de 12 horas de los animales. Se determinó el hemograma, alanino aminotransferasa (ALAT), glucosa, colesterol total y triglicéridos.

Al finalizar el tratamiento, todos los animales fueron eutanizados con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Los animales fueron sometidos a necropsia grosera completa, lo cual incluyó examen cuidadoso de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneal, torácico y abdominal y sus contenidos. Corazón, pulmones, riñones, bazo, hígado, ovario o testículos fueron extraídos, separados de tejido adherente y pesados.

Ensayo experimental en ratas con diabetes mellitus tipo 2

a. Inducción de diabetes mellitus tipo 2 a ratas (Método OECD²²) modificado en la frecuencia de administración del aloxano)

Este modelo fue producido por la inyección a ratas vía intraperitoneal de Aloxano en buffer citrato (pH 4.75) en 4 dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 48 horas, antes de cada administración los animales estuvieron en ayunas 12 horas. Los animales que tenían glicemia entre 125 mg/dL y 359 mg/dL después de 48 horas de la última dosis se consideraron diabéticas y fueron incluidos en el estudio.



b. Diseño experimental de diabetes mellitus tipo 2

Se formaron 6 grupos, según esquema de trabajo que se muestra en la tabla 1

Tabla 1: Grupos de trabajo del diseño experimental de la diabetes mellitus tipo 2

Grupos	Tratamiento	Nº Ratas	Aloxano	Días de tratamiento
1	Normal + SSF	10	SSF	7
2	Control (+) + SSF	10	Recibió	7
3	Glibenclamida 10 mg/kg	10	Recibió	7
4	Yacón 500 mg/kg	10	Recibió	7
5	Uva X mg/kg	10	Recibió	7
6	Yacón 500 mg/Kg + Uva X mg/kg	10	Recibió	7

SSF: Solución Salina Fisiológica

c. Determinación de glucosa en sangre de ratas (Método de Glucosa oxidas)

Para determinar los niveles de glucosa en sangre de ratas se usará un kit comercial, el Glucómetro Accu-Chek Active de laboratorios Roche. Se tomaron muestras de sangre 1 hora después de cada administración de los tratamientos durante 7 días consecutivos haciendo una pequeña incisión en el ápice de la cola hasta obtener una gota homogénea y aplicar directamente sobre la tira reactiva del glucómetro.

d. Determinación de lipoperoxidación de páncreas (Método de Buerge J. y Aust S. modificada)

Para determinar la lipoperoxidación de páncreas se medirá la producción de Malondialdehído (MDA) que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) forma un complejo coloreado que se lee a 535 nm. El procedimiento consiste; en un tubo de centrifuga de tapa rosca pipetear 0.5 mL de homogenizado de páncreas al 10% en buffer fosfato 50 mM/L pH 7.0, adicionar 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%.

Mezclar, llevar al baño maría hirviendo por 10 minutos, separar el sobrenadante a otro tubo con ayuda de una pipeta pasteur, leer los sobrenadantes en el espectrofotómetro a 535 nm.

Para los cálculos se utilizará el coeficiente de extinción molar $1.56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del complejo coloreado formado por el malondialdehído-tiobarbitúrico.

e. Determinación de insulina en sangre (Método de Sándwich)

Se usará el equipo Systemes Elecsys 1010/2010. Se realizará en el último día de tratamiento (día 7). El test de insulina Elecsys utiliza anticuerpos monoclonados con interacción específica a la insulina humana



6.- RESULTADOS

Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios

El Yacon en su composición química presenta: triterpenos y esteroides, flavonoides, saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos libres, sesquiterpenolactonas, así como trazas de azúcares. Las pepas de uva presentan: fenoles, saponinas, alcaloides, esteroides, taninos cumarinas y azucares.

