



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

TESIS

**Determinación de la influencia del extracto de las hojas de
Tecoma stans (Bignoniaceae) sobre la glicemia de ratones normo
e hiperglucémicos**

Elizabeth Rossana Rivas de Bernal

Tutores: Prof. Dr. Nelson L. Alvarenga

Prof. Dr. Derlis A. Ibarrola

San Lorenzo – Paraguay

Agosto – 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**Determinación de la influencia del extracto de las hojas de
Tecoma stans (Bignoniaceae) sobre la glicemia de ratones normo
e hiperglucémicos**

Tesis presentada por la Química Farmacéutica Elizabeth Rossana
Rivas de Bernal a la Coordinación de Postgrado, para optar por el
título de Máster en Ciencias Farmacéuticas

Ciudad Universitaria, San Lorenzo

PARAGUAY

AGOSTO 2021

Prof. Dr. Nelson L. Alvarenga – Prof. Dr. Derlis A. Ibarrola, de la Facultad de Ciencias Químicas

TUTORES DE LA PRESENTE TESIS

Autoriza: La presentación del trabajo titulado “**Determinación de la influencia del extracto de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) sobre la glicemia de ratones normo e hiperglucémicos**”.

Dado que el mismo reúne la calidad y cantidad de trabajo necesario para constituir la TESIS DE MAESTRÍA que la Q.F. Elizabeth Rossana Rivas de Bernal presenta para aspirar al grado de Máster en Ciencias Farmacéuticas.

San Lorenzo, 27 del mes de Agosto del 2021

Prof. Dr. Nelson L. Alvarenga

Prof. Dr. Derlis A. Ibarrola

Facultad de Ciencias Químicas



Aprobado en fecha 27 de Agosto de 2021

Tribunal examinador

Prof. Dra. María del Carmen Hellión

Facultad de Ciencias Químicas. U.N.A.

Prof. MSc. Rosa Luisa Degen de Arrúa

Facultad de Ciencias Químicas. U.N.A.

Prof. Dra. Olga Yolanda Maciel de Segovia

Facultad de Ciencias Químicas. U.N.A.

Prof. Dra. Yenny Patricia González Villalba

Facultad de Ciencias Químicas. U.N.A.

DEDICATORIA

Lo dedico a Dios, mamá, papá, hermanos, esposo, hijo, suegros, cuñados, amigos y profesores quienes fueron mi apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a mis Tutores, profesores y compañeros en el proceso de este trabajo.

Contenido

Determinación de la influencia del extracto de las hojas de <i>Tecoma stans</i> (Bignoniaceae) sobre la glicemia de ratones normo e hiperglucémicos	9
Resumen	9
1.- INTRODUCCIÓN	11
2.- JUSTIFICACIÓN	14
3.- OBJETIVOS.....	15
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1.- MATERIAL VEGETAL.....	15
4.2.- PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE <i>TECOMA STANS</i>	17
4.3.- DETERMINACIÓN DE HUELLA DACTILAR CROMATOGRÁFICA DEL ETs POR LCMS.....	17
4.4.- REACTIVOS, FÁRMACOS Y DISPOSITIVO MÉDICO–ELECTRÓNICO UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS FARMACOLÓGICOS.....	18
4.5.- EQUIPOS Y MATERIALES	18
4.6.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS	18
4.7.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	19
4.8.- TOXICIDAD AGUDA Y EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE ETs EN RATONES.....	19
4.9.- INDUCCIÓN DE HIPERGLICEMIA	19
4.9.1.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL ETs SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS.....	20
4.9.2.- EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD DE ETs SOBRE LA TOLERANCIA ORAL DE LA GLUCOSA DE RATONES NORMO E HIPERGLICÉMICOS	22
4.10.- ASUNTOS ÉTICOS.....	23

4.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
5.- RESULTADOS.....	24
5.1.- ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE ET _s	24
5.2.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>T. STANS</i>	24
5.3.- DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA Y EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL ET _s EN RATONES.....	26
5.4.- INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL AGUDA DE ET _s SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS.....	26
5.5.- INFLUENCIA DE ET _s SOBRE LA TOLERANCIA ORAL DE LA GLUCOSA DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS.....	28
5.6.- INFLUENCIA DE ET _s SOBRE EL PESO CORPORAL DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS TRATADOS ORALMENTE DURANTE 28 DÍAS	29
5.7.- INFLUENCIA DE ET _s SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES HIPERGLUCÉMICOS TRATADOS ORALMENTE DURANTE 28 DÍAS	31
5.8.- INFLUENCIA DE ET _s SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMOGLUCÉMICOS TRATADOS ORALMENTE DURANTE 28 DÍAS	33
6.- DISCUSIÓN.....	34
7.- CONCLUSIONES	37
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
9.- ANEXOS.....	42

