



TOXICIDAD, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO E HIPOGLICEMIANTE IN VITRO E IN VIVO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano)

José Aranda-Ventura ⁽¹⁾, Jorge Villacrés Vallejo ^(1,2), Dora García-de Sotero ⁽³⁾, Víctor Sotero Solís ⁽⁴⁾,
Diego Vásquez Torres ⁽⁵⁾, Úrsula Monteiro Temmerman ⁽⁵⁾, German González-Aspajo ⁽¹⁾,
Rosario Mego Bardales ⁽¹⁾, Wiliam Vigo Alfaro ⁽¹⁾,

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo

Recibido: 30/12/2016

Aprobado: 30/01/2017

Autor correspondiente

José Aranda-Ventura
aranven9@yahoo.es
+511965766025

Financiamiento

Instituto de Medicina Tradicional.
IMET-EsSalud.

Conflictos de interés

Ninguno

Citar como

Aranda-Ventura J, Villacrés Vallejo J, García-de Sotero D, Sotero Solís V, Vásquez Torres D, Monteiro Temmerman U, González-Aspajo G, Mego Bardales R, Vigo Alfaro W. Actividad antioxidante in vitro y antidiabética in vitro e in vivo del extracto de *Juglans neotropica* diels (nogal peruano). Revista Peruana de Medicina Integrativa.2016;1(4):16-24.

RESUMEN

Objetivos. Evaluar la toxicidad, actividad antioxidante e hipoglicemiante del extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* Diels, nogal peruano. **Materiales y métodos.** Se realizó una caracterización fitoquímica mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. La toxicidad fue medida en larvas de *Artemia salina*. La actividad antioxidante fue medida usando la prueba de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). La actividad hipoglicemiante in vitro fue evaluada mediante la prueba de inhibición de α -glucosidasa; e in vivo mediante el uso de 36 ratas albinas divididas en cuatro grupos de acuerdo a la dosis suministrada (glibenclamida 10 mg/kg, J. neotropica 100, 250 y 500 mg/kg). **Resultados.** Dentro de los fitoconstituyentes se encontraron compuestos piranos, carbohidratos y fenoles. Con respecto a la letalidad, se encontró una CL50 de 3108 μ g/mL. La mayor actividad antioxidante con la prueba de DPPH fue encontrada en la concentración de 20 mg/mL ($86,68 \pm 0,71\%$) con una IC50: ($3,08 \pm 0,31$ mg/mL). La concentración de 2000 y 1750 μ g/mL mostraron la mejor actividad inhibitoria de la α -glucosidasa (IC50: 399,39 μ g/mL). Se observó que había diferencia significativa ($p < 0,05$) al comparar el grupo glibenclamida con la dosis de *Juglans neotropica* D. 250 mg/kg (CIC: 0,95; IC95%: 0,59-0,99) y 500 mg/kg. **Conclusiones.** El extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* Diels, nogal peruano, no es tóxico, tiene buena capacidad antioxidante y actividad hipoglicemiante in vitro e in vivo a unas concentraciones de 2000 μ g/ml y 250 mg/kg, respectivamente.

Palabras clave: Plantas Medicinales; Antioxidantes; Hipoglucemiantes; alfa-Glucosidasas (Fuente: DeCS)

TOXICITY, IN VITRO ANTIOXIDANT CAPACITY AND IN VITRO / IN VIVO HYPOGLICEMIANT ACTIVITY OF *Juglans neotropica* Diels (Peruvian walnut) AQUEOUS EXTRACT

ABSTRACT

Objective. To evaluate the toxicity, antioxidant and hypoglycemic activity of *Juglans neotropica* Diels "Peruvian walnut" lyophilized aqueous extract. **Materials and Methods.** A phytochemical characterization was performed by gas chromatography and mass spectrometry. Toxicity was measured in larvae of *Artemia salina*. Antioxidant activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test. In vitro hypoglycemic activity was assessed by the α -glucosidase inhibition test and in vivo hypoglycemic activity were evaluated by the use of 36 albino rats divided into four groups according to the dose given (glibenclamide 10 mg/kg, J. neotropica 100 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg). **Results.** The phyto-constituents found were pyran compounds, carbohydrates and phenols. No signs of acute toxicity was found (LC50=3108 μ g/mL). The concentration of 20 mg/mL had the highest antioxidant activity with DPPH test ($86.68 \pm 0.71\%$; IC50 3.08 ± 0.31 mg/mL). The concentration of 2000 μ g/mL and 1500 μ g/mL showed the best inhibitory activity of α -glucosidase (IC50: 399.39 μ g/mL). It was observed that there was a significant difference ($p < 0.05$) between the glibenclamide group and the *Juglans neotropica* D. groups with doses of 250 mg/kg (CIC: 0.95; 95% CI: 0.59-0.99) and 500 mg/kg. **Conclusion.** The lyophilized aqueous extract of *Juglans neotropica* Diels "Peruvian walnut" does not show any toxicity it has good in vitro antioxidant capacity and in vitro and in vivo hypoglycemic activity at concentrations of 2000 μ g/mL and 250 mg/kg, respectively.