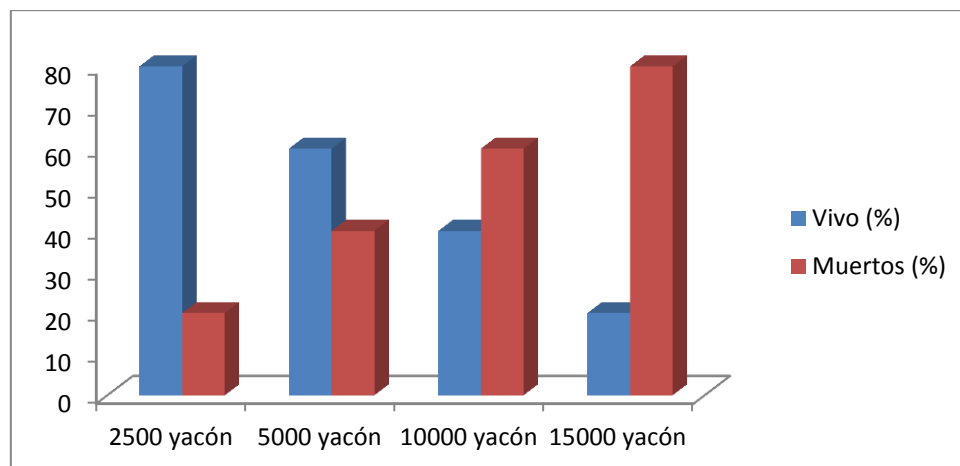
Toxicidad aguda oral: determinación de la DL50

En la evaluación de toxicidad aguda oral, los signos que se observaron con mayor frecuencia en relación directa con la dosis fueron sedación y disminución de la actividad motora, que en algunos casos desapareció en las primeras 24 horas luego de la administración y en otros casos produjo la muerte del animal. La mortalidad obtenida por cada dosis de ensayo de los extractos se muestra en la tabla 2

Tabla Nº 2: Porcentaje de mortalidad obtenido con los tratamientos de las hojas del yacón, semillas de uva y la sinergia de hojas de yacón y semillas de uva

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Nº	Nº Muertos	Mortalidad (%)
Yacón (hojas)	2500	10	2	20
	5000	10	4	40
	10000	10	6	60
	15000	10	8	80
Uva (semillas)	2500	10	0	0
	5000	10	2	20
	10000	10	5	50
	15000	10	7	70
Yacón + Uva	2500	10	1	10
	5000	10	3	30
	10000	10	5	50
	15000	10	8	80

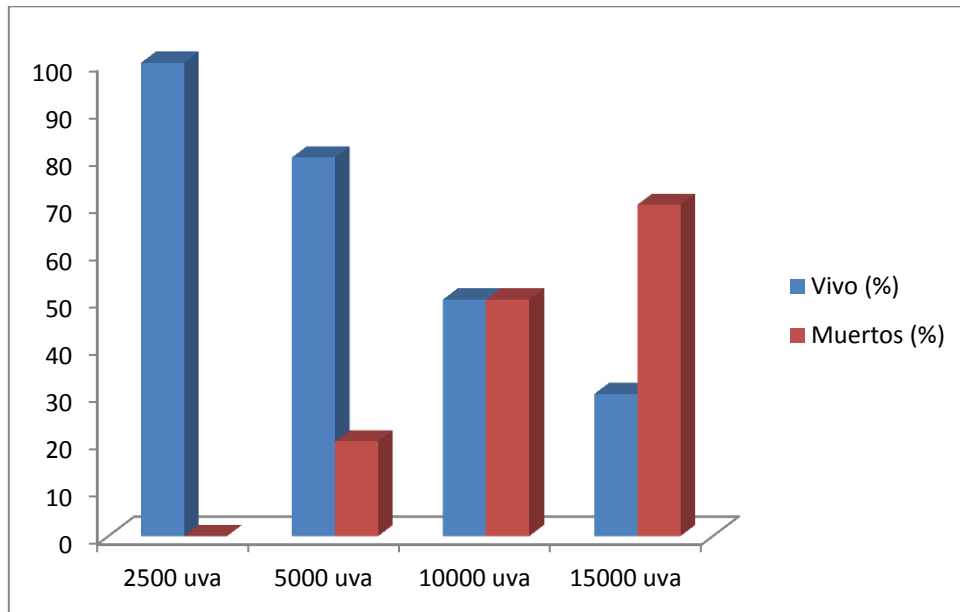
Gráfica Nº 1: Efecto sobre la toxicidad durante el tratamiento a ratones con extracto hidroalcohólico de hojas de Yacón.