Determinación de la influencia del extracto de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) sobre la glicemia de ratones normo e hiperglicémicos

Resumen

El propósito de este trabajo fue evaluar la influencia del extracto metanólico de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) (ETs) sobre la glicemia de ratones: a) normo glicémicos b) e hiperglicémicos por aloxano. El trabajo es de diseño experimental y la metodología consistió por un lado en el análisis fitoquímico preliminar, que utiliza reacciones de coloración/precipitación, así como cromatografía en capa fina para identificar grupos de metabolitos secundarios, la determinación de una “huella dactilar” cromatográfica por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (LCMS), por el otro lado, en evaluar la dosis letal e influencia sobre el comportamiento general de ratones con dosis seleccionadas (deducidas de la DL50) para emplearlo en el ensayo principal. El estudio cualitativo de la composición química de ETs mostró la presencia de alcaloides diversos, esteroides y/o triterpenoides, leucoantocianidinas y terpenos, el análisis de los espectros de masa obtenidos de los picos presentes en el cromatograma del extracto de *T. stans* permitió identificar algunos componentes del mismo, siendo estos flavonoides como la quercetina, apigenina, kaempferol, crisoeriol y alcaloides como la tecomina y tecostanina. La administración oral de hasta 3000mg/kg de ETs no indujo letalidad en 24h, indicando baja toxicidad en ratones. ETs no afecta el comportamiento general de ratones sometidos a las dosis seleccionadas para el ensayo principal. El tratamiento oral de grupos de animales (5 grupos patológicos-hiperglicémicos y 5 grupos normo glicémicos) se realizó durante 28 días con solución salina, ETs (125, 250 y 500 mg/kg) y tolbutamida (200 mg/kg) como fármaco patrón. La dosis de 125 mg/kg de ETs redujo el nivel de hiperglicemia en un 33% al final del tratamiento de 28 días en los grupos patológicos. Además, mantuvo estable el peso corporal a niveles bajos del grupo tratado con la misma dosis. Asimismo, la administración aguda de las dosis de ETs a todos los grupos de animales (normo e hiperglicémicos) no indujeron variación significativa de la glicemia durante las 7 h de observación. Igualmente, la tolerancia oral a la glucosa no fue afectada por el tratamiento con 125 mg/kg de ETs. Por tanto, basado en los resultados concluimos que ETS es poco tóxico y manifiesta capacidad de reducir la glicemia de animales hiperglicémicos inducidos por aloxano y cuyo mecanismo de acción y componente(s) involucrado(s) desconocemos y podría estar relacionado en parte a la inhibición de la alfa glucosidasa y la lipasa pancreática. Los resultados promueven la realización de estudios adicionales químicos y farmacológicos complementarios para responder las interrogantes resultantes.

Palabras claves: Extracto metanólico, *Tecoma stans*, glicemia, LCMS.

Determination of the influence of the extract of the leaves of *Tecoma stans* (Bignoniaceae) on the glycemia of normo and hyperglycemic mice

