

EFFECTO HIPOGLICEMIANTE DE UN FITOFÁRMACO (DIAMET).

Nubilde Martinez^{1,2}; Amaral Gil², Leydisabel Celis², Lucia Rodriguez², Felix Romero², Carlos Espino^{2,3}; Dayana Requena^{2,4}

HYPOGLYCAEMIC EFFECT OF A PHYTODRUG (DIAMET).

ABSTRACT

This research was conducted to test the effect of a phytomedicine hypoglycemic (DIAMET) containing the following plants: Cundeamor (*Momordica charantia*), Pata de vaca (*Bauhinia forficata* Link), Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labil) and Achiote (*Bixa orellana* L.), in media containing human blood cells and glucose. Assays were performed in vitro with phytodrug content dissolved in 0.9% saline media normoglycemic (5.5 mM glucose), demonstrating the hypoglycemic effect, producing a decrease in glucose levels relative to control to the different amounts of the aqueous solution phytodrug (3, 9, 18, 36 and 72 micrograms) is added to the medium. It was evident that the P value was less than 0.05 allowing the odds suggest that these results are obtained randomly are minimal, showing that the phytodrug produced a statistically significant hypoglycemic effect, and that the higher the concentration and interval time this effect increases.

KEY WORDS: phytodrug, hypoglycemic effect, Cundeamor, Pata de vaca, Eucalyptus, Achiote.

RESUMEN

Esta investigación se realizó para comprobar el efecto hipoglicemiante de un fitofármaco (DIAMET) que contiene las siguientes plantas: Cundeamor (*Momordica charantia*), Pata de vaca (*Bauhinia forficata* Link), Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labil) y Achiote (*Bixa orellana* L.), en medios que contienen células sanguíneas humanas y glucosa. Se realizaron los ensayos in vitro con el contenido del fitofármaco disuelto en solución salina al 0.9% en medios normoglicémicos (5,5 mM glucosa), evidenciándose el efecto hipoglicemiante, al producir un descenso en las concentraciones de glucosa con respecto al control a las diferentes cantidades de la solución acuosa del fitofármaco (3, 9, 18, 36 y 72 microgramos) añadidas al medio. Se evidenció que el valor P fue menor de 0,05 lo que permite sugerir que las probabilidades de que estos resultados hayan sido obtenidos al azar son mínimas, demostrando que el fitofármaco produjo un efecto hipoglicemiante estadísticamente significativo, y que a mayor concentración e intervalo de tiempo dicho efecto aumenta.

PALABRAS CLAVE: Fitofármaco, Efecto hipoglicemiante, Cundeamor, Pata de vaca, Eucalipto, Achiote.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales es la terapéutica más frecuente en la medicina tradicional y en la medicina alternativa a nivel mundial,¹ conocer estas tradiciones ha sido el inicio de numerosas investigaciones de gran importancia; lo que ha motivado a realizar estudios de detección y validación de plantas

con fines medicinales. El objetivo de ésta investigación consistió en comprobar el efecto hipoglicemiante de un fitofármaco (DIAMET) que contiene en su composición 4 plantas: Cundeamor (*Momordica charantia*), urape o Pata de vaca (*Bauhinia forficata*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) y Achiote (*Bixa orellana* L.); en medios con células sanguíneas humanas y glucosa. Se pretende demostrar si realmente el fitofármaco posee el efecto hipoglicemiante que se le atribuye, y pueda ser un recurso terapéutico eficaz, con menos efectos secundarios y con mayor accesibilidad a las comunidades.

A nivel nacional e internacional existen estudios sobre las plantas contenidas en el fitofármaco, tanto en forma de extracto o como componente de productos farmacéuticos evidenciándose el efecto hipoglicemiante de cada uno de ellos.^{2, 3, 4, 5, 6}

En algunos países se utiliza el Cundeamor (*Momordica charantia*) como tratamiento coadyuvante

Recibido: Marzo 2014 Aprobado: Octubre, 2014

¹Departamento de Farmacología y Fisiopatología, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, Sede Aragua. ²Instituto de Investigaciones Biomedicas "Dr. Francisco J. Triana -Alonso" Universidad de Carabobo Sede Aragua (BIOMED-UC). ³Departamento de Salud Pública, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo Sede Aragua. ⁴Departamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo Sede Aragua.