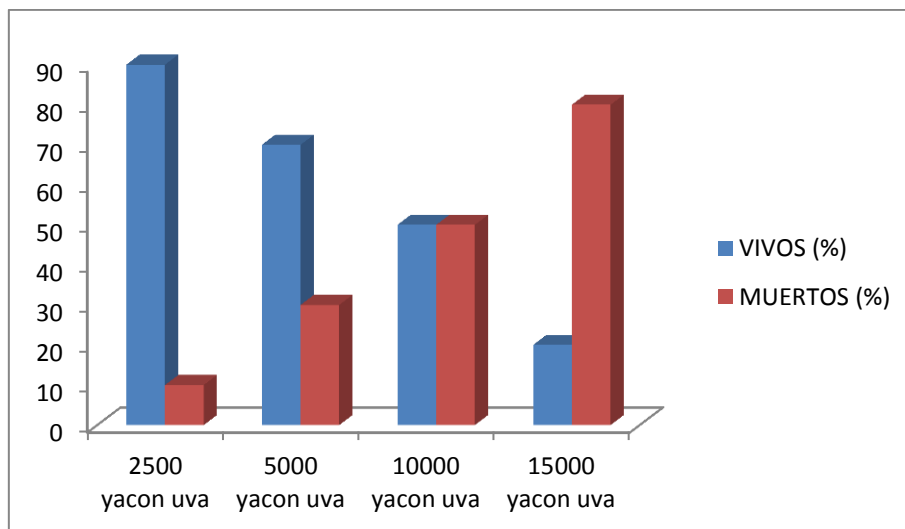
La dosis letal 50 (DL50) estimada para el extracto hidroalcohólico de las hojas de yacón estaría entre 5000 mg/kg y 10000 mg/kg de peso.

Gráfica N° 2: Efecto sobre la toxicidad durante el tratamiento a ratones con extracto acuoso de semillas de uva



La dosis letal 50 (DL50) estimada para el extracto acuoso de semillas de uva estaría en 10000 mg/kg de peso

Gráfica N° 3: Efecto sobre la toxicidad durante el tratamiento a ratones con la sinergia del extracto hidroalcohólico de hojas de yacón y extracto acuoso de semillas de uva



La dosis letal 50 (DL50) estimada para la sinergia del extracto hidroalcohólico de las hojas de yacón y el extracto acuoso de semillas de uva estaría en 10000 mg/kg de peso.



Toxicidad oral a dosis repetidas durante 28 días

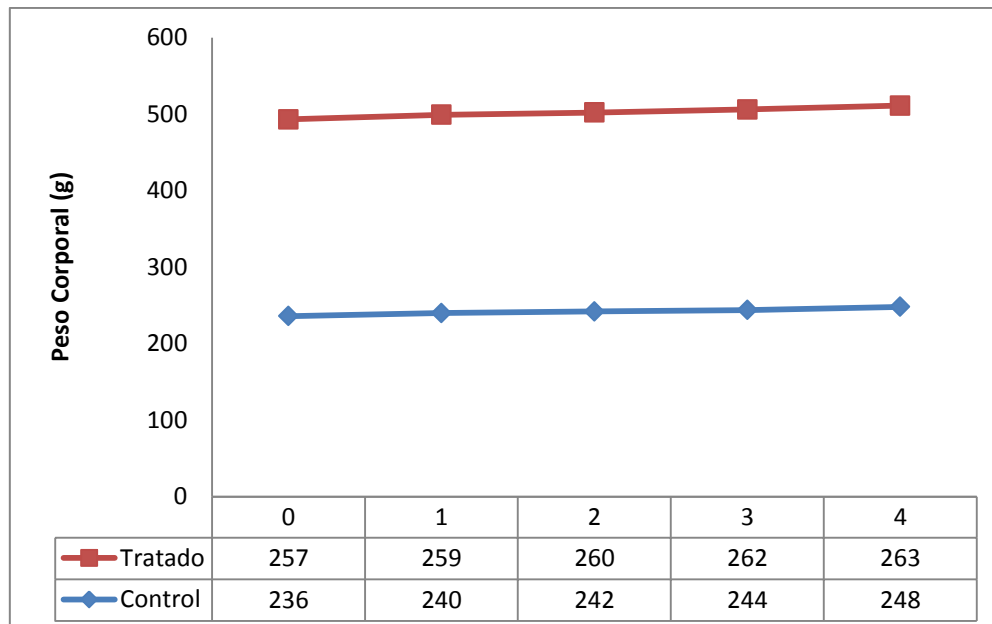
La variación del peso corporal durante 4 semanas de tratamiento no es significativa en el grupo control y tratado, los datos se presentan en la tabla N° 3.

