

Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicemiante aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas con diabetes experimental

Preliminary phytochemical screening and acute hypoglycemic effects of the aqueous extract of *Ruellia tuberosa* L. root in experimental diabetes in rats

CARLOS CIANGHEROTTI¹, JESÚS CEGARRA⁴, ALFREDO USUBILLAGA²,
MARÍA RODRÍGUEZ³, JAIRO BERMÚDEZ², RACHEL MATA⁵, ANITA ISRAEL¹

RESUMEN

La diabetes es uno de los principales problemas de la salud pública mundial. En Venezuela se utilizan varias plantas para el tratamiento de la diabetes, sin embargo, los estudios farmacológicos de estas especies han sido insuficientes. *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae) es una de estas plantas de uso en la medicina tradicional. En los últimos años, hemos estudiado la farmacología del extracto acuoso de la raíz de la *R. tuberosa* (RT) demostrando su actividad antiinflamatoria, antioxidante y protectora frente al daño renal inducido por la diabetes. El tratamiento subcrónico con este extracto fue capaz de inhibir el aumento de la glucosa sanguínea en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ). En este trabajo se evaluó el perfil fitoquímico preliminar y el contenido de polifenoles totales del extracto de RT, así como también sus efectos agudos sobre la glicemia en ratas diabéticas. Los resultados muestran que el RT produjo un efecto hipoglicemiante tanto en los animales controles como en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, con porcentajes de variación de la glicemia comparables con el hipoglicemiante oral de referencia, la glibenclamida. Este extracto mostró la presencia de un alto contenido de polifenoles, lo que posiblemente se encuentre asociado con su actividad antidiabética y antioxidante, reflejada a través de la reacción del RT con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Todos estos hallazgos contribuyen con la validación del RT como un extracto antidiabético, el cual involucran la disminución de la glicemia y el decremento del estrés oxidativo. Asimismo, sienta las bases para el aislamiento y caracterización de los componentes responsables de su actividad farmacológica.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., diabetes, hipoglicemiante, fitoquímica.

ABSTRACT

Diabetes is one of the major problems of global public health. In Venezuela several plants for the treatment of diabetes are used, however, pharmacological studies of these species have been insufficient. *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae) is one of these plants traditionally used. In recent years, we studied the pharmacology of *R. tuberosa* root aqueous extract (RT), demonstrating its anti-inflammatory, antioxidant and protective activity against renal damage induced by diabetes. Subchronic treatment with this extract was able to inhibit the increase of blood glucose in rats with diabetes induced by streptozotocin (ETZ). In this work was assessed preliminary phytochemical profile and total polyphenol content of RT, as well as it's the acute effects on blood glucose levels in diabetic rats. The results show that the RT produced a hypoglycemic effect on both, control and diabetic rat, with percentages of glycemic variation

¹ Laboratorio de Neuropeptidos, ²Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ³Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Caracas, Venezuela. ⁴Herbario (MER), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Escuela de Química, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ⁵Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF. México.

Correspondencia: Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 1040.

similar to glibenclamide, an oral hypoglycemic reference. This extract showed the presence of a high content of polyphenols, which may be associated with their antidiabetic and antioxidant activity, reflected through RT reaction with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. All these findings contribute to RT validation as an antidiabetic extract, which involves decreases of glycaemia and reduction of oxidative stress. It also provides the basis for isolation and characterization of the compounds responsible of their pharmacological activity.

Key words: *Ruellia tuberosa* L., diabetes, hypoglycemic, phytochemistry.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es uno de los mayores problemas de salud pública mundial (American Diabetes Association, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2015), cerca de 387 millones de personas sufren esta enfermedad en todo el mundo y se estima un aumento adicional de 205 millones de pacientes en el año 2035 (Federación Internacional de la Diabetes, 2013). En Venezuela, es la cuarta causa principal de muerte y hay 1.252 millones de personas con diabetes (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2014; Federación Internacional de la Diabetes, 2013). La hiperglicemia es el principal signo clínico de la DM y es reflejo de una alteración del metabolismo de la glucosa. Son muchos los factores relacionados con el estilo de vida que se han relacionado con la diabetes, principalmente el alto consumo de carbohidratos y lípidos en la dieta (American Diabetes Association, 2015).

Una de las principales fuentes de obtención de promisorios fármacos, está representado por las plantas, ya sean de uso tradicional o no. De las más de 1.200 especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de la DM, sólo unas pocas han sido validadas o estudiadas etnofarmacológicamente. En Venezuela, existen pocos reportes sobre las especies de uso tradicional en la DM, asimismo, un gran número de las plantas comercializadas en los mercados y los herbolarios para tal fin, carecen de estudios farmacológicos que contribuyan a su validación como potenciales antidiabéticos. *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae), conocida como escopetera, escopetilla o yuquilla, es una de estas plantas de uso tradicional para el tratamiento de la DM, cuya caracterización etnofarmacológica ha sido insuficiente (Chothani y col., 2010a; Ciangherotti y col., 2013), en nuestro país en particular son utilizadas las infusiones o decocciones de la raíz de la especie, no sólo para el tratamiento de la diabetes, sino también para el manejo de las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales (Gil y col., 2003; Giraldo y col., 2009).