Correspondencia: *nubildemartinez1@hotmail.com

para tratar la diabetes, y se ha demostrado a través de diferentes ensayos clínicos su efecto hipoglicemiante.^{4,7} Otra planta comúnmente empleada es la urape o Pata de vaca (*Bauhinia forficata*) a la cual se le atribuyen propiedades hipoglicemiantes, evaluadas tanto en animales como en pacientes con diabetes tipo 2.^{8,9}

En algunas investigaciones se ha demostrado el efecto hipoglicemiante producido por diferentes especies de Bauhinias tales como: *Bauhinia kalberyeri*,² *Bauhinia forficata*³ y *Bauhinia purpurea* L⁵, entre otras.

Otras de las plantas contenidas en el fitofármaco es el eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*), la cual es una planta popularmente conocida y utilizada por su poder antioxidante, hipoglicemiante (hojas) y antimicrobiano. Se le atribuyen otras propiedades como la actividad expectorante, fluidificante y antiséptica de la secreción bronquial, dicha cualidad se hace extensiva al aparato urogenital e intestinos.^{4,10,11}

Bendezú y colaboradores¹² realizaron una investigación donde utilizaron la esencia, aceite esencial y el extracto metanólico de la planta *Eucalyptus globulus labill* para validar su efecto hipoglicemiante, resultando que aun cuando se le atribuyen muchas propiedades terapéuticas, el efecto hipoglicemiante observado en esta planta fue muy bajo.

Finalmente el Achiote (*Bixa orellana* L.) es otra de las plantas contenida en el fitofármaco y se utiliza por su actividad antimicrobiana, administrando las hojas en forma de tintura, también se le atribuye actividad hipoglicemiante al usar el extracto acuoso y clorofórmico de la semilla.¹³

Existen estudios experimentales donde se buscó comprobar el efecto hipoglicemiante de la planta *Bixa orellana* L, en conejos de la raza Nueva Zelanda.⁶ Al comparar los resultados obtenidos con la administración de la solución acuosa de la planta y de la solución salina al 0,9%, se observó que en los valores obtenidos de las glicemias pre-prueba y post-prueba de los conejos tanto del grupo experimental como del grupo control, se evidenció una diferencia no significativa, el efecto hipoglicemiante observado fue muy bajo. Mientras que al realizar ensayos in vitro, utilizando solución acuosa de la planta en medios con células sanguíneas humanas y glucosa, demostraron el efecto hipoglicemiante, al descender las concentraciones de glucosa con respecto a los valores del grupo control a diferentes dosis de la solución acuosa.⁶

En un estudio previo que presenta algunas semejanzas con la investigación del fitofármaco, se evaluó la eficacia de un fitofármaco con igual formulación, a base de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L), cundeamor (*Momordica charantia*), pata de vaca (*Bauhinia forficata*) y achiote (*Bixa Orellana*), como tratamiento coadyuvante de la diabetes mellitus tipo 2. Al comparar los valores obtenidos con el fitofármaco, los valores basales y los valores al administrar el placebo, los resultados fueron estadísticamente significativos, donde se evidenció el efecto hipoglicemiante del fitofármaco.⁴

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento Experimental

Ensayo in vitro

Preparación de la Solución Acuosa: Se disolvió el contenido de una cápsula de 300 mg del fitofármaco en 8,3 ml de solución salina fisiológica al 0.9 % (concentración final 36 mg/ml), se mezcló por inversión hasta disolución completa y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Separación de leucocitos mediante centrifugación

Para la separación de células sanguíneas humanas, se tomaron 5 ml de sangre venosa de donantes voluntarios sanos, que manifestaron su deseo de participar en esta investigación previo consentimiento informado, y se colocaron en un tubo de ensayo con anticoagulante etilendiaminotriacético (EDTA), se tomaron 4ml de sangre de cada una de las muestras y se utilizaron para la separación de leucocitos y el 1ml restante se tomó como control sin centrifugar. El procedimiento de obtención de leucocitos se inició con la centrifugación de 4ml de sangre, durante 5 minutos a 2.700 revoluciones por minuto (rpm) utilizando para ello un rotor JA-20, marca Beckman®, se descartó el plasma y se tomó 1ml de la primera capa de células, donde se concentra la mayor parte de los leucocitos, y se dividió en 2 alícuotas de 500µl (A y B) que posteriormente fueron lavadas con 600 µl de tampón fosfato salino para eliminar los restos de plasma. El conteo de células se realizó en un analizador hematológico marca Mindray BC-2300. Para realizar los ensayos de consumo de glucosa se seleccionó la alícuota (A o B) donde se obtuvo la mayor concentración de leucocitos.