Keywords: Plants, Medicinal; Antioxidants; Hypoglycemic Agents; alpha-Glucosidases (Source: MeSH)

¹ Instituto de Medicina Tradicional (IMET). Seguro Social de Salud (EsSalud). Iquitos-Perú
² Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Iquitos-Perú
³ Facultad de Ingeniería Química- UNAP
⁴ Fundación para el Desarrollo Sostenible de la Amazonía Baja-FUNDESAB
⁵ Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Iquitos-Perú

INTRODUCCIÓN

La diabetes *mellitus* es una enfermedad crónica compleja definida como una condición de hiperglicemia debida a resistencia a la insulina o una secreción inadecuada de insulina ^(1,2). La asociación entre la condición de estrés oxidativo y la aparición de diabetes y sus complicaciones, las cuales suelen ser las causas más frecuentes de mortalidad en estos pacientes, está bastante investigada y es una de las consideraciones que se suele estudiar en cualquier agente que demuestre un potencial efecto hipoglicemiante ^(3,4).

Mundialmente, el número de personas con diabetes *mellitus* 2 se ha incrementado de 108 a 422 millones en el año 2014 ⁽⁵⁾. En Perú, se estima que entre 2,9 a 3,5% de la población ha sido diagnosticada con diabetes *mellitus* ^(6,7); sin embargo, se suele resumir el tratamiento a las estrategias farmacológicas ya conocidas (metformina, sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de DPP-4, inhibidores SGLT2, agonistas de receptores de GLP-1 o insulina), las cuales tienen eficacia limitada y efectos adversos que disminuyen su adherencia ⁽⁸⁾.

En este contexto, se investigan alternativas terapéuticas como las plantas medicinales con uso tradicional, con el objetivo de indagar sus posibles mecanismos de acción y su potencial utilidad como nuevas alternativas costo-efectivas para los pacientes que lo requieran ⁽⁹⁾. Debido a la diversidad biológica de nuestro país, se cuentan con muchos ejemplos de plantas medicinales peruanas que han probado actividad hipoglicemiante ⁽¹⁰⁻¹²⁾; sin embargo, estos estudios representan solo una pequeña proporción de las plantas que han sido reportadas como “de uso tradicional” y que se siguen utilizando como alternativas terapéuticas en muchos lugares del país ⁽¹³⁾.

La *Juglans neotropica* Diels, nogal peruano, crece en la zona norte y oriente del país ⁽¹⁴⁾, es una especie cuyo uso más reconocido ha sido en la coloración de textiles ⁽¹⁵⁾, pero también se ha descubierto que sus hojas favorecen a la cicatrización de las heridas ⁽¹⁶⁾ y mejoran procesos respiratorios por posibles efectos antibacterianos ⁽¹⁷⁾. Trabajos previos que sugieren una alta actividad antioxidante ⁽¹⁸⁾ se da la posibilidad de evaluar el posible efecto hipoglicemiante que podría tener esta planta.

En este estudio, el objetivo fue evaluar la toxicidad y la actividad antioxidante e hipoglicemiante del extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* Diels, nogal peruano, en un modelo experimental con ratas albinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Muestras de la especie denominada nogal peruano, procedentes de la ciudad de Puerto Bermúdez (Oxapampa, departamento de Junín-Perú), se identificaron en el Herbarium Amazonense –AMAZ con el nombre científico de *Juglans neotropica* Diels (N.º 41465). La recolección de las muestras se realizó en noviembre del año 2015.

Preparación del extracto

Las hojas secas de *Juglans neotropica* Diels fueron lavadas, secadas a una temperatura entre 37 a 40 °C en un ambiente con un deshumidificador durante 72 h, luego fueron cortadas en fragmentos pequeños y se procedió a la elaboración del extracto acuoso al 10%. Seguidamente, se sometió 50 g de material vegetal seco, al proceso de calentamiento en 500 mL de agua destilada, a 70 °C durante 3 h; luego, se filtró y concentró lo obtenido, en el equipo rotavapor a 50 °C y 40 rpm. Finalmente, la solución concentrada fue congelada a -10 °C para luego pasar al equipo liofilizador Labotec®, de donde se obtuvo un polvo fino, el cual se denominó “extracto acuoso liofilizado”; este producto fue almacenado en frascos de vidrio con tapa hermética en refrigeración a 4-5 °C. Este proceso se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia del Instituto de Medicina Tradicional-IMET-EsSalud.

Caracterización del extracto

En primer lugar, se realizó un tamizaje fitoquímico con pruebas fisicoquímicas de caracterización, mediante cambios de coloración o formación de precipitados ⁽¹⁹⁾, determinándose metabolitos secundarios como grupos de compuestos, este ensayo se realizó en el Departamento de Farmacognosia del IMET-EsSalud. A continuación, se determinaron con más precisión los metabolitos secundarios mediante cromatografía de gases con espectrometría de masa, usando un equipo Agilent Technologies 7890A® con una columna capilar Agilent 122-5532 DB 5MS® de 30 m, con diámetro interior de 0,25 mm. La temperatura inicial del horno fue de 100 °C /03 min, seguida de una rampa de 20 °C/3 min hasta 300 °C/19 min; la temperatura máxima del horno fue 325 °C. Se utilizó una inyección *Split* y el flujo de gas helio fue de 2 mL/min. Los fragmentos para los análisis se registraron con los parámetros para un barrido (*scan*) de 50 a 500 m/z. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina-Perú.

Ensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina*

Los quistes de *Artemia salina* (huevos de camarón) se seleccionaron, se hidrataron y luego se incubaron en solución salina al 3% (salmuera); los huevos eclosionaron en 48 h proporcionando un gran número de larvas (nauplios). La muestra de prueba, extracto de *Juglans neotropica* (100 mg) se disolvió en 10 mL de solución salina 3%. A partir de esta solución se prepararon diluciones a 5000, 3000, 1000, 500, 250, 50, 10 y 1 µg/mL (ppm) y se transfirieron a tubos en diez réplicas por cada concentración (1 mL por réplica). Si el porcentaje de mortalidad es muy bajo se pueden extender las diluciones a 3000 y 5000 µg/mL (ppm). Se colocaron 10 larvas por réplica con micropipeta (a 20 µL). Los tubos se mantuvieron entre 22-27 °C durante 24 h bajo iluminación constante. El dicromato de potasio, K₂Cr₂O₇ (100 µg/mL) se usó como control positivo y la solución salina 3% como control negativo. Pasadas las 24 h de exposición se contó el número de larvas muertas y sobrevivientes. Los datos se analizaron usando el análisis Probit para determinar valores de CL₅₀ (concentración donde el 50% de las larvas murieron dentro de las 24 h de contacto con el extracto) con intervalos de confianza del 95%. La sustancia o extracto evaluado o muestra de prueba es considera tóxica si la CL₅₀ < 1000 µg/mL⁽²⁰⁾

Actividad antioxidante *in vitro* en la prueba de DPPH

La actividad antioxidante del nogal, se determinó mediante la capacidad inhibitoria de los radicales libres del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)⁽²¹⁾. El extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de *Juglans neotropica* D., fue sometido a diluciones metanólicas a diferentes concentraciones (2,5, 5, 10, 15, y 20 mg/mL), las cuales se mezclaron con una solución metanólica de DPPH al 0,1 mM; la mezcla se dejó en reposo y en ausencia de luz durante 30 min. Luego, se leyó la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro de UV-visible Génesis®, cada absorbancia fue leída a intervalos de 30 s durante 5 min (300 s). Las diferentes dosis del extracto se analizaron por triplicado. Se utilizó la solución metanólica de DPPH al 0,1 mM como control, sin adicionar el extracto. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición de radicales libres del DPPH. La capacidad de inhibición de radicales libres del DPPH fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ I de C} = (1 - (\text{Abs m} - \text{Abs ctrl neg}) / (\text{Abs ctrl pos} - \text{Abs ctrl neg})) * 100$$

Donde:

% I del C = Porcentaje de inhibición del compuesto
Abs m = Absorbancia de la muestra (extracto de nogal)
Abs ctrl neg = Absorbancia del control negativo (blanco)
Abs ctrl pos = Absorbancia del control positivo (DPPH)

La IC₅₀ (concentración del extracto que inhibe el 50% de los radicales libres) fue determinada usando el análisis Probit⁽²²⁾, los resultados fueron medidos tres veces y expresados en mg/mL.

Actividad antidiabética *in vitro*: inhibición de la enzima α-glucosidasa

El ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa fue desarrollado de acuerdo al método propuesto por Artanti *et al.*⁽²³⁾ y Srianta *et al.*⁽²⁴⁾. Donde 100 µL de la muestra a varias concentraciones (2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 750, 500 µg/mL) fue adicionada a un tubo de ensayo de 10 mL que contenía 50 µL de 0,1M de pNGP (p-Nitrofenil-D-glucopiranosido), se agregó 600 µL de *buffer* fosfato pH 6,5, y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. La reacción se inició al agregar 250 µL de solución enzimática (0,24 U/mL); seguidamente, se incubó por 15 minutos a 37 °C. Se detuvo la reacción por la adición de 1000 µL de la solución 0,2 M Na₂CO₃ y la absorbancia del p-nitrofenol resultante del pNGP a 400 nm fue medida con un espectrofotómetro. La acarbosa se usó como control positivo (a partir de 1000 µg disuelta en 1000 µL de agua millipore), la cual actúa como un inhibidor competitivo de las α-glucosidasas que están localizadas en el borde del cepillo del intestino delgado⁽²⁵⁾ y cuya función es retrasar la absorción intestinal de los hidratos de carbono y reducir los niveles de glucosa posprandial⁽²⁶⁾. El porcentaje de inhibición de la enzima α-glucosidasa fue calculada por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ I del C} = (1 - (\text{Abs m con enz} - \text{Abs Blanco sin enz}) / (\text{Abs Blanco con enz} - \text{Abs Blanco sin enz})) * 100$$

Donde:

% I de C = Porcentaje de inhibición del compuesto
Abs m con enz = Absorbancia de la muestra (extracto de nogal) con la enzima
Abs Blanco sin enz = Absorbancia blanco sin enzima
Abs Blanco con enz = Absorbancia blanco con enzima

La IC₅₀ (concentración del extracto que inhibe el 50% de la actividad enzimática de la α-glucosidasa) fue determinada usando el análisis Probit⁽²²⁾, los resultados fueron medidos cuatro veces y expresados en µg/mL.