Las partes aéreas de la *R. tuberosa* L. han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidia-

bética, antinociceptiva y nefroprotectora (Chen y col., 2006; Ashraful y col., 2009; Manikandan y Arokia, 2010; Chothani y col., 2010b; Shahwar y col., 2011; Rajan y col., 2012; Ullah y col., 2012). En los últimos años, hemos evaluado farmacológicamente el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) en modelos animales, logrando contribuir con la validación de su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo (Pastorello y col., 2012). Asimismo, hemos demostrado que este extracto produce un importante efecto protector sobre el daño renal inducido por la diabetes tanto *in vivo* como *in vitro* y se demostró un interesante efecto antihiperglicémico crónico en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) (Ciangherotti y col., 2013). Sin embargo, no ha sido reportado los efectos hipoglicemiantes agudos del RT.

Efectivamente, el tratamiento oral con el extracto metanólico de todas las partes de *R. tuberosa* L. en conejos con diabetes inducida por el aloxano, fue capaz de disminuir los niveles de glucosa sanguínea de manera aguda, después de 4 horas, con resultados comparables a los de la tolbutamina (Ullah y col., 2012). Asimismo, el extracto metanólico de las hojas mostraron el mismo efecto antihiperglicemiante a las dosis de 100 y 200 mg/kg/día durante 14 días en ratas con diabetes inducida por el aloxano (Rajan y col., 2012). Estos hallazgos respaldan los resultados de Chothani y col. (2010b), quienes administraron extractos metanólicos, pero de hojas y raíz por separado, a ratas con diabetes tipo II inducida por la ETZ combinada con nicotinamida, y encontraron que no sólo fueron capaces de disminuir la glicemia, sino también los niveles plasmáticos de colesterol total y de HDL, sugiriendo que ambos extractos ejercen un efecto antidiabético con control adicional de factores metabólicos de riesgo cardiovascular. Este estudio representa el único hasta la fecha en donde se ha evaluado la actividad hipoglicemiante de la raíz de esta especie. Sin embargo, el extracto empleado fue orgánico y no acuoso, lo que podría traer como consecuencias diferencias importantes entre estos reportes y los posibles efectos del RT sobre la glicemia.

A pesar que se desconocen los metabolitos secundarios presentes en la raíz de *R. tuberosa*, varios

constituyentes de las partes aéreas han sido caracterizados; entre estos compuestos se destacan la apigenina y la apigenina-7- β -D-glucurónido (Behari y col., 1981; Misra y col., 1997, Singh y col., 2002), los cuales han sido señalados como los responsables de la actividad antidiabética de *Teucrium polium* L. (Esmaeili y col., 2009) y de *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Bansal y col., 2011). Por otro lado existen algunos estudios fitoquímicos preliminares de la especie, en donde se ha demostrado la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas en varios extractos orgánicos de planta (Arirudran y col., 2011a, b; Chothani y col., 2011; Chothani y col., 2012).

Es ampliamente conocido que los compuestos polifenólicos y flavonoides son potentes antioxidantes y algunos de ellos han mostrado actividad antidiabética (Umeno y col., 2016). La capacidad antioxidante de una planta y su actividad antidiabética se encuentran íntimamente relacionadas (Rahimi y col., 2005). Las especies reactivas de oxígeno son unas de las principales mediadoras de la DM y sus complicaciones (Tang y col., 2012). Especies que poseen constituyentes antioxidantes, tales como, la mangiferina (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge, *Mangifera indica* L.), el galato de *epi*-galocatequina (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), la swertiamarina y la swertisina (*Enicostemma hyssopifolium* (Willd.) I. Verd.), la *epi*-catequina (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) o la apigenina (*Teucrium polium* L.), a su vez, ejercen un efecto insulino mimético, atribuido a la presencia de estos compuestos (Patel y Mishra, 2011; Patel y col., 2012).

Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas o la planta entera de *R. tuberosa*, han revelado un potencial efecto atrapador de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, tales como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH \cdot) y el óxido nítrico (ON \cdot) (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y col., 2012a,b), sin embargo, estos estudios fueron realizados utilizando extractos orgánicos lo cual dista de contribuir de manera robusta con la validación de los usos etnomédicos de la especie; en este sentido, Ciangherotti y col. (2013) demostraron que el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* es antioxidante por su capacidad de atrapar el $O_2^{\cdot-}$.

En el presente estudio se evaluó el efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* mediante el uso de un modelo experimental de diabetes, *in vivo*. Para ello se determinó la capacidad del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* de normalizar los niveles de glucosa sanguínea (hipoglicémica) o prevenir su aumento (antihiper glucémica) inducido por la ETZ en ratas. Igualmente, se evaluó la composición fitoquímica preliminar y el contenido de polifenoles

totales del extracto. Con esto se pretende consolidar un nuevo y potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, además de contribuir a la caracterización farmacológica de esta especie perteneciente a la gran biodiversidad nacional, así como incentivar el aislamiento y síntesis de nuevas moléculas capaces de prevenir o disminuir la diabetes y el daño orgánico en la diabetes.