Summary

The purpose of this work was to evaluate the influence of the methanolic extract of the leaves of *Tecoma stans* (Bignoniaceae) (ETs) on the glycemia of mice: a) normoglycemic b) and hyperglycemic by alloxane. The work is of experimental design and the methodology consisted on the one hand in the preliminary phytochemical analysis, which uses coloration / precipitation reactions, as well as thin-layer chromatography to identify groups of secondary metabolites, the determination of a chromatographic "fingerprint" by High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LCMS), on the other hand, in evaluating the lethal dose and influence on the general behavior of mice with selected doses (deduced from the LD50) to be used in the main test. The qualitative study of the chemical composition of ETs showed the presence of various alkaloids, steroids and / or triterpenoids, leucoanthocyanidins and terpenes, the analysis of the mass spectra obtained from the peaks present in the chromatogram of the *T. stans* extract allowed to identify some components thereof, these flavonoids being quercetin, apigenin, kaempferol, chrysoeriol and alkaloids such as thecomine and tecostanine. Oral administration of up to 3000mg / kg of ETs did not induce lethality in 24h, indicating low toxicity in mice. ETs do not affect the general behavior of mice subjected to the doses selected for the main test. Oral treatment of groups of animals (5 pathological-hyperglycemic groups and 5 normo-glycemic groups) was carried out for 28 days with saline, ETs (125, 250 and 500 mg / kg) and tolbutamide (200 mg / kg) as standard drug. The 125 mg / kg dose of ETs reduced the level of hyperglycemia by 33% at the end of the 28-day treatment in the pathological groups. In addition, it kept body weight stable at low levels in the group treated with the same dose. Likewise, the acute administration of the doses of ETs to all groups of animals (normal and hyperglycemic) did not induce significant variation in glycemia during the 7 h of observation. Likewise, oral glucose tolerance was not affected by treatment with 125 mg / kg of ETs. Therefore, based on the results, we conclude that ETS is not very toxic and shows the ability to reduce the glycemia of hyperglycemic animals induced by alloxane and whose mechanism of action and component (s) involved are unknown and could be related in part to inhibition. alpha glucosidase and pancreatic lipase. The results promote the performance of additional complementary chemical and pharmacological studies to answer the resulting questions.

Keywords: Methanolic extract, *Tecoma stans*, glycemia, LCMS.

1.- INTRODUCCIÓN

En 2006 había aproximadamente 180 millones de personas con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en todo el mundo, particularmente en países en desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2006).¹

El extracto acuoso de *Tecoma stans* (TAE) se usa ampliamente como antidiabético en la medicina tradicional de México; Su uso racional es controvertido. Se evaluó la inhibición *in vivo* e *in vitro* de las glucosidasas intestinales como el posible modo de acción de TAE en modelos animales con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), y para analizar los efectos subcrónicos de su administración en lípidos y niveles de glucosa en sangre. ¹

La administración intravenosa de la infusión de *Tecoma* en perros normales produce una respuesta hipoglucémica temprana e hipotensión arterial seguida por una lenta disminución de los valores de glucosa en sangre con una concomitante hipertrigliceridemia; No se detectaron cambios importantes en la insulina inmunorreactiva. La frecuencia cardíaca aumentó gradualmente después de la administración del extracto en los primeros 60 minutos y persistió durante varias horas. Los efectos observados en parámetros de la sangre parecen estar relacionados con el metabolismo del glucógeno hepático, que implica una activación de la glucogenólisis. El efecto de disminución de la glicemia tardía de la infusión de *Tecoma stans* podría considerarse secundario a la producción de la glucosa hepática observada. El estudio representa un intento de dilucidar lo atribuido popularmente.²

Tecoma stans es utilizado tradicionalmente por varios grupos étnicos en México y América Central para tratar la diabetes. Esta especie se menciona en la mayoría de los estudios etnofarmacológicos enfocados en plantas medicinales recopilados en México utilizadas como tratamiento antidiabético.³

Recientemente, se descubrió que esta planta muestra un alto nivel de actividad inhibidora de la lipasa pancreática. ³

Se efectuó una caracterización química y farmacológica *in vitro* de algunos de los compuestos responsables de actividad antilipasa.³

La purificación química bioguiada del extracto hidroalcohólico produjo una fracción orgánica (acetato de etilo, TsEA), fracciones de flavona (TsC1F13), (TsC1F15), (TsC1F16) y compuestos aislados (crisoeriol, apigenina, luteolina y verbascósido) con

la capacidad para inhibir la actividad de la lipasa pancreática. La fracción más activa (TsC2F6B) estaba constituida por una mezcla de crisoeriol (5,7-dihidroxi-2-[4-hidroxi-3-metoxifenil] cromen-4-ona, 96%) y apigenina (4%). Esta mezcla de flavonas mostró un porcentaje de inhibición del 85% cuando se evaluó a 0,25 mg / ml. La luteolina y el crisoeriol produjeron una inhibición mixta y no competitiva con valores de concentración inhibidora media (IC₅₀: 63 y 158 Mm) respectivamente. El contenido de crisoeriol también se cuantificó en el extracto hidroalcohólico (TsHAE) y la fracción orgánica (TsEA) con 1% y 7% respectivamente. Todo esto confirma que una alta proporción de ambas flavonas producen un aumento de la actividad biológica debido a que presentan la mayor inhibición de la enzima lipasa de forma dependiente de la concentración.³