Animales de experimentación

Se emplearon 36 ratas macho albinas cepa Holtzman con 13-21 semanas de edad y un peso entre 200 y 284 g. Los animales fueron aclimatados durante 15 días en el Bioterio del IMET – EsSalud, a una temperatura entre 20 y 25 °C con humedad de 40 a 70% y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Se les mantuvo con libre acceso de agua y alimento concentrado. El tamaño muestral se calculó con datos obtenidos de una prueba piloto,

asumiendo en el caso de las glicemias, un tamaño de efecto de 50 mg/dL y una desviación estándar de 30 mg/dL, con un error alfa de 0.05 y una potencia estadística de 90%; de acuerdo a lo mencionado por Charan *et al.* ⁽²⁷⁾. El manejo de los animales de laboratorio se hizo cumpliendo estrictamente con las normas establecidas para el uso de animales en trabajos de laboratorio, respetando sus derechos universales de acuerdo con la Declaración de la Asociación Médica Mundial sobre el uso de animales en la investigación biomédica ⁽²⁸⁾.

Inducción de la diabetes experimental

La diabetes fue inducida por la administración vía intraperitoneal de aloxano al 5%, a la dosis de 135 mg/kg; 48 h después se procedió a tomar una prueba de glucosa basal, considerándose diabetes experimental a todos los animales de experimentación con valores de glicemia mayor o igual a 200 mg/dL. Los animales fueron asignados aleatoriamente dentro de cuatro grupos de 9 ratas en cada uno: Grupo I: *Juglans neotropica* 100 mg/kg; Grupo II: *Juglans neotropica* 250 mg/kg; Grupo III: *Juglans neotropica* 500 mg/kg y Grupo IV: glibenclamida 10 mg/kg.

Exámenes auxiliares

Los valores de glicemia se determinaron a las 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h posteriores a la administración de las sustancias en los grupos mencionados. Dichos valores fueron determinados a partir de una muestra de sangre obtenida con un capilar de la región de la cola (en el ámbito de la vena caudal) la cual fue procesada mediante el método GOD-PAP, prueba enzimática colorimétrica para la glucosa/método con desproteinización. La

absorbancia se leyó en un espectrofotómetro JENWAY 6400 ® a la longitud de onda de 500 nm.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como medias y desviaciones estándar. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el uso del coeficiente de correlación de Spearman, análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo (ANOVA) y coeficiente de correlación (CIC) en el programa estadístico STATA v 13 ®. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados de la cromatografía de gases con espectrometría de masas revelaron la presencia de 7 fitoconstituyentes; de los cuales algunos son compuestos piranos, carbohidratos y fenoles. El cromatograma de la Figura 1 muestra los distintos picos en base a los tiempos de retención y el porcentaje de área. Los fitoconstituyentes identificados en el extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D. se muestran en la Tabla 1.

Con respecto a la letalidad en larvas de *Artemia salina*, se encontró una CL_{50} de 3108 ug/mL. En el gráfico 2, A y B, se puede observar la progresión del número de larvas e inhibición de crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones del extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D.

La mayor actividad antioxidante sobre la inhibición de DPPH en el extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D. fue encontrada en la concentración de 20 mg/mL ($86,68 \pm 0,71\%$) y seguida de la concentración de 15 mg/mL ($84,59 \pm 1,23\%$). La IC_{50} calculada fue de $3,08 \pm$

Tabla 1. Interpretación de la cromatografía de gases del extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D.

Pico	Probabilidad	%Área	Molécula	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Familia química
1	80,4	63,0	4H-pirano-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil	$C_6H_8O_4$	144,13	Pirano
2	14,4	9,2	a-D-glucopiranosido, O-a-D-glucopiranosil-(1.fwdarw.3) -b-D-fructofuranosil	$C_{18}H_{32}O_{16}$	504,44	Pirano
3	47,5	7,0	6-acetil-a-d-manosa	$C_{16}H_{22}O_{11}$	390,34	Carbohidrato
4	7,49	8,5	1,2,3-bencenotriol (pirogallol)	$C_6H_6O_3$	126,11	Fenólico
5	7,9	6,2	Ácido benceno propanoico, a- amino-4-metoxi	$C_{10}H_{13}NO_3$	195,21	Amina
6	15,5	3,1	Acetato de 7-metil-Z-tetradeceno-1-ol	$C_{17}H_{32}O_2$	268,43	Ester
7	26,4	3,0	2-ciclohexen-1-ona, 4-hidroxi-3,5,5-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)	$C_{13}H_{18}O_3$	222,28	Aldehído alcohólico