Tabla N° 3: Variación en el peso corporal durante el ensayo con tratamiento diario de 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas *Smilax sonchifolius* (Yacón) y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinífera* (uva).

Sexo	Semana	Peso corporal (g)	
		Grupo control	Grupo tratado
Machos	0	236 ± 9.9	258 ± 7.8
	1	240 ± 7.6	259 ± 8.3
	2	242 ± 8.0	260 ± 7.7
	3	244 ± 7.3	262 ± 8.7
	4	248 ± 7.1	263 ± 9.3
Hembras	0	222 ± 9.2	210 ± 8.2
	1	223 ± 7.0	211 ± 8.1
	2	225 ± 8.4	213 ± 8.2
	3	225 ± 6.3	213 ± 9.1
	4	226 ± 7.0	215 ± 9.0

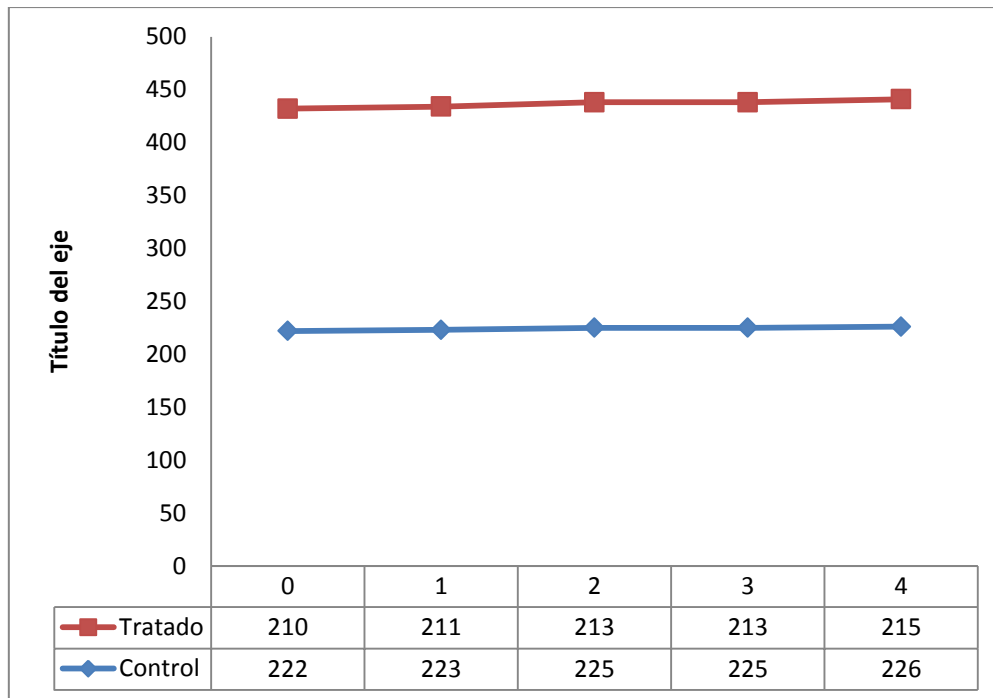
Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

Gráfica N° 4: Peso corporal durante el estudio en ratas machos





Gráfica N° 5: Peso corporal durante el estudio en ratas hembras



En la tabla N° 4 se reportan los valores medios de química sanguínea. Los valores para ambos sexos se encuentran dentro de los valores normales, sólo el indicador Alaninoaminotransferasa se encuentra ligeramente por encima de los valores normales establecidos para la especie en estudio.

Tabla N° 4: Variaciones en los parámetros de química sanguínea después de 28 días de tratamiento diario con 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinífera* (uva)

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Colesterol T (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Alanino aminotransferasa (U/L)
Machos				
V.N.*	95.7-147.7	36.6-57.2	33.3-65.5	35.1-53.5
Control	101.8 ± 9.8	60.4 ± 5.3	48.2 ± 11.6	57.6 ± 3.9
Tratado	96.0 ± 8.0	54.8 ± 2.6	52.0 ± 9.7	53.2 ± 12.1
Hembras				
V.N.*	112.9-170.9	44.4-68.2	38.1-66.1	28.8-46.0
Control	98.4 ± 9.3	51.60 ± 10.3	51.6 ± 10.3	45.0 ± 6.9
Tratado	115.20 ± 8.1	53.8 ± 12.6	60.8 ± 8.0	49.2 ± 8.0

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar



V.N. = Valor normal

*Fuente: González Y, Scull I49, et al. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. Rev Cubana Plant Med, Jun 2006, vol.11, no.2. ISSN 1028-4796

Los valores medios de los indicadores hematológicos se reportan en la tabla N° 5. En la fórmula leucocitaria no se han observado alteraciones, en los indicadores de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se encuentra dentro de los valores normales.