Ensayos de Consumo de Glucosa

Al iniciar los ensayos, se realizaron cinco diluciones a partir de la solución del fitofármaco para obtener concentraciones de 3, 9, 18, 36 y 72µg del fármaco respectivamente.

Se realizaron ensayos de consumo de glucosa empleando diferentes volúmenes de la solución acuosa del fitofármaco y se utilizó insulina como control, por ser el hipoglicemiante endógeno más potente.

Se incubaron muestras de 1×10^6 leucocitos, a 37°C por un tiempo comprendido entre 0 y 10 minutos, en 1 ml de un medio iónico apropiado (Hepes-KOH 20 mM pH 7,5; Tampón Fosfato 5 mM, pH 7,5; KCl 2,5 mM, NaCl 70 mM y MgSO_4 2,5 mM) bajo condiciones normoglicémicas (100 mg/dl) y un aditivo que puede ser insulina (Humulin®) en diferentes concentraciones (0,1; 1 y 10 nM) o solución acuosa del fitofármaco (3, 9, 18, 36 y $72\mu\text{g}$). Una vez iniciada la incubación a 37°C , se tomaron alícuotas de 40 μl de cada uno de los ensayos, a tiempos crecientes desde el inicio (0 minutos) hasta 10 minutos (0; 1,5; 3,5; 5 y 10 minutos), centrifugándose a 4000 rpm durante 2 minutos en una microcentrifuga Eppendorf® 5415, luego se tomaron 5 μl del sobrenadante y se mezclaron con 500 μl del reactivo de glucosa (Bioscience®) siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente, se registraron las absorbancias de los diferentes medios en un espectrofotómetro Beckman® DU 650.

Determinación de los niveles de glucosa

La cuantificación de los niveles de glucosa se realizó empleando el método glucosa oxidasa (método Trinder),¹⁴ siguiendo los parámetros de la casa comercial Biosciencia.

Para el Análisis estadístico, se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruks-Wallis. Este método permitió evidenciar que el valor P fue menor de 0,05 en todos los tiempos excepto al minuto cero. (P de: A = 0,29; B = 0,003; C = 0,003; D = 0,002; E = 0,001) obteniendo un valor de significancia de 96 al 98%.

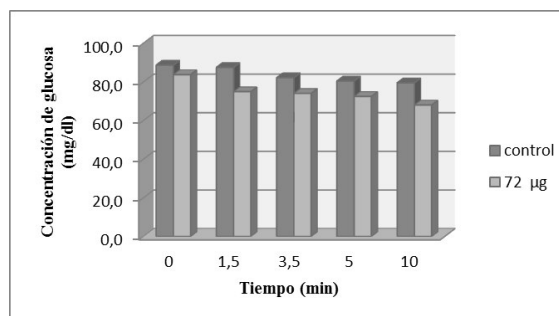
RESULTADOS

Al realizar el análisis de los resultados se observó una disminución progresiva de la concentración de glucosa con respecto al control, a medida que iban aumentando los intervalos de tiempo y la concentración de la solución acuosa del fitofármaco.

En la figura 1, se evidencia la disminución de la concentración de glucosa a diferentes intervalos de tiempo con la mayor concentración del fitofármaco ($72\mu\text{g}$ microgramos (μg)).