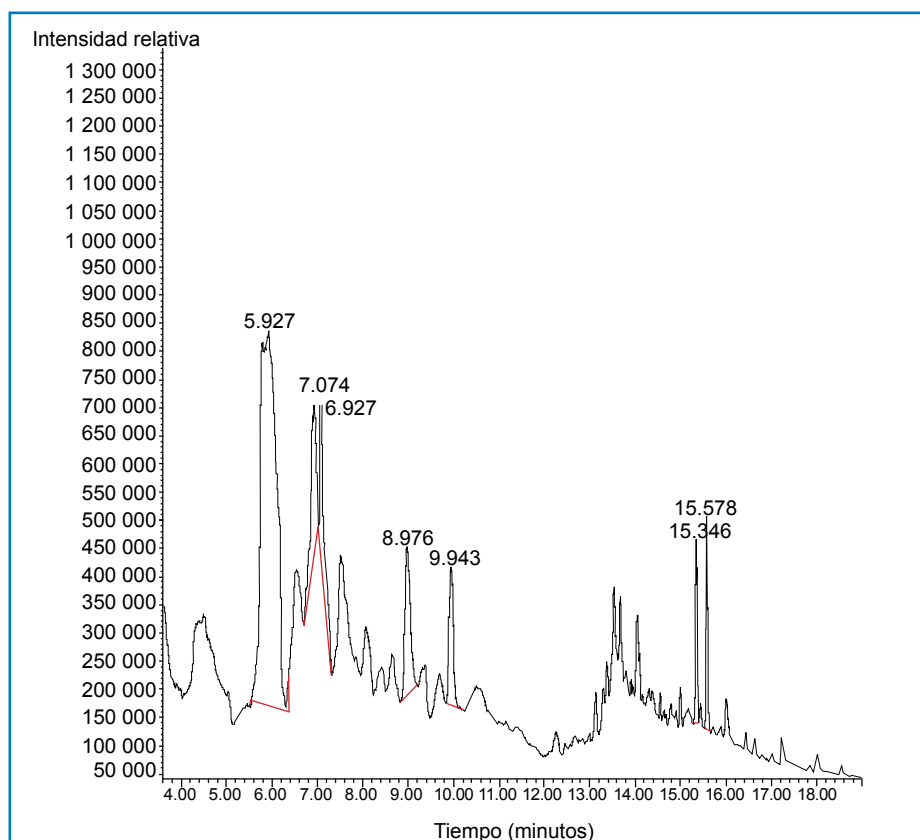


Figura 1. Cromatografía de gases y espectrometría de masa de los fitoconstituyentes de *Juglans neotropica* D.

0,31 mg/mL. Así mismo, las concentraciones de 2000 y 1750 ug/mL mostraron la mejor actividad inhibitoria de la

α -glucosidasa en comparación con la acarbosa 1000 ug/mL. En este caso, la IC_{50} fue de 399,39 ug/mL.

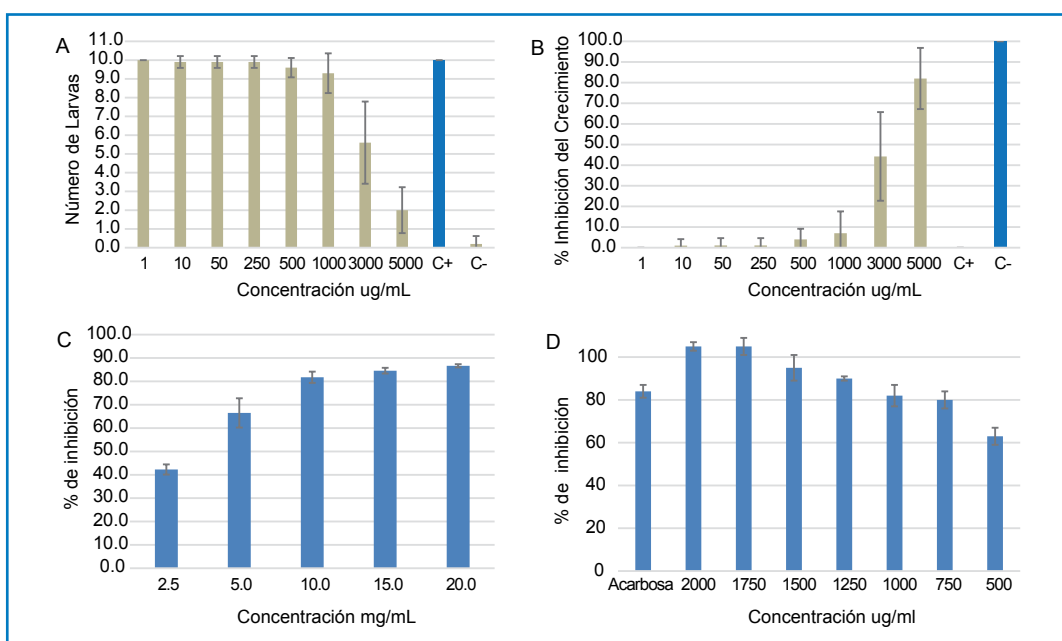


Gráfico 2. A) Comparación entre el número de larvas de *Artemia salina* y la concentración del extracto en ug/mL. B) Comparación entre el porcentaje de inhibición de crecimiento y la concentración del extracto en ug/mL. C) Capacidad antioxidante del extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D. a diferentes concentraciones. D) Actividad antidiabética in vitro del extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D. a diferentes concentraciones en comparación con acarbosa (C+) control positivo, (C-) control negativo.

Los animales de experimentación tuvieron un peso promedio de $247,31 \pm 29,29$ kg con glicemias basales promedio de $91,47 \pm 8,81$ mg/dL. Al realizar las intervenciones se observó diferencia significativa entre los promedios de los valores de glicemia obtenidos en los distintos puntos de corte en los grupos de glibenclamida, *Juglans neotropica* D. 100, 250 y 500 mg/kg. Así mismo, se obtuvieron resultados significativos en estos tres grupos al realizar los análisis de correlación lineal (Tabla 2).

Al realizar el ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo se observó que había diferencia significativa al comparar el grupo glibenclamida con la dosis de *Juglans neotropica* D. 250 y 500 mg/kg (Gráfico 3). Se realizó un análisis adicional de correlación intraclass (CIC) donde la comparación entre glibenclamida y *Juglans neotropica* 250 mg/kg obtuvo un CIC de 0,95 (IC95%: 0,59-0,99) y la comparación con la dosis de 500 mg/kg obtuvo un CIC de 0,27 (IC95% -0,16-0,73).