Tabla N° 5: Variaciones en los parámetros hematológicos después de 28 días de tratamiento diario con 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinífera* (uva).

Grupo	Leucocitos (x10 ³ /uL)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
Machos						
V.N.*	3.4-5.6	22.8-28.3	70.5-75.8	0-4	0-4	0-1
Control	3.8 ± 0.5	23.4 ± 1.7	72.0 ± 2.7	1.8 ± 0.4	3.1 ± 0.3	0.9 ± 0.4
Tratado	3.8 ± 0.3	23.7 ± 1.6	69.7 ± 1.6	1.2 ± 0.7	3.7 ± 0.8	0.6 ± 0.3
Hembras						
V.N.*	2.8-5.4	21.1-27.3	70.8-77.8	0-4	0-4	0-1
Control	3.9 ± 0.3	23.8 ± 1.1	72.8 ± 2.9	1.6 ± 0.3	2.7 ± 1.0	0.7 ± 0.4
Tratado	4.0 ± 0.4	24.1 ± 1.9	73.3 ± 4.9	1.8 ± 0.4	3.1 ± 0.6	1.0 ± 0.5

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

V.N: Valor normal

*Fuente: González Y, Scull I49, et al. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. Rev Cubana Plant Med, Jun 2006, vol.11, no.2. ISSN 1028-4796.

Durante el período de estudio de toxicidad sub agudo durante 28 días no se produjo muerte de ningún animal, todos fueron sacrificados al finalizar la investigación. Al realizar la necropsia no se encontraron lesiones microscópicas ni macroscópicas relacionadas a los tratamientos en estudio. Los valores de pesos relativos de los órganos no mostraron diferencias significativas respecto al control en ambos sexos.

Tabla N° 6: Variaciones de peso relativo de órganos después de 28 días de tratamiento diario con 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinífera* (uva).



Grupo	Corazón	Hígado	Páncreas	Riñones	Pulmón	Ovarios	Testículos
Machos							
Control	0.34 ± 0.05	2.00 ±	0.22 ± 0.04	0.54 ± 0.05	0.58 ± 0.08		0.48 ± 0.13
Tratado	0.30 ± 0.07	0.10 2.46 ± 0.24	0.24 ± 0.05	0.62 ± 0.08	0.54 ± 0.13		0.60 ± 0.16
Hembras							
Control	0.32 ± 0.04	2.08 ±	0.14 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.94 ± 0.20	
Tratado	0.26 ± 0.05	0.14 2.50 ± 0.54	0.30 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.50 ± 0.08	0.92 ± 0.28	