Datos del Programa Nacional de diabetes de enero a octubre del 2020 indican que la diabetes en Paraguay afecta actualmente al 9.7 % de la población total, aproximadamente 700.000 personas viven con esta patología, de las cuales solo el 50% conoce su enfermedad.⁴

Tecoma stans es una especie de planta perenne caducifolia con abundante floración, perteneciente a la familia Bignoniaceae. Es conocida comúnmente como amarguito, candelillo, copete, flor amarilla, fresnillo, sardinillo, sauco amarillo, trompetilla, tronadora, vainillo o x'kanlol.¹⁰ *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth es el nombre aceptado por el catálogo The Plant List.¹³ En Paraguay se lo conoce como lapachito o campanita.

Se cultiva en diversos hábitats y condiciones climáticas alrededor del mundo debido a su alto nivel de adaptación y rápido crecimiento. Sus flores abundantes de vivos colores amarillos favorecen su empleo como planta ornamental en calles, avenidas, parques y jardines.⁵

La especie *Tecoma stans* es una planta arbórea perenne de porte bajo, de 4-6 m de altura, con un dosel disperso e irregular. El tronco se encuentra ramificado desde la base con ramas delgadas y escamosas, la corteza es de color castaño-grisáceo, fibrosa, áspera y hendidada.⁵

Las hojas son compuestas o imparipinnadas de 25 cm de largo y de 3-11 folíolos elípticos u oblongos con bordes aserrados, ápice acuminado y color verde.⁵

Las inflorescencias se presentan en racimos terminales con la corola tubular o campanulada de 3-5 cm, fragantes y de brillantes tonos amarillos. El fruto es una capsula -vaina- dehiscente de 20 cm de largo, de color café oscuro al madurar y con numerosas semillas. Las semillas planas de ápice blanquecino y alas traslucidas en los extremos miden 2-5 cm de largo por 8-10 mm de ancho. Es una planta hermafrodita, ya que posee los órganos femeninos -pistilos- y masculinos -estambres- en la misma flor.⁵

Tecoma stans es una especie adaptada a los ecosistemas tropicales y subtropicales de Centroamérica. Se ubica en bosques tropicales caducifolios y perennifolios, bosques templados de altura, matorrales xerófilos y áreas del litoral intertropical.⁵

Es una especie nativa de México y se distribuye en los Estados Unidos desde el sur de la Florida, incluyendo Texas y Arizona. Además, se localiza en Centroamérica y el Caribe, y a través de los Andes por Suramérica hasta el norte de Argentina.⁵

En el “Catálogo de Plantas Medicinales usadas en Paraguay” no se encuentran datos de su uso tradicional en el País.⁶

Sin embargo, en algunos países como México y actualmente pobladores de la ciudad de Itauguá de Paraguay utilizan tradicionalmente infusiones de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) alegando que producen un efecto de disminución de la hiperglucemia. Lo utilizan como medicina alternativa o concomitante con los medicamentos utilizados para el tratamiento de la diabetes.

En este trabajo se ha determinado la influencia de la administración oral crónica del extracto de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) recolectadas en la ciudad de Itauguá sobre la glicemia de ratones normo e hiperglucémicos (inducidos por aloxano) tratados durante 4 semanas. Esta propuesta apuesta a una posible alternativa de futuros tratamientos o validar el uso tradicional en pacientes con diabetes.

2.- JUSTIFICACIÓN

En Paraguay la diabetes es una patología crónica que representa actualmente un porcentaje considerable de la población total, debido a esto muchas personas diagnosticadas buscan una alternativa para tratar o mejorar esta condición, utilizando medicinas alternativas como infusiones de plantas medicinales. El interés de estudiar la influencia del extracto de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) sobre la glicemia radica en que pobladores de la ciudad de Itauguá lo utilizan como medicina por el conocimiento del uso tradicional en otros países, alegan que sienten mejoría y la glicemia en sangre fue normalizada o disminuida (ver encuestas en anexos). Realizando una búsqueda en los mercados de San Lorenzo e Itauguá no se encuentra a la venta como planta medicinal, tampoco se encuentran datos bibliográficos de estudios químicos o farmacológicos realizados en Paraguay.