Tabla 2. Comparación de promedios de valores de glicemia en función a las horas de intervención y entre grupos de estudio

Grupo	Basal	1h	3h	6h	12h	24h	valor p comparación de medias*	valor p correlación lineal**
Glibenclamida	210,5 $\pm$ 9,9	246,9 $\pm$ 25,9	228,0 $\pm$ 23,0	206,6 $\pm$ 30,7	167,2 $\pm$ 32,6	129,5 $\pm$ 26,8	< 0,001	< 0,001
<i>Juglans neotropica</i> 100 mg/kg	267,2 $\pm$ 6,6	272,1 $\pm$ 7,2	260,4 $\pm$ 3,0	103,1 $\pm$ 7,4	288,6 $\pm$ 2,1	269,9 $\pm$ 2,1	< 0,001	0,189
<i>Juglans neotropica</i> 250 mg/kg	289,3 $\pm$ 19,5	242,4 $\pm$ 61,6	270,5 $\pm$ 48,7	266,1 $\pm$ 43,9	197,8 $\pm$ 59,5	201,9 $\pm$ 31,1	< 0,001	< 0,001
<i>Juglans neotropica</i> 500 mg/kg	273,5 $\pm$ 18,9	289,9 $\pm$ 7,3	275,7 $\pm$ 13,8	187,5 $\pm$ 82,5	264,4 $\pm$ 46,4	142,1 $\pm$ 60,1	0,002	0,001

DISCUSIÓN

El fitocompuesto mayormente determinado en el extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* D. fue el 4H-pirano-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil

(DDMP) identificado como un poderoso antioxidante ⁽²⁹⁾, inhibidor de la α -glucosidasa ⁽³⁰⁾ y de la NF-Kappa B, un factor de transcripción redox que puede ser activado en situaciones de hiperglicemia crónica ⁽³¹⁾. En estudios previos se realizaron caracterizaciones preliminares

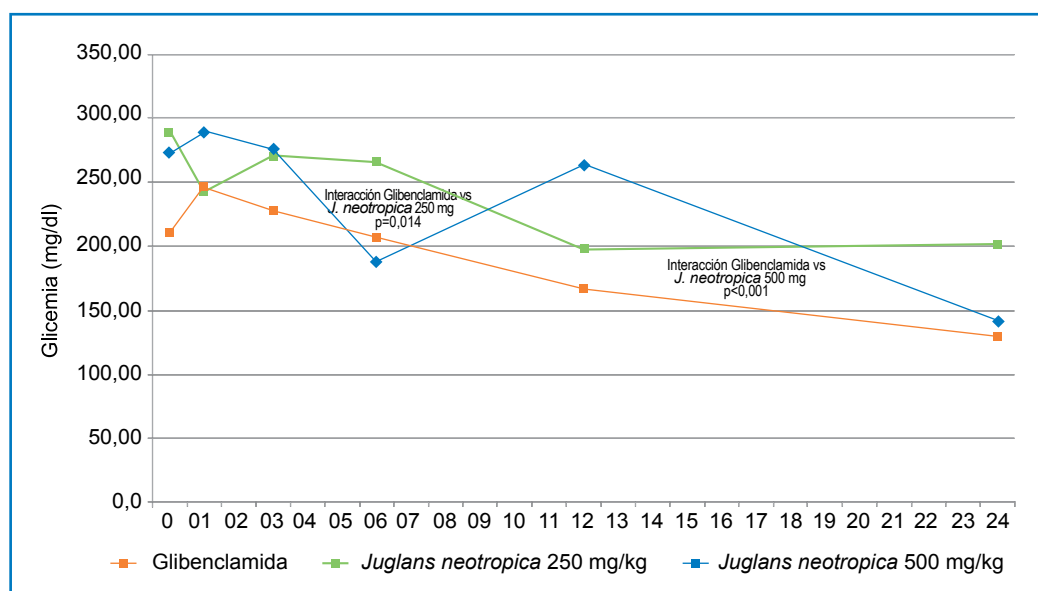


Gráfico 3. Efecto hipoglicemiante de los extractos acuosos liofilizados de *Juglans neotropica* D. en comparación con glibenclamida 10 mg/kg en función al tiempo (horas).

sobre extractos hidroalcohólicos de *Juglans neotropica* D. donde se encontraron compuestos fenólicos ^(18,30), flavonoides ⁽³³⁾ y saponinas ⁽³⁴⁾. En la cromatografía de gases con espectrometría de masa se encontró como compuesto fenólico en mayor proporción al pirogalol, el cual ya ha sido investigado como antimicrobiano y antioxidante ^(35,36). Estos resultados contrastan con los análisis fitoquímicos realizados en otras especies de la familia *Juglans*, donde se encontraron mayor cantidad de flavonoides y taninos ⁽³⁷⁾.

Los resultados obtenidos determinaron una CL₅₀ de 3108 µg/mL, por debajo de los 4734 µg/mL encontrados por Bussmann *et al.* ⁽²⁰⁾, pero todavía manteniéndose en rangos de no toxicidad. En el caso de la actividad antioxidante, la IC₅₀ fue de 3,08 ± 0,31 mg/mL, difiriendo del estudio de Hurtado Manrique *et al.* ⁽¹⁸⁾, quienes en el extracto hidroalcohólico encontraron una IC₅₀ de 12,82 ± 0,220 µg/mL a pesar que se usó la misma prueba y el mismo órgano de la planta (hoja). Sin embargo, se deben tener en cuenta las limitaciones del método DPPH el cual puede reportar en algunos casos resultados sesgados (sobre todo cuando se usan extractos etanólicos o metanólicos) ⁽³⁸⁾; a pesar de esto, estudios previos ^(39,40) realizados en *Juglans regia* con otras técnicas como FRAP (capacidad antioxidante por medio de reducción de hierro) reafirman la capacidad antioxidante que tiene esta especie vegetal.