Materiales y métodos

MATERIAL BOTÁNICO

La planta fue recolectada en los alrededores del aeropuerto de Barquisimeto, Municipio Iribarren, estado Lara, Venezuela, las coordenadas del sitio son: latitud: 10° 04' N, longitud: 69° 19' W y la altitud es de 613 msn. Fue identificada por el Dr. Jesús Cegarra del Herbario (MER) de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, Venezuela; unos ejemplares vouchers fueron depositados en el herbario MER-ULA (Jesús Cegarra, N° de colección: 1623 y 1624).

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

La raíz de la *R. tuberosa* fue cortada en pequeños trozos y sometida a decocción en 500 mL de agua a 60 °C durante una (1) hora. El extracto acuoso preparado fue liofilizado obteniéndose 5,3 g de extracto, el cual fue mantenido bajo protección de la humedad.

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR

El análisis fitoquímico preliminar fue realizado tanto por cromatografía de capa fina (TLC) como por reacciones en solución. Para la TLC se utilizaron placas con sílica gel, las cuales fueron eluidas con el sistema AN-2, AcOEt-MeOH-H₂O (100:13,5:10; v/v/v), (Wagner y col., 1984). Las bandas fueron reveladas por atomización con los siguientes reactivos: Libermann-Burchard (LB) para terpenos o saponinas con coloración violeta; Anisaldehído en ácido sulfúrico (AS) para terpenos y polifenoles con coloración púrpura y amarillo respectivamente; NP-PEG (natural products-polyethylene glycol) para flavonoides con coloración roja, amarilla y verde, y los polifenoles, de tipo fenil propenoides, se muestran con coloración azul bajo la luz UV a 365 nm; Reactivo de Dragendorff (DRG) para alcaloides con coloración anaranjada; radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) para antioxidantes, con pérdida por neutralización del color violeta a amarillo pardo y Böntrager (KOH) para antraquinonas o estilbenos con coloración roja y amarilla o azul bajo la luz UV a 365 nm. Para las reacciones en solución una pequeña porción de RT fue disuelta en agua destilada, posteriormente fue añadido, por se-

parado, los siguientes reactivos: cloruro férrico (CF), para taninos; cloruro férrico-ácido acético-ácido sulfúrico (CAS), para glicósidos cardíacos; solución de cobre (Co), para resinas; solución de amonio (Am), para flavonoides; Meyer-ácido clorhídrico (MC), para alcaloides y cloroformo-ácido sulfúrico (CS) para terpenos. Adicionalmente, se evaluó la formación de espuma del RT en solución acuosa para evaluar la presencia de saponinas.

CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

El contenido de polifenoles totales del RT fue determinado por espectroscopía, utilizando ácido gálico como estándar, usando el método descrito por la International Organization for Standardization (ISO) 14502-1 (2005). Brevemente, 1 mL del extracto diluido, fue transferido a tubos que contienen 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu en agua (1:10; v/v). Posteriormente, se añadió 4 mL de carbonato de sodio (7,5% p/v). Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos y la absorbancia fue medida a 765 nm. La concentración de polifenoles fue calculada mediante la interpolación sobre una curva patrón de ácido gálico (10 a 500 µg/mL) y los resultados fueron expresados como gramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de extracto (gEAG/100g de extracto).

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Fueron utilizadas ratas Wistar machos de 180 a 250 g de peso corporal, provenientes del Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. e C.V.). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. La dieta de los animales consistió en Ratarina® y agua *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996).

INDUCCIÓN DE LA DIABETES

La DM tipo 1 fue inducida mediante la inyección intraperitoneal (ip) de 70 mg/kg de ETZ a las ratas. La glucosa sanguínea de los animales fue monitoreada durante 7 días o hasta que los niveles de glicemia fueron ≥ 250 mg/dL. Para ello se utilizó un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche). En este punto los animales fueron considerados diabéticos (Verspohl, 2002).

EFFECTO AGUDO DEL RT SOBRE LA GLICEMIA

Se empleó el método descrito por Verspohl (2002) y modificado por Guerrero (2009). Se utilizaron ratas sanas (actividad hipoglicemiante) y con diabetes inducida por la ETZ (actividad antihiperglucemiante).