Por ello esta investigación tiene como finalidad iniciar la validación del uso medicinal atribuido a la infusión de las hojas de *T. stans* (Bignoniaceae) para el tratamiento popular anti hiperglicemiante. Para el efecto, se propone por un lado el estudio del extracto metanólico, caracterizar la composición química del extracto por medio de un análisis fitoquímico preliminar, realizar una “huella dactilar” cromatográfica por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (LCMS) y por el otro lado, determinar la influencia de la administración oral crónica del extracto de las hojas de *T. stans* (Bignoniaceae) sobre el peso corporal y la glicemia de ratones normo e hiperglucémicos (inducidos por aloxano) tratados durante 4 semanas. Evaluar la variación aguda de la glicemia y la tolerancia oral a la sobrecarga de glucosa. Esta propuesta apuesta a conocimientos sobre la seguridad, la eficacia de *T. stans* y el fortalecimiento de la posible evaluación clínica futura, para brindar una alternativa de futuros tratamientos coadyuvantes en pacientes con diabetes.

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia del extracto metanólico de las hojas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) sobre la glicemia de ratones normo e hiperglucémicos.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la composición química del extracto por medio de un análisis fitoquímico preliminar.

Realizar una “huella dactilar” cromatográfica por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (LCMS).

Determinar la influencia del extracto metanólico de las hojas de *Tecoma stans* sobre la glicemia de ratones normoglucémicos.

Determinar la influencia del extracto metanólico de las hojas de *Tecoma stans* sobre la glicemia de ratones con hiperglucemia inducida por aloxano.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental.

4.1.- MATERIAL VEGETAL

DESCRIPCIÓN

Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth es el nombre aceptado por The Plant List.¹³ Las hojas de Ts se recolectaron en la ciudad de Itauguá de la República del Paraguay en su hábitat natural. El mismo fue identificado por investigadores del Departamento de Botánica y se depositó un ejemplar de la planta en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción indexado con el número 4.810 Ver figura 1.

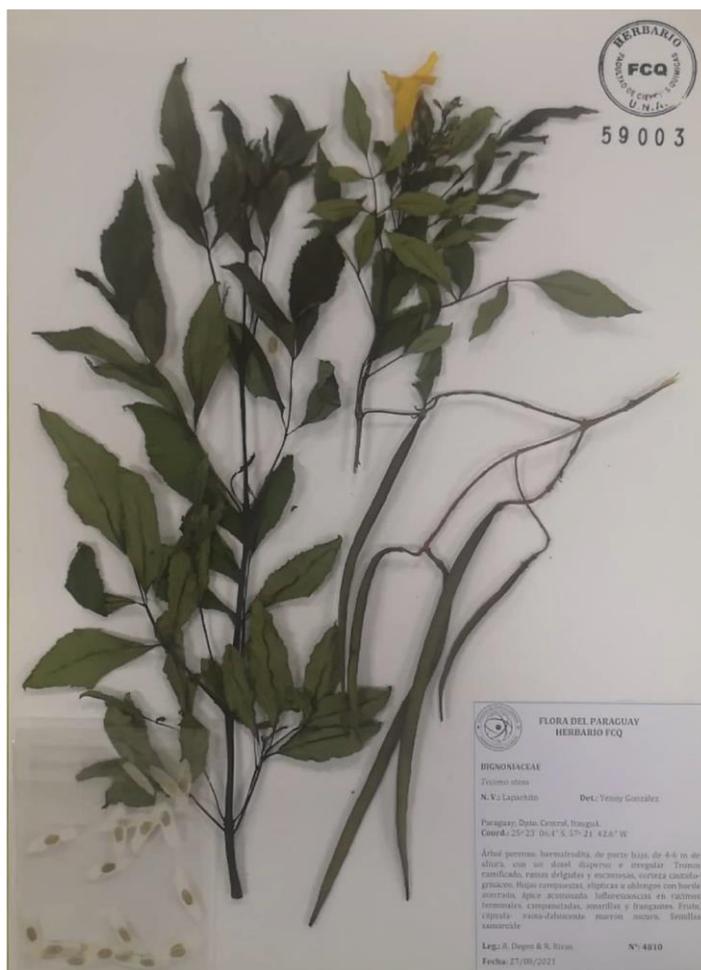


Figura 1: Ejemplar de la planta en el herbario *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción

4.2.- PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *TECOMA STANS*

El material vegetal fue secado y reducido a polvo en un molino eléctrico. Se procedió a la preparación del extracto y al análisis fitoquímico en el Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción. La obtención del extracto se efectuó con la metodología propia del Departamento de Fitoquímica.