El hecho que la IC50 del extracto hidroalcohólico resultara más bajo que la IC50 del extracto acuosos, sugiere que los componentes antioxidantes están presentes en mayor concentración en la extracción hidroalcohólica, otro aspecto que explicaría la diferencia de resultados, es que las muestras de *Juglans neotropica* para cada estudio son de diferentes procedencias.

Nuestro estudio encontró que las mejores actividades de inhibición de α-glucosidasa se encontraron a concentraciones de 1,75 y 2 mg/mL. Estos resultados se podrían explicar por lo hallado en otros estudios similares ⁽⁴²⁾ en miembros de la familia *Juglans*, donde se encontró capacidad de disminución de la captación de glucosa e inhibición de la protein-tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).

No se encontraron estudios previos relacionados a la actividad hipoglicemiante de esta especie en animales de experimentación; sin embargo, se han realizado ensayos clínicos ^(41,42) en seres humanos con extractos de *Juglans regia* donde se ha encontrado actividad hipoglicemiante a concentraciones de 100 mg. con diferencias significativas en comparación al tratamiento convencional (glibenclamida y metformina), a diferencia del presente estudio, donde la dosis que presentó una mejor correlación al momento de comparar las diferencias antes y después de la administración, fue la de 250 mg/kg.

En conclusión, el extracto acuoso liofilizado de *Juglans neotropica* Diels, nogal peruano, no presenta efectos tóxicos y muestra una buena capacidad antioxidante. Así mismo, se encontró buena actividad antidiabética *in vitro* a una concentración de 2000 µg/mL y también, una buena actividad hipoglicemiante *in vivo* a una concentración de 250 mg/kg.

Son necesarios futuros estudios para el empleo de *Juglans neotropica* Diels, nogal peruano, como un tratamiento alternativo natural para la diabetes y trastornos metabólicos asociados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes Association. Introduction. Diabetes Care. 1 de enero de 2017;40(Supplement 1):S1–2.
2. Inzucchi SE. Diagnosis of Diabetes. N Engl J Med. 2012;367(6):542–50.
3. Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. Acta Medica Indones. 2013;45(2):141–7.
4. Dhanya R, Arun KB, Nisha VM, Syama HP, Nisha P, Santhosh Kumar TR, *et al.* Preconditioning L6 Muscle Cells with Naringin Ameliorates Oxidative Stress and Increases Glucose Uptake. PLoS ONE. 2015;10(7):e0132429.
5. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. The Lancet. 2016;387(10027):1513–30.
6. Seguro Social de Salud (EsSalud). Presentación de los principales resultados de la encuesta nacional socioeconómica de acceso a la salud de los asegurados de EsSalud. [Internet]. Lima: EsSalud; 2016 [citado 18 de agosto de 2016]. 88 p. Disponible en: http://www.essalud.gob.pe/downloads/encuesta_nacional_socioeconomica/archivo/ENSA.pdf
7. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Perú. Enfermedades no transmisibles y transmisibles, 2015. [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática; 2016 [citado 30 de diciembre de 2016]. 144 p. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1357/index.html
8. American Diabetes Association. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment. Diabetes Care. 2017;40(Supplement 1):S64–74.