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

Ensayo experimental en ratas con diabetes mellitus tipo 2

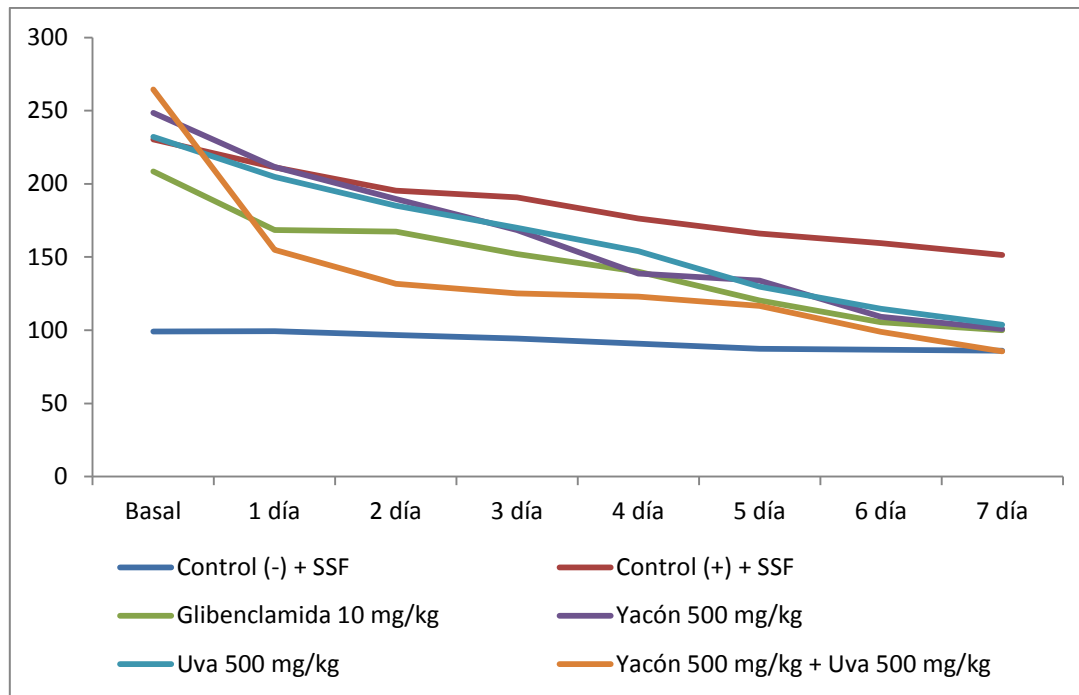
En la tabla N° 7 se presentan los datos del estudio de efecto hipoglucemiante. En las concentraciones de glucosa basal existen diferencias significativas de los grupos diabéticos con respecto al control normal SSF ($p < 0.05$). Las concentraciones de glucemia durante los siete días de tratamiento para el grupo control (-) + SSF existe ligera disminución, pero no es significativa ($p > 0.05$). Los grupos de glibenclamida, Yacón, uva y yacón + uva disminuyen la glucemia durante los días de tratamiento, siendo significativa comparado con el grupo control positivo SSF ($p < 0.05$). El grupo de yacón + uva representa mayor disminución de la glucemia y es significativa comparado con el control positivo SSF. El signo negativo del porcentaje de variabilidad (%V) indica disminución de la glucemia.

Tabla N° 7: Concentración media de glucosa (mg/dL) y error estándar en sangre de ratas con inducción de diabetes mellitus tipo 2 por aloxano

Tratamientos	Medias de Glucosa (mg/dl)														
	Basal	1 día		2 día		3 día		4 día		5 día		6 día		7 día	
	Media±ES	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V
Control (-)+SSF	99.10 ± 9.53	99.30±9.73	+0.20	96.70±10.47	-2.42	94.30±10.58	-4.84	90.80±8.28	-8.38	87.20±6.23	-12.00	86.60±5.68	-12.61	86.00±6.43	-13.21
Control (+)+SSF	230.30±47.86	211.40±48.26	-8.21	195.40±48.66	-15.15	190.80±48.58	17.15	176.30±37.97	23.45	166.10±33.02	-27.88	159.40±24.36	-30.79	151.30±17.47	-34.30
Glibenclamida 10 mg/kg	208.50±40.58	168.50±18.20	-19.18	167.30±23.83	-19.76	152.00±28.45	27.10	140.00±21.55	32.90	120.40±15.18	-42.25	105.50±9.20	-49.40	99.90±7.36	-52.09
Yacón 500 mg/kg	248.60±51.82	211.60±34.66	-14.89	189.70±33.01	-23.69	168.40±26.53	32.26	138.70±14.43	44.20	133.90±25.65	-46.14	109.10±15.09	-55.87	100.80±13.60	-59.45
Uva 500 mg/kg	232.10±32.99	204.80±38.56	-11.76	185.00±33.78	-20.29	169.90±36.36	26.80	154.00±25.96	33.65	129.80±22.05	-44.08	114.70±14.94	-50.58	103.60±13.76	-55.36
Yacón 500 mg/kg + Uva 500 mg/kg	264.40±29.61	154.80±13.23	-41.45	131.60±6.48	-50.23	125.10±6.39	52.69	123.00±7.18	53.48	116.70±27.91	-55.86	99.00±3.33	-62.56	85.50±6.19	-67.66
SSF: Solución Salina Fisiológica ES: Error estándar %V(Porcentaje de variabilidad) = $\frac{\text{Glucosa } n \text{ días} * 100}{\text{glucosa basal}}$ n: Representa el día de tratamiento															
P<0.05															