El material vegetal triturado fue extraído por maceración con metanol grado HPLC asistida por ultrasonido. Para ello se colocó el material (200 g) con 1,5 L de solvente. Se sometió a un baño de ultrasonido durante 30 minutos por tres veces con intervalos de 15 minutos. Se dejó reposar por 24 horas y luego se procedió a extraer filtrando al vacío sobre papel de filtro. Se repuso el solvente y el proceso se repitió dos veces más. Los extractos fueron recolectados y se eliminó el solvente a presión reducida empleando un evaporador rotatorio. El extracto crudo semisólido de *Tecoma stans* (ETs) fue almacenado en recipiente con tapa hermética y fue empleado para los ensayos químicos y fármaco-toxicológicos propuestos. Se obtuvo 54 gramos del extracto bruto.

Para el análisis fitoquímico preliminar, se empleó la metodología descrita por Sanabria-Galindo que utiliza reacciones de coloración/precipitación, así como cromatografía en capa fina para identificar grupos de metabolitos secundarios.⁷

4.3.- DETERMINACIÓN DE HUELLA DACTILAR CROMATOGRÁFICA DEL ETs POR LCMS

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters (Milford, MA, EE.UU.) Acquity UPLC acoplado con un espectrómetro de masas Xevo TQD QqQ-MS como detector. Para la separación de los compuestos, se utilizó una columna Phenomenex KINETEX core-shell EVO-C18 (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. La fase móvil fue metanol (fase A) y agua (Fase B) (grado LC-MS, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), ambos conteniendo ácido fórmico al 0,1% y formato de amonio 10 mM. La elución se realizó a una velocidad de flujo de 0,3 mL / min en modo de gradiente, como sigue: 0–0,7 min, 80% –80% A; 0,7–3,2 min, 80% –60% A; 3,2–7,6 min, 60% –20% A; 7,6–8,3 min, 20% –0% A; 8,3–10,4 min, 0% –80% A, 10,4–13 min, 80% –

80% A. Las muestras se disolvieron en metanol LC-MS, se filtraron a través de filtros de jeringa de nailon de 0,22 μm y se inyectaron a una concentración de 5 mg / mL.

Los espectros de MS se adquirieron utilizando el modo de barrido completo (m/z 80-800, a una velocidad de 2000 m/z por segundo) con ESI como fuente de ionización en los modos de ionización negativo y positivo. El gas nebulizador y el gas de secado fueron nitrógeno. Las condiciones de MS fueron las siguientes: el voltaje capilar de electropulverización fue de 2,5 kV, la temperatura de la fuente fue de 150 °C, la temperatura de desolvatación fue de 350 °C, el flujo de gas de cono fue de 80 L / h y el flujo de gas de desolvatación fue de 900 L / h.

4.4.- REACTIVOS, FÁRMACOS Y DISPOSITIVO MÉDICO ELECTRÓNICO UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

Los reactivos y fármacos empleados en este trabajo de investigación son de calidad analítica. Se utilizaron monohidrato de Aloxano, Tolbutamida, obtenidos de SIGMA (USA). La glucosa fue obtenida de Milipore (Francia). El ácido cítrico, citrato de sodio, alcohol etílico, agua destilada, propilenglicol, tiras reactivas y detector Dr. Gluco para el control del nivel glicémico fueron obtenidos localmente.

4.5.- EQUIPOS Y MATERIALES

Equipos: Molino eléctrico, cromatógrafo líquido de ultra alta eficacia Waters Acquity (Milford, MA, EE.UU.) acoplado con un espectrómetro de masas Xevo TQD QqQ-MS, baño maría QUIMIS, rota vapor Yamato, balanza analítica Mettler, balanza granataria Alosep, detector Dr. Gluco para el control del nivel glicémico.

Materiales: Vidrierías diversas, jeringas, guantes de látex y de vinilo, cánulas intragástricas, mascarillas, tiras reactivas Dr. Gluco para el control del nivel glicémico.

4.6.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Aloxano fue disuelto en buffer de citrato sódico/ácido cítrico a pH 4.5. Las concentraciones iniciales para el ensayo de hiperglicemia piloto fueron de 10 y 15 mg/mL. Luego de evaluar la respuesta fue decidido utilizar la concentración de 13 mg/mL que representa la dosis de 130 mg/kg de aloxano.