En la figura 2, se plasmó el aumento del porcentaje de consumo de glucosa a medida que

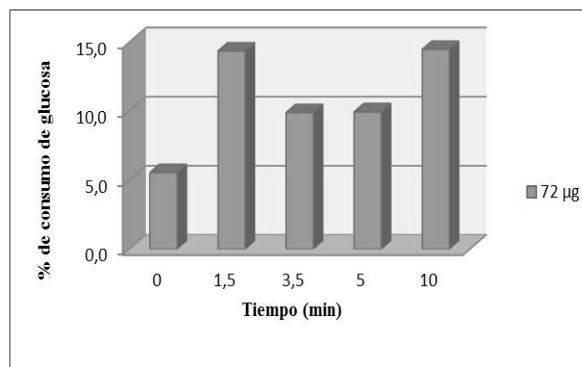
Figura 1
Concentración de glucosa a diferentes intervalos de tiempo con $72\mu\text{g}$ de la solución acuosa del fitofármaco.



aumentaron los intervalos de tiempo y la cantidad de la solución acuosa del fitofármaco, obteniéndose el mayor porcentaje de consumo con la cantidad mayor del fitofármaco al mayor intervalo de tiempo.

En la figura 3, se evidencia la disminución en la concentración de glucosa a medida que aumentaba el intervalo de tiempo al administrar una concentración de 10 nanomolar (nM) de insulina. Al realizar la comparación de las figuras, anteriores, se observa que al administrar insulina al medio normoglicémico hay una

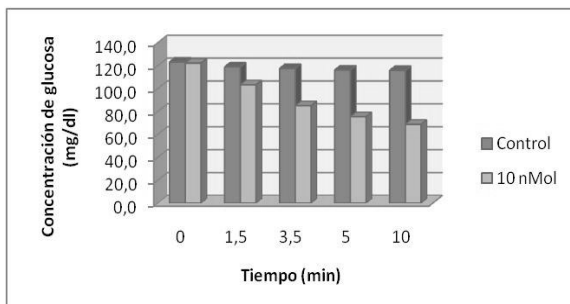
Figura 2
Porcentaje de consumo de glucosa a diferentes intervalos de tiempo con $72\mu\text{g}$ de la solución acuosa del fitofármaco.



disminución mayor de la concentración de glucosa, mientras que al administrar $72\mu\text{g}$ de la solución acuosa del fitofármaco en el medio, la disminución de la concentración de glucosa fue poco evidente, lo que se puede traducir en un menor consumo de glucosa por parte de las células sanguíneas en el medio, en comparación al consumo realizado por las células en presencia de la insulina.

Figura 3

Concentración de glucosa a diferentes intervalos de tiempo con una concentración de insulina de 10 nM.



DISCUSIÓN

El fitofármaco (DIAMET), es un producto comercial que contiene en su composición cuatro plantas: Cundeamor (*Momórdica charantia*), Pata de vaca (*Bauhinia forficata*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) y Achiote (*Bixa orellana L.*), y es de distribución y venta libre en el país.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la solución acuosa del fitofármaco disminuyó la concentración de glucosa en el medio donde se encontraban las células sanguíneas humanas, demostrando que el porcentaje de glucosa consumida en la célula fue mayor al incrementar las concentraciones de la solución acuosa del fitofármaco, quedando en evidencia el efecto hipoglicemiante de la solución acuosa y cuyo mecanismo de acción no puede ser explicado a través de este estudio, por lo que se convierte en interrogante para futuras investigaciones.

El método empleado para evaluar si la solución acuosa presentaba o no efectos hipoglicemiantes fue el método Trinder,¹⁴ el cual ha sido ampliamente utilizado y sometido a modificaciones a lo largo de varios años, lo que ha disminuido su porcentaje de error y ha aumentado la confiabilidad en los resultados obtenidos. Existen estudios con diferentes tipos de *Bauhinias* en animales de experimentación, donde se demostró una disminución de los valores de glicemia al utilizar la solución acuosa de las plantas.^{2, 3, 5}

En otro estudio que guarda relación con esta investigación se determinó el efecto hipoglicemiante de la planta *Momórdica charantia*, al producir un descenso en los valores de la glicemia de los ratones estudiados (8), también se demostró el efecto hipoglicemiante de una solución acuosa de la planta *Bixa orellana L* en ensayos in Vitro (medios con células sanguíneas humanas y glucosa).⁶

La validación estadística de este estudio fue de una significancia entre un 96-98%, siendo esto de gran importancia como hallazgo relevante para impulsar otras investigaciones, porque las probabilidades de explicar que los resultados obtenidos pudieran deberse al azar es mínimo.