Los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previo al experimento. Posteriormente, lo animales recibieron por vía oral dosis crecientes de RT o glibenclamida (hipoglicemiante de referencia). Se tomó una muestra de sangre de la vena caudal de la cola para determinación de la glucosa sanguínea basal (tiempo cero) y a las 1, 5; 3; 5; 7 y 9 horas post-tratamiento. La glucosa se determinó por el método enzimático de la glucosa oxidasa, empleando un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de variación de la glicemia con respecto al basal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($x \pm$ E.E.M.). Los datos se analizaron con el programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados con valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

EVALUACIÓN FOTOQUÍMICA PRELIMINAR Y DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

El análisis fitoquímico del RT muestra la posible presencia de flavonoides al observarse bandas coloreadas amarillas con NP-PEG en el TLC y de una coloración amarilla en la prueba con solución de amonio. También se observó la presencia de compuestos fenólicos en el TLC al apreciarse bandas de color amarillo con AS y azul a 365 nm con NP-PEG. Las soluciones acuosas de RT no produjeron espuma por lo que descartamos la presencia de saponinas. Asimismo, no fue determinada la presencia de terpenos, glicósidos cardíacos, alcaloides, taninos, resinas, antraquinonas y estilbenos. En la Tabla I se muestra el resumen de los resultados del análisis fitoquímico preliminar. De manera similar, el análisis de polifenoles totales evaluado a través del método ISO 14502-1, mostró que RT contiene un promedio de $18,46 \pm 1,9$ g equivalentes al ácido gálico por cada 100 g de extracto (figura 1). Desde el punto de vista de la capacidad antioxidante del RT, este extracto fue reactivo frente a la solución de DPPH, exhibiendo potencial atrapador de este radical (Tabla I).

EFFECTO DEL RT SOBRE LA GLUCOSA SANGUÍNEA

El RT presentó efectos hipoglicemiante y antihiperglucemiante agudos, ya que fue capaz de disminuir la glicemia tanto en animales normoglicémicos (Tabla II) como en animales hiperglicémicos (Tabla III) de manera comparable al hipoglicemiante de referencia, la

glibenclamida. Estos efectos se manifestaron desde la hora y media de tratamiento y se mantuvieron en forma sostenida hasta las nueve horas de observación. Desde que las diferentes dosis empleadas produjeron efectos en el mismo orden de magnitud, se seleccionó la menor dosis.

Tabla I
Constituyentes fotoquímicos del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L.

Prueba para	Reactivo	Resultado en RT
Terpenos	AS, LB, CS	-
Saponinas	AS, LB, Espuma	-
Polifenólicos	AS, NP-PEG	+
Flavonoides	NP-PEG, Am	+
Alkaloides	DRG, MC	-
Taninos	CF	-
Estilbenos	KOH-EtOH	-
Antraquinonas	KOH-EtOH	-
Resinas	Co	-
Glicósidos cardíacos	CAS	-
Antioxidantes	DPPH	+

Presencia. - ausencia. LB: Libermann-Burchard para terpenos o saponinas con coloración violeta; AS: Anisaldehído en ácido sulfúrico para terpenos y polifenoles con coloración púrpura y amarillo respectivamente; NP-PEG: Natural products-polyethylene glycol para flavonoides con coloración roja, amarilla o verde, y para polifenoles de tipo fenilpropenoides con coloración azul bajo la luz UV a 365 nm; DRG: Dragendorff para alcaloides con coloración anaranjado; KOH: Börntrager para antraquinonas o estilbenos con coloración roja y amarilla o azul bajo la luz UV a 365 nm; CF: cloruro férrico para taninos; CAS: cloruro férrico-ácido acético-ácido sulfúrico para glicósidos cardíacos; Co: solución de cobre para resinas; Am: solución de amonio para flavonoides; MC: Meyer-ácido clorhídrico para alcaloides; CS: cloroformo-ácido sulfúrico para terpenos; Formación de espuma para saponinas.

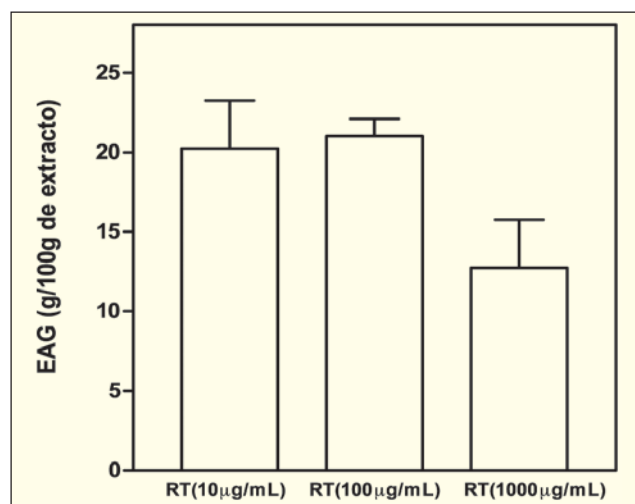


Figura 1. Contenido de polifenoles totales del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT). Los resultados se muestran como la media \pm EEM de equivalentes del ácido gálico (g/100g de extracto). N=9 por grupo.