Tolbutamida fue disuelta en una solución mezcla compuesta de 10% de alcohol etílico, 40 % de propilenglicol y 50 % de agua destilada (v/v). La concentración de tolbutamida fue de 20 mg/mL y empleándose soluciones frescas recientemente preparada cada día.

El extracto fue disuelto en agua destilada a concentraciones de 12,5, 25,0 y 50,0 mg/mL para las dosis de 125, 250 y 500 mg/kg de peso corporal.

4.7.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀), la evaluación del comportamiento general y los estudios sobre el nivel de glicemia se emplearon ratones albinos hembras de entre (15-25) g de peso corporal, con aproximadamente 2,5 meses de edad, criados en el bioterio del Departamento de Farmacología. Los trabajos farmacológicos se ejecutaron en salas de experimentación con control ambiental adecuado (24±2 °C de temperatura y 50-60 % de humedad relativa) en las instalaciones del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción.

4.8.- TOXICIDAD AGUDA Y EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE ETs EN RATONES

Para el estudio de la DL₅₀ y comportamiento (Irwin, 1968; OECD, 2001; Roux et al., 2004) se utilizaron grupos de 5 ratones, a los que se les administró dosis fijas de 3000 mg/kg como dosis única máxima y 125, 250 y 500 mg/kg de peso corporal respectivamente ETs. Se utilizó agua destilada para disolver el extracto y solución salina 0,1 mL/10 g de peso corporal para el grupo control. Se verificó la mortalidad y los efectos durante un período de 24 horas. Los parámetros de locomoción, exploración y emocionalidad fueron evaluados en cada uno de los ratones. Las variaciones de parámetros comportamentales fueron registradas cada 5, 10, 15, 30, 60, 120 minutos y luego de las 24 horas del tratamiento.

4.9.- INDUCCIÓN DE HIPERGLICEMIA

Se empleó la hiperglucemia inducida por aloxano como método de diabetes experimental (Lenzen, 2008). Los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y se trataron con una única dosis de aloxano (130 mg/kg i.p.) en vehículo Buffer de ácido cítrico y citrato de sodio ajustado a pH 4,5 con HCl o NaOH. Después de 48 h,

se midieron las concentraciones de glucosa en sangre en ayunas mediante tiras reactivas correspondientes al dispositivo de medición Gluco Dr. Los animales con una concentración de glucosa en sangre superior a 200 mg/dL se consideraron hiperglicémicos y fueron incluidos para el trabajo de investigación.

4.9.1.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL ETs SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS

Los animales fueron asignados aleatoriamente a diez diferentes grupos, cinco grupos patológicos (con hiperglucemia experimental) y cinco grupos sanos (normo glicémicos). El protocolo del tratamiento se esquematiza en la figura 2. El tratamiento con las muestras se efectuó durante el periodo de 4 semanas, con administraciones diarias con dosis únicas a animales en condiciones de ayunas y hasta el final con acceso libre al agua de bebida.

Para verificar la cinética de variación aguda de la glicemia de ratones sometidos a la primera dosis, se realizó la determinación de la glicemia (modelo agudo) de los animales a las 0, 1, 3, 5 y 7 h del tratamiento inicial (figura 3). Este ensayo agudo formó parte inicial (primer día) de la modalidad crónica, a efectos de reducir y optimizar el número de animales utilizados, y coleccionar la mayor cantidad de informaciones del estudio farmacológico. Cada día antes del ensayo, los animales fueron sometidos a ayunas de 12 h con libre acceso al agua de bebida durante ese tiempo y durante todo el experimento. Básicamente, dos grupos (G1 Hph-control y G6 Norg-control) recibieron el vehículo (0.1 mL / 10 g de peso corporal), otros 6 grupos (G2-4 y G7-9) recibieron dosis de 125, 250 y 500 mg/kg p.o., del ETs respectivamente y por último dos grupos (G5 y G10) fueron tratados con tolbutamida (200 mg/kg) como control antidiabético positivo.

En la prueba crónica, cada animal recibió una vez al día durante 28 días, el vehículo, tolbutamida y las dosis del extracto, respectivamente. La glicemia de cada grupo se midió a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.⁸

Además, cada grupo recibió una dieta balanceada de 5 gramos por cada ratón y el peso corporal semanal fue registrado y tabulado adecuadamente.