9. Diarra M, El Ouahabi H, Bouxid H, Boujraf S, Khabbal Y, Ajdi F. Medicinal Plants in Type 2 Diabetes: Therapeutic and Economical Aspects. *Int J Prev Med*. 2016;7(1):56.
10. Pinto MDS, Ranilla LG, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using in vitro models. *J Med Food*. 2009;12(2):278–91.
11. Gonzales GF, Gonzales-Castañeda C, Gasco M. A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(7):509–18.
12. Aranda-Ventura J, Villacrés J, Mego R. Efecto hipoglicémico de los extractos de *Tabebuia obscura* (tahuari oscuro) sobre ratas con diabetes *mellitus* experimental. *Rev Peru Med Integrativa* [Internet]. 5 de abril de 2016 [citado 25 de mayo de 2016];1(1). Disponible en: <http://www.rpmi.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/004>
13. Bussmann RW, Paniagua-Zambrana N, Chamorro MR, Moreira NM, del Rosario Cuadros Negri ML, Olivera J. Peril in the market-classification and dosage of species used as anti-diabetics in Lima, Peru. *J Ethnobiol Ethnomedicine*. 2013;9:37.
14. Aradhya MK, Potter D, Gao F, Simon CJ. Molecular phylogeny of *Juglans* (Juglandaceae): a biogeographic perspective. *Tree Genet Genomes*. 2007;3(4):363–78.
15. Mayolo KKA de. Peruvian natural dye plants. *Econ Bot*. 1989;43(2):181–91.
16. Juro S, Flores V, Mendoza Y, Del Carpio C. Efecto cicatrizante de las diferentes formas farmacéuticas tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels, nogal, en ratones albinos. *Folia Dermatol Peru*. 2010;21(4):19–24.
17. Bussmann RW, Glenn A, Sharon D. Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru – can traditional applications provide leads for modern science? *Indian J Tradit Knowl*. 2010;9(4):742–53.
18. Hurtado-Manrique P, Jurado Teixeira B, Ramos Llica E, Calixto Cotos M. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). *Rev Soc Quím Perú*. 2015;81(3):283–91.
19. Corral Salvado A, De la Paz Naranjo J, Concepción Evseeva E, Hernández Royero R, Rodríguez L, Lorelay D. Tamizaje, tecnología, control de calidad y farmacología del extracto fluido de *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Rev Cuba Plantas Med*. agosto de 1997;2(2):19–25.
20. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, *et al*. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(1):121–40.
21. Lebeau J, Furman C, Bernier JL, Duriez P, Teissier E, Cotelle N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(9):900–12.
22. Finney DJ. *Probit Analysis*. 2.^a ed. New York: Cambridge University Press; 1952. 318 p.
23. Artanti N, Firmansyah T, Darmawan A. Bioactivities Evaluation of Indonesian Mistletoes (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Leaves Extracts. <http://www.japsonline.com/counter.php?aid=335> [Internet]. 2012 [citado 31 de enero de 2017]; Disponible en: <http://imsear.hellis.org/handle/123456789/151065>
24. Srianta I, Kusumawati N, Nugerhani I, Artanti N, Xu GR. In vitro α -glucosidase inhibitory activity of Monascus-fermented durian seed extracts. *Int Food Res J*. 2013;20(2):533–6.
25. Llave Gomero FJ. Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en atención primaria. *Med Fam*. 2008;8(2):98–111.
26. García-Alcalá H, Meaney-Mendiolea E, Vargas-Ayala G, Pulido ME, Aldrete-Velasco J. Revisión actual de los conocimientos sobre la absorción intestinal de carbohidratos y su relación con la prevención del riesgo cardiovascular. *Med Interna México*. 2011;27(3):270–80.
27. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303–6.
28. The World Medical Association. WMA Statement on Animal Use in Biomedical Research. octubre de 2006; Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policias/a18/>
29. Yu X, Zhao M, Liu F, Zeng S, Hu J. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. *Food Res Int*. 2013;51(1):397–403.
30. Quan J, Yin X, Jin M, Shen M. Study on the inhibition of α -glucosidase by soyasaponins. *J Chin Med Mater*. 2003;26(9):654–6.
31. Ban JO, Hwang IG, Kim TM, Hwang BY, Lee US, Jeong H-S, *et al*. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF- κ B in human colon cancer cells. *Arch Pharm Res*. 2007;30(11):1455–63.
32. Manrique H, Estefania P. Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” [Internet]. [Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014 [citado 30 de enero de 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3748>
33. R RJ, Salazar ME, Gamarra G, Arias GC, Whu DY, Acosta EM, *et al*. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos de *Juglans neotropica* DIELS, *Piper lineatum* RUIZ&PAV. y *Terminalia catappa* L. *Cienc E Investig*. 2013;16(1):32–7.
34. Fuertes CM, Jurado B, Gordillo GC, Negrón LP, Núñez E, Esteban M, *et al*. Estudio integral de plantas Biocidas del algodonero. *Cienc E Investig*. 2014;13(1):34–41.
35. Lima VN, Oliveira-Tintino CDM, Santos ES, Morais LP, Tintino SR, Freitas TS, *et al*. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb Pathog*. 2016;99:56–61.
36. Honda S, Masuda T. Identification of Pyrogallol in the Ethyl Acetate-Soluble Part of Coffee as the Main Contributor to

- Its Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. J Agric Food Chem. 2016;64(41):7743–9.
37. Panth N, Paudel KR, Karki R. Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia*. J Integr Med. 2016;14(5):359–73.
 38. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Radic Res. 2015;49(5):633–49.
 39. Ahmad H, Khan I, Wahid A. Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. J Tradit Chin Med. 2012;32(3):411–4.
 40. Asgharpour F, Pouramir M, Khalilpour A, Asgharpour Alamdar S, Rezaei M. Antioxidant Activity and Glucose Diffusion Relationship of Traditional Medicinal Antihyperglycemic Plant Extracts. Int J Mol Cell Med. 2013;2(4):169–76.
 41. Rahimzadeh M, Jahanshahi S, Moein S, Moein MR. Evaluation of alpha- amylase inhibition by *Urtica dioica* and *Juglans regia* extracts. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(6):465–9.
 42. Pitschmann A, Zehl M, Atanasov AG, Dirsch VM, Heiss E, Glasl S. Walnut leaf extract inhibits PTP1B and enhances glucose-uptake in vitro. J Ethnopharmacol. 2014;152(3):599–602.
 43. Hosseini S, Jamshidi L, Mehrzadi S, Mohammad K, Najmizadeh AR, Alimoradi H, *et al*. Effects of *Juglans regia* L. leaf extract on hyperglycemia and lipid profiles in type two diabetic patients: A randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. J Ethnopharmacol. 2014;152(3):451–6.
 44. Hosseini S, Huseini HF, Larijani B, Mohammad K, Najmizadeh A, Nourijelyani K, *et al*. The hypoglycemic effect of *Juglans regia* leaves aqueous extract in diabetic patients: A first human trial. DARU J Pharm Sci. 2014;22:19.