Tabla II
Efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la glicemia en ratas no diabéticas

Grupos	1,5 h	3 h	5h	7h	9h
Control (vehículo)	2,35 \pm 5,15	0,17 \pm 5,66	-15,75 \pm 3,41	-16,64 \pm 4,02	-22,29 \pm 3,95
Glibenclamida (10 mg/kg)	-12,07 \pm 3,89*	-22,55 \pm 6,14*	-38,25 \pm 5,27**	-49,15 \pm 5,15**	-43,42 \pm 4,39**
Extracto R. Tuberosa (10 mg/kg)	-8,82 \pm 4,08	-12,89 \pm 2,68	-22,67 \pm 3,80	-32,07 \pm 3,35*	-24,58 \pm 2,72
Extracto R. Tuberosa (30 mg/kg)	3,51 \pm 3,59	-10,00 \pm 4,78	-25,23 \pm 4,04	-29,80 \pm 3,03*	-27,91 \pm 2,43
Extracto R. Tuberosa (100 mg/kg)	-5,32 \pm 4,26	-3,06 \pm 3,67	-20,92 \pm 8,42	-34,75 \pm 4,81*	-31,09 \pm 5,55
Extracto R. Tuberosa (100 mg/kg)	1,54 \pm 2,66	-22,32 \pm 2,21**	-31,07 \pm 2,37**	-36,60 \pm 2,96**	-35,49 \pm 3,36*

Los valores se expresan en % de variación de glicemia. Se muestran como la media \pm E.E.M. *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control (N=6)

Tabla III
Efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la glicemia en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina

Grupos	1,5 h	3 h	5h	7h	9h
Control (vehículo)	8,76 \pm 3,79	-3,99 \pm 3,66	-7,97 \pm 6,75	-9,85 \pm 4,93	-17,63 \pm 3,35
Glibenclamida (10 mg/kg)	-17,83 \pm 7,72*	-23,48 \pm 7,08*	-34,65 \pm 6,80*	-35,43 \pm 5,97**	-33,95 \pm 5,66*
Extracto R. Tuberosa (10 mg/kg)	-12,77 \pm 7,49*	-27,99 \pm 7,05*	-30,69 \pm 5,27*	-38,73 \pm 5,65**	-49,24 \pm 9,66*
Extracto R. Tuberosa (30 mg/kg)	-4,93 \pm 4,63*	-17,86 \pm 4,70*	-26,64 \pm 4,85*	-27,02 \pm 4,22*	-33,87 \pm 5,39*
Extracto R. Tuberosa (100 mg/kg)	-9,68 \pm 2,48**	-20,59 \pm 4,15*	-26,03 \pm 2,24*	-26,82 \pm 2,20*	-31,71 \pm 4,68*
Extracto R. Tuberosa (100 mg/kg)	4,00 \pm 10,28	-16,48 \pm 7,11	-23,18 \pm 6,25	-28,88 \pm 3,66*	-31,36 \pm 4,05*

Los valores se expresan en % de variación de glicemia. Se muestran como la media \pm E.E.M. *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control (N=6).

Discusión

La hiperglicemia es el principal signo clínico que caracteriza la DM, la cual es el resultado de un profundo desequilibrio del metabolismo de la glucosa debido a alteraciones en la síntesis, la secreción y la señalización de la insulina (American Diabetes Association, 2015). Está bien establecido que las condiciones hiperglicémicas conducen a daños tisulares, conocidos como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética, a la vez que guardan estrecha relación con

otras patologías como la hipertensión arterial, la dislipidemia, la insuficiencia cardíaca y la obesidad (Wild y col., 2004; Gilbert y col., 2006; Balkau y col., 2007).

Uno de los principales modelos experimentales para el desarrollo de fármacos y fitofármacos anti-diabéticos es la inducción de la diabetes por la administración de sustancias capaces de destruir selectivamente las células beta del páncreas, tales como el aloxano o la ETZ (Williamson y col., 1996; Baynes, 2006), este último modelo ha sido uno de los más utilizados para el estudio del daño renal en la diabetes (Jensen y col., 1981; Verspohl, 2002). Las ratas con diabetes inducida por la ETZ representa un modelo de DM tipo 1, debido al enorme daño apoptótico que sufren las células β pancreáticas y, por ende, el agotamiento de la insulina (Verspohl, 2002). Algunos signos comunes de la diabetes en humanos son fielmente reproducidos en este modelo experimental, entre ellos destacan: la hiperglicemia, la pérdida de peso, la proteinuria, el aumento de la diuresis, del BUN (nitrógeno de urea en sangre), de la creatinina plasmática, el ensanchamiento del glomérulo y la fibrosis renal (Jensen y col., 1981; Jim y col., 2012). Nuestros resultados demuestran que el RT produce un importante efecto hipoglicemiante oral de manera aguda, inclusive hasta nueve (9) horas después de su administración y comparable con la glibenclamida, el hipoglicemiante oral de referencia; esto guarda consistencia con los resultados reportados después de la administración subcrónica de RT en ratas con diabetes inducida por la ETZ, en donde el tratamiento fue capaz no sólo de impedir el aumento de glicemia, sino también de la pérdida de peso, de la proteinuria, del aumento de la diuresis, del BUN, de la creatinina plasmática, y de la fibrosis renal (Ciangherotti y col., 2013).