Gráfica N° 6: Efecto sobre la glucemia durante el tratamiento a ratas con inducción de diabetes mellitus tipo 2 por aloxano



Se observa que el grupo de tratamiento de la sinergia de yacón más uva presenta mejor efecto hipoglucemiante comparado con los otros grupos de estudio

7 LITERATURA CONSULTADA

- 1.- Mcphee, Stephen J., Ganong William F., Lingappa Vishwanath R., Lange Jack D.. Trastornos del páncreas endocrino. En: Fisiopatología médica una introducción a la medicina clínica. 2da edición. México. Editorial El Manual Moderno S.A. 2000. p:491-522.
- 2.- Villavicencio Núñez, Marino. Mecanismos moleculares y bioquímicos de la acción de la insulina. La diabetes mellitus y los avances en su tratamiento. Editorial Buenaventura. Perú. 1995.
- 3.- Davis S y Granner D. Insulina, hipoglicemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. En: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10º edición. México: Mc Graw Hill Interamericana: 2003. p. 1697 – 1733.
- 4.- Rodriguez LG. Insulinoterapia. Rev. Med. Herd. 2003; 14(3):140-144.
5. Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL (ed). Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition. New York, NY: McGraw-Hill. Medical Publishing División; 2005. 2783 Pgs.



6. Piniés J.A. Complicaciones agudas y crónicas, un riesgo que debe ser evitado. Rev. Esp Econom Salud 2008; 7(2): 64-67. <http://www.Diabetesatlas.org/es/content/morbilidad-y-mortalidad>.
7. Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa, Notas Descriptivas, Nota 312. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>. Acceso en noviembre 1 2011.
8. Esquivel-Gutiérrez E, Noriega-Cisneros R, Bello-González M, Saavedra-Molina A, Salgado-Garciglia R. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. Biológicas. 2012;14(1):45-52.
9. Bussmann RW. The globalization of traditional medicine in Northern Perú: from shamanism to molecules. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:291903.
10. Bussmann RW, Glenn A. Traditional knowledge for modern ailments – plants used for the treatment of diabetes and cancer in Northern Perú. J Med Plants Res. 2011; 5(31):6916-30.
11. Mendocilla M, Villar M. Monografía de plantas medicinales. En: Villar M, Villavicencio O, ed. Manual de fitoterapia. Lima: Seguro Social de Salud-EsSalud; 2001. p. 265-267.
12. Day C, Bailey CJ. Hypoglycaemic agents from traditional plant treatments for diabetes. Int J Ind Biotech 1988;8(3). 5-8
13. Kim OK, Lee EB. The screening of plants for hypoglycemic Action in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats. Korean J Pharmacog 1992; 23 (2):117-9
14. Valls J, Lampreave M, Nadal M, Arola L. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili; 2000.
15. Minaño A, Chico J, López E, Sisneigas M, Bobadilla M. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antioxidantes a partir de cultivos celulares de Vitis vinifera L. VAR. Red globe. Rev Perú biol. 2004; 11(2):187-92
16. Ciudad C, Valenzuela J. Contenido de flavonoides en uvas para vino cultivadas en valle de Casablanca, Chile. Agricultura Técnica (Chile). 2002;62(1):79-86.
17. Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, et al. Natural dietary
18. Saldaña-Balmori Y, Ramírez-González B., Delgadillo- Gutiérrez H. Acción de algunos antiinflamatorios no esteroideos sobre la lipoperoxidación hepática, inducida por etanol. Rev Cubana Invest Biomed 2003;22(1):16-24.



19. Vásquez M, González S, Risler N, Ponce A, Cruzado M, Miatello R. Un antioxidante natural, resveratrol, previene cambios bioquímicos cardiovasculares en ratas con un modelo de Síndrome X [resumen en Internet]. Mendoza, Argentina: Sociedad Argentina de Cardiología; 2002
20. Sanabria, A. (1983) análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Facultad de ciencias, departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- 21 Vega R, Carrillo C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). Ver. Cubana Plant Med. 1997; 2(2-3): 14-18.
22. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 1995, N° 47 [serie en Internet]. [citado 15 May 2008]. Disponible en: <http://www.oecd.org>