Se concluye que la solución acuosa del fitofármaco produce un efecto hipoglicemiante y que a mayor concentración e intervalo de tiempo este efecto es mayor, y que se deben realizar investigaciones posteriores donde se puedan conocer los mecanismos de acción por los cuales se produce este efecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) World Health Organization. Diversidad Biológica. (2010) [online] Disponible en: URL: <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/>
- 2) Murillo E; Tique M; Ospina L y Lombo O. Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 2006 Vol. 35 (1), 64-80. [online] Disponible en: www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/download/.../2260
- 3) De Sousa C; Diogenes J; Azevedo B; Faria R; Andrade M; Alves R; Rodriguez M; Florenco F; Viana G. Antidiabetic Activity of *Bauhinia forficata*, extracts in Alloxan-Diabetic Rats. Biol. Pharm. Bull. 2004. 27(1) 125-127. [online] Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709915>
- 4) Martínez N., Casanova S.; Gil S. y Guzmán, Germán. Eficacia de un producto comercial a base de el eucalipto (*Eucalyptus globulus* L), Cundeamor (*Momordica charantia*), Pata de vaca (*Bauhinia forficata*) y Achiote (*Bixa Orellana*), como tratamiento coadyuvante de la diabetes mellitus tipo 2 en la población de Santa Rita, Municipio Francisco Linares Alcántara estado Aragua. Tesis de pregrado no publicada. Universidad de Carabobo. Maracay. 2007.
- 5) Martínez N., Cayama E., Goncalves L., Labrador S., Espino C., Pérez L. Efecto hipoglicemiante de la planta *Bauhinia Purpúrea* L., en ratones euglicémicos. Comunidad y Salud. 2009 Jul-Dic; 7 (2): 44-50
- 6) Martínez N., Jiménez R., Moreno W., Lamoint L., Cayama E., Espino C., Requena D. Efecto hipoglicémico de la planta *Bixa orellana* L., en conejos de la raza Nueva Zelanda y en medios de glucosa con células resuspendidas. Anuario de Investigación en Etnomedicina, Medicinas Complementarias y Utilización de Plantas Medicinales. 2010. 5ª Edición. México. Editorial Universidad Metropolitana. pp. 45-50.
- 7) Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Ediciones Corpus. Argentina. 2007; (834-835): 37-41.
- 8) Cayama E. Agüero P. Albarracín F. Alvarado F. Efecto hipoglicemiante del extracto de hojas de la planta *Momordica charantia* en ratones sanos y diabéticos. Tesis de pregrado no publicada. Universidad de Carabobo. Maracay 2008.
- 9) Silva F. Szpoganicz B. Pizzolatti M. Willrich M. y De Sousa E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and aloxan-induced diabetics rats. Etnofarmacol. 2002. 83 (1-2): 33 - 7
- 10) Pepato M, Keller E, Baviera A, Kettelbut I, Vendramini R, Brunetti R. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction on streptozotocine-diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 2002. 81 (2); 191-7
- 11) Gallagher A, Flatt P, Duffy G, Abdel-Wahab H. The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. Nutrition Res. 23 (3): 413-24 (2003)
- 12) Bendezú A; Cortez P; Donayre B; Encinas S; Olivera A; Egúsqiza K; Fernandez A; Galagarza M; Castañeda B; Ibáñez L. Estudio del efecto del *Eucalyptus globulus* labill "Eucalipto" en hiperglicemia inducida por aloxano en *Rattus*. V Congreso mundial de medicina tradicional. Trabajo publicado Lima - Perú, 2005. [online] URL http://www.medicina.usmp.edu.pe/acreditación/documentación/2_resultados/doc/congreso_mundial.pdf
- 13) Freixa B; Vila R; Bigbelli A; Castola V; Iglesias J; Gbia F; Casanova J and Cañigüeral S. Aliphatic acid: an unusual triterpenoid from leaves of *Bixa Orellana* and evaluation of its antifungal activity. 50 th Annual Congress of the society for medicinal Plant Research. Poster. B-198. 2002. September 8-12.
- 14) Barham D, y Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxydase system. Analyst. 1972; 97:142-145.