Uno de los mecanismos propuestos para el daño endotelial y renal inducido por la hiperglicemia es la formación de especies reactivas de oxígeno (Brownlee, 2001). Estas moléculas inician la modificación de lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN que afectan su función, distribución y metabolismo. Las especies reactivas de oxígeno pueden comenzar entonces una cascada de señalización que induce daño celular y disfunción vascular. Es por ello que se ha sugerido que los compuestos o productos antioxidantes podrían prevenir las complicaciones de la diabetes. Al respecto, en la farmacología de *R. tuberosa* se le ha atribuido actividad antioxidante, específicamente se ha demostrado la presencia de una marcada actividad antioxidante en los extractos de las partes aéreas (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y col., 2012a,b) y de los extractos de la raíz de la planta, determinado por la capacidad de atrapar el $O_2^{\cdot-}$

(Ciangherotti y col., 2013; Rajendrakumar y col., 2014) y de atrapar OH^{\cdot} y DPPH (Rajendrakumar y col., 2014). Nuestros resultados muestran que el RT reacciona con el radical DPPH (Tabla I), lo cual puede estar íntimamente relacionado con el alto contenido de compuestos polifenólicos (figura 1), y se diferencian de los hallazgos de Rajendrakumar y col. (2014), quienes no encontraron actividad antioxidante en los extractos orgánicos, mientras que nuestros resultados en el extracto acuoso demuestran la presencia de dicha actividad y nos acerca más a la validación del uso tradicional de esta planta.

Al igual que otras plantas antidiabéticas, tales como, *Aloe vera* L., *Momordica charantia* L. y *Phyllanthus niruri* L., la especie *R. tuberosa* mostró no solamente disminuir los altos niveles de glucosa, sino también abolir o disminuir otros signos clínicos de la diabetes tales como, la pérdida de peso corporal, la proteinuria, el incremento de la diuresis, entre otros; un aspecto importante que relaciona a estas especies antidiabéticas entre sí, es su capacidad antioxidante, lo cual está vinculado con sus actividades hipoglicemiantes y antihiperglicemiantes (Okyar y col., 2001; Chaturvedi y col., 2010; Okoli y col., 2011; Ciangherotti y col., 2013).

De las partes aéreas de *R. tuberosa* se han aislado varios compuestos polifenólicos, como la apigenina, la luteolina 3, 5-diglucósido, la apigenina 7-O-glucurónido, el glucósido de apigenina, el rutinósido de apigenina, la luteolina 7-O-glucosido, la pedalitina, la cirsimaritina, la malvinina, la cirsiloliola 4'-glucósido, la sorbifolina, la pedalitina, el isocassifoliosido, verbascosido, entre otros (Behari y col., 1981; Misra y col., 1997; Singh y col., 2002; Chothani y col., 2010; Phakeovilay y col., 2013). Aunque no está bien establecido cuales metabolitos secundarios se encuentran en la raíz de esta especie, nuestros resultados sugieren la presencia de compuestos polifenólicos, lo cual posiblemente esté vinculado a su actividad antioxidante, hipoglicemiante y antihiperglicemiante. Es conocido que algunas de estas moléculas, tales como la apigenina, la apigenina-7- β -D-glucurónido, la luteolina 7-O-glucosido y la malvidina son antidiabéticos presentes en varias especies vegetales (Panda y Kar, 2007; Grace y col., 2009; Esmaili y col., 2009; Bansal y col., 2011; Wang y col., 2011; Ren y col., 2016; Zang y col., 2016), sugiriendo la posibilidad que estos compuestos o sus glicósidos, sean los responsables del efecto antidiabético de *R. tuberosa*. Los compuestos polifenólicos, no solo se caracterizan por ser antioxidantes sino también por inhibir la activación de moléculas tales como: las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), el factor nuclear κ B (NF- κ B), factor de crecimiento transformante

beta (TGF- β), entre otros mediadores del daño tisular en la diabetes (Santagelo y col., 2007; Han y col., 2007). Varios polifenoles han mostrado que ejercen efectos similares a la insulina (insulino-mimético), tal es el caso del resveratrol, las catequinas y la naringenina, los cuales estimulan la captación tisular de glucosa y restablecen algunas vías metabólicas alteradas, tales como la glicólisis y la glucogénesis (Su y col., 2006; Daisy y col., 2010; Zygmunt y col., 2010). Todo ello conduce a pensar que el RT podría ejercer sus efectos antidiabéticos por mecanismos similares, sin embargo, las acciones insulino-miméticas deben ser demostradas.

El efecto hipoglicemiante agudo en animales controles y diabéticos del RT concuerda con los trabajos de Chothani y col. (2010b), de Ullah y col. (2012) y de Rajan y col. (2012), quienes demostraron que las hojas y partes aéreas de *R. tuberosa* disminuyen la glucosa sanguínea en un modelo de DM tipo 2 en ratas, en conejos con diabetes inducida por el aloxano y en ratas con diabetes inducida por el aloxano, respectivamente. En contraste, Shahwar y col. (2011) no encontraron actividad hipoglicemiante utilizando la fracción acuosa de esta especie en un modelo conejos con diabetes inducida por el aloxano, cabe destacar que esta fracción fue la remanente luego de extracciones sucesivas con solventes orgánicos, por lo que no guarda relación con un extracto acuoso resultado de una infusión o de una decocción de la planta, en contraste, esta fracción acuosa mostró actividad antioxidante frente al DPPH; y $385,82 \pm 9,64$ mg equivalentes de ácido gálico por cada g de extracto, de manera interesante, las fracciones de mayor contenido de polifenoles (la metanólica y la de acetato de etilo) mostraron la mayor actividad antioxidante e hipoglicemiante, lo cual demuestra la estrecha relación entre estas dos actividades biológicas. Recientemente, se ha establecido la inhibición de la α -amilasa como un mecanismo de acción antidiabética de las partes aéreas de *R. tuberosa*, siendo atribuida a betulina, un triterpeno aislado de la fracción metanólica de la planta (Ratna y col., 2015), sin embargo, nuestros resultados descartan la posibilidad de la presencia de este tipo de compuestos en el RT.

En conclusión, los hallazgos establecen al RT como un extracto hipoglicemiante y antihyperglicemiante, con acción antioxidante, lo cual junto a su efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra el estrés oxidativo y las vías de señalización de la proteína quinasa C (PKC) (Ciangherotti y col., 2013), aportan una valiosa información sobre la farmacología de la especie, a la vez que contribuye tanto a la validación de su uso tradicional como al establecimiento de las bases pa-

ra el desarrollo de un potencial fitofármaco para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones, en virtud al conocimiento de su perfil fitoquímico y a su importante contenido de compuestos polifenólicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, el CDCH-UCV proyectos PG-06-7349-2008-1/2 y AIA-06.8402.2012.

Referencias bibliográficas

- American Diabetes Association. 2015. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 38 (Suppl. 1):S1-S93.
- Arirudran A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. 2011a. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using in-vitro model. *J Pharmacy Res* 4(12):4344-4347.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and preliminary phytochemical studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). *Pharmacognosy J* 3(22):29-34.
- Ashrafu A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. *Pharmaceutic Biol* 47(3): 209-214.
- Balkau B, Deanfield J, Despres J, Bassand J, Fox K, Smith S Jr, Barter P, Tan C, Van Gaal L, Wittchen H, Massien C, Haffner S. 2007. International day for the evaluation of abdominal obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* 116: 1942-1951.
- Bansal P, Paul P, Mudgal J, G Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol* 64 (6): 651-658.
- Baynes K. 2006. Introduction to diabetes mellitus. Traditional herbal medicine for modern times, antidiabetic plants. CRC Press Taylor & Francis Group. United State of America. p.: 2-99.
- Behari M, Goyal M, Streibl M. 1981. Natural products from *Ruellia tuberosa* L. *J Indian Chem Soc* LVIII: 176-177.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-20.
- Chaturvedi P, George S. 2010. *Momordica charantia* maintains normal glucose levels and lipid profiles

- and prevents oxidative stress in diabetic rats subjected to chronic sucrose load. *J Med Food* 13(3): 520-527.
- Chen F-A, Wu A-B, Shieh P, Kuo D-H, Hsieh C-Y. 2006. Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*. *Food Chem* 94:14-18.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2010b. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* on nicotinamide-streptozotocin induced type-II diabetic rats. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2011. Phytochemical screening and physicochemical evaluation on various parts of *Ruellia tuberosa* Linn. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2012. HPTLC fingerprint profile and isolation of marker compound of *Ruellia tuberosa*. *Chromatography Res Inter* 2012:1-6.
- Chothani D, Patel M, Vaghasiya H, Mishra S. 2010a. Review on *Ruellia tuberosa* (cracker plant). *Pharmacognosy J* 2(12):506-512.
- Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Salazar-Bookaman MM, Israel A. 2013. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Arch Venez Farmacol Ter* 32(4): 57-66.
- Daisy P, Balasubramanian K, Rajalakshmi M, Eliza J, Selvaraj J. 2010. *Phytomedicine* 17(1):28-36.
- Esmaeili MA, Zohari F, Sadeghi H. 2009. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. *Planta Med* 75(13):1418-20.
- Federación Internacional de la Diabetes. 2013. Atlas de la diabetes de la FID. https://www.idf.org/sites/default/files/SP_6E_Atlas_Full.pdf. Fecha de Consulta (16/02/2016).
- Gil R, Mejías R, Carmona J, Mejías R, Rodríguez M. 2003. Estudio etnobotánico de algunas plantas expendidas en los herbolarios de Mérida, Ejido y Tabay (Estado Mérida-Venezuela). *Rev Fac Far* 45(1):69-76.
- Gilbert R, Connelly K, Kelly D, Pollock C, Krum H. 2006. Heart failure and nephropathy: Catastrophic and interrelated complications of diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:193-208.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez* 32(2):267-301.
- Grace MH, Ribnicky DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, Raskin I, Lila MA. 2009. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from low bush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine* 16(5):406-15.
- Guerrero J, Hersch P, Pedraza J, Navarrete A, Mata R. 2009. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med* 71:1-7.
- Han X, Shen T, Lou H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* 8:950-988.
- ISO 14502-1: 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=31356. Fecha de consulta (20/07/2015).
- Jensen P, Christiansen J, Steven K, Parving H. 1981. *Diabetología* 21(4):409-14.
- Jim B, Santos J, Spath F, Cijiang He J. 2012. *Curr Diabetes Rev* 1;8(5):317-28.
- Kensa M, Neelamegam A. 2012a. Comparison of free radical scavenging activities in the extracts of *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Arch* 12(1): 69-74.
- Kensa M, Neelamegam R. 2012b. Analysis of antioxidants in *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Arch* 12(1): 125-128.
- Manikandan A, Arokia V. 2010. Effect of 50% hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on non-enzymic antioxidants and other biochemical parameters in liver, kidney, serum of alloxan induced diabetic Swiss albino rats. *J Biomed Sci Res* 2(3):190-201.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2014. Anuario de mortalidad 2011. <http://www.bvs.gov.ve/anuario/Anuario2011.pdf>. Fecha de consulta (10/03/2015).
- Misra T, Singh R, Pandey R, Pandey R, Singh B. 1997. Two new aliphatic compounds from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem* 36B:1194-1197.
- NIH. 1996. Guide for the care and use of animals. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Okoli CO, Obidike IC, Ezike AC, Akah PA, Salawu OA. 2011. Studies on the possible mechanisms of antidiabetic activity of extract of aerial parts of *Phyllanthus niruri*. *Pharm Biol* 49(3):248-255.
- Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sütülpinar N. 2001. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytother Res* 15(2):157-61.
- Panda S, Kar A. 2007. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 59(11):1543-8.

- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Far* 75(2):1-16.
- Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic. *Property Asian Pacific. J Trop Biomed* 320-330.
- Patel MB, Mishra SH. 2011. Hypoglycemic activity of C-glycosyl flavonoid from *Encicostemma hyssopifolium*. *Pharm Biol* 49(4):383-91.
- Phakeovilay C, Disadee W, Sahakitpichan P, Sitthimonchai S, Kittakoop P, Ruchirawat S, Kanchanapoom T. 2013. Phenylethanoid and flavone glycosides from *Ruellia tuberosa* L. *J Nat Med* 67(1):228-33.
- Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 59(7):365-73.
- Rajan M, Kishor V, Satheesh Kumar P, Reddy Swathi K, Sangam Haritha. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of *Ruellia tuberosa* Linn leaves in normal and alloxan induced diabetic rats. *J Chem Pharmaceutical Res* 4(6):2860-2868.
- Rajendrakumar N, Vasantha K, Murugan M, Mohan V. 2014. Antioxidant activity of tuber of *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae). *Inter J Pharmacognosy Phytochem Res* 6(1); 97-103.
- Ratna Wulan D, Priyo Utomo E, Mahdi C. 2015. Antidiabetic activity of *Ruellia tuberosa* L. Role of α -Amylase Inhibitor: In silico, in vitro, and in vivo approaches. *Biochem Res Inter* 2015:349261.
- Ren B, Qin W, Wu F, Wang S, Pan C, Wang L, Zeng B, Ma S, Liang J. 2016. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 773:13-23.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. 2007. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 43(4):394-405.
- Shahwar D, Ullah S, Ahmad M, Ullah S, Ahmad N, Khan M. 2011. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rabbit. *IJPS* 2011 7(2): 1107-1155.
- Singh R, Pandey H, Pandey R, Singh B. 2002. A triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem* 41B:1754-1756.
- Su HC, Hung LM, Chen JK. 2006. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(6):E1339-46.
- Tang WH, Martin KA, Hwa J. 2012. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol* 3:87. doi: 10.3389/fphar.2012.00087. eCollection.
- Ullah S, Shahwar D, Ullah S, Ahmad M. 2012. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in normal and alloxan-Induced diabetic rabbits. *J Chem Soc Pak* 34(2):436-441.
- Umeno A, Horie M, Murotomi K, Nakajima Y, Yoshida Y. 2016. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules* 21(6): pii: E708. doi: 10.3390/molecules21060708.
- Verspohl E. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 68:581-590.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 94.
- Wang GG, Lu XH, Li W, Zhao X, Zhang C. 2011. Protective effects of luteolin on diabetic nephropathy in STZ-induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:323171
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
- Williamson E, Okapako D, Evans F. 1996. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. *Pharmacological methods in phytotherapy research, Volume 1.* John Wiley & Sons Ltd. England, pp. 155-167.
- World Health Organization. 2015. Diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> Fecha de Consulta (10/03/2015).
- Zang Y, Igarashi K, Li Y. 2016. Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-A(y) mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 80(8):1580-6.
- Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, Tsiani E. 2010. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochem Biophys Res Commun* 398(2):178-83.