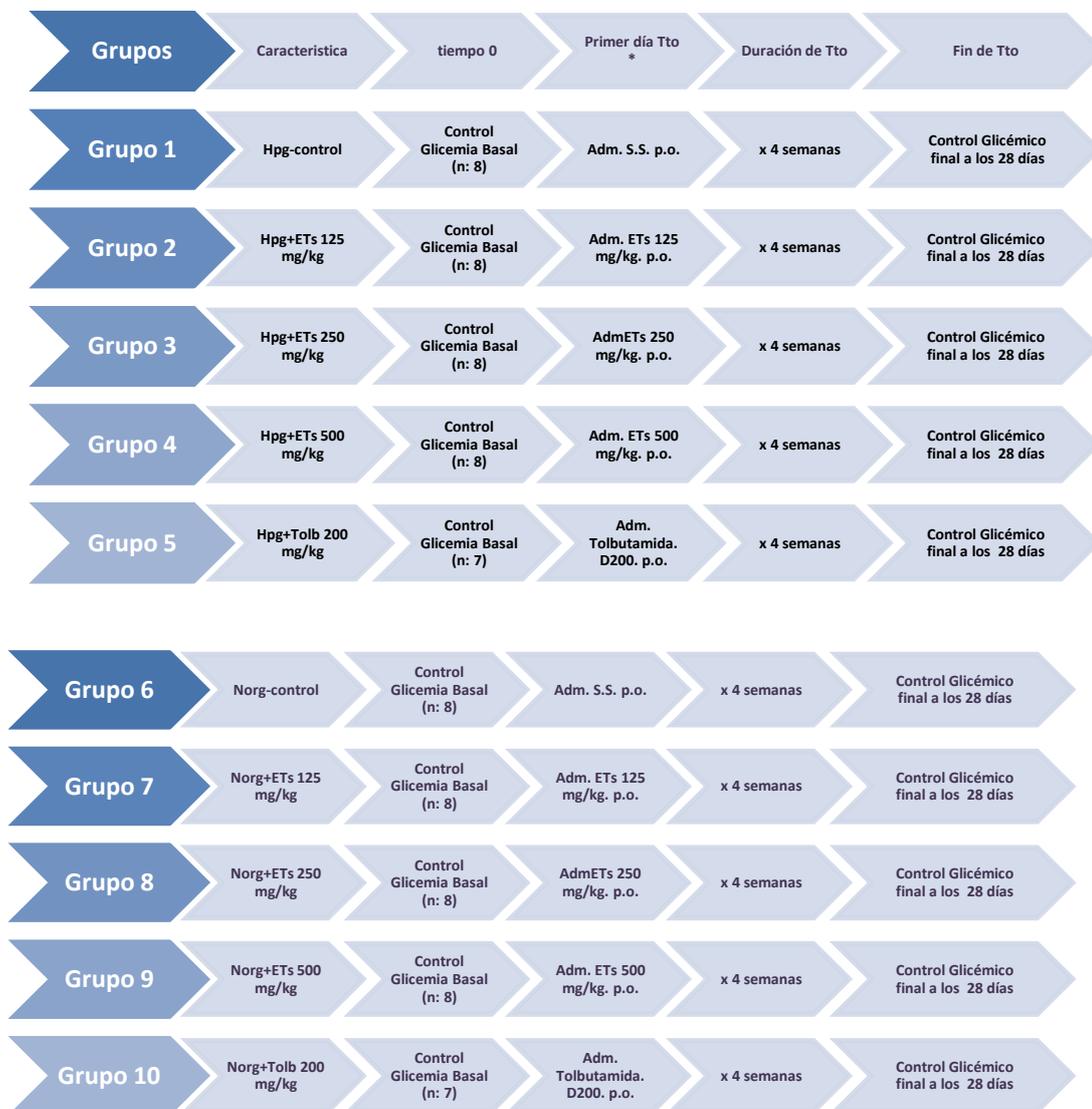


Figura 2. Distribución de grupos experimentales para la evaluación de la influencia del tratamiento oral crónico sobre la glicemia de ratones normo e hiperglucémicos (inducidos por aloxano). Abreviaturas (Norg= normoglucémicos; Hpg= hiperglucémicos; ETs= extracto de *Tecoma stans*; Tolb= tolbutamida; p.o. = vía oral; n = número de animales; S.S.= solución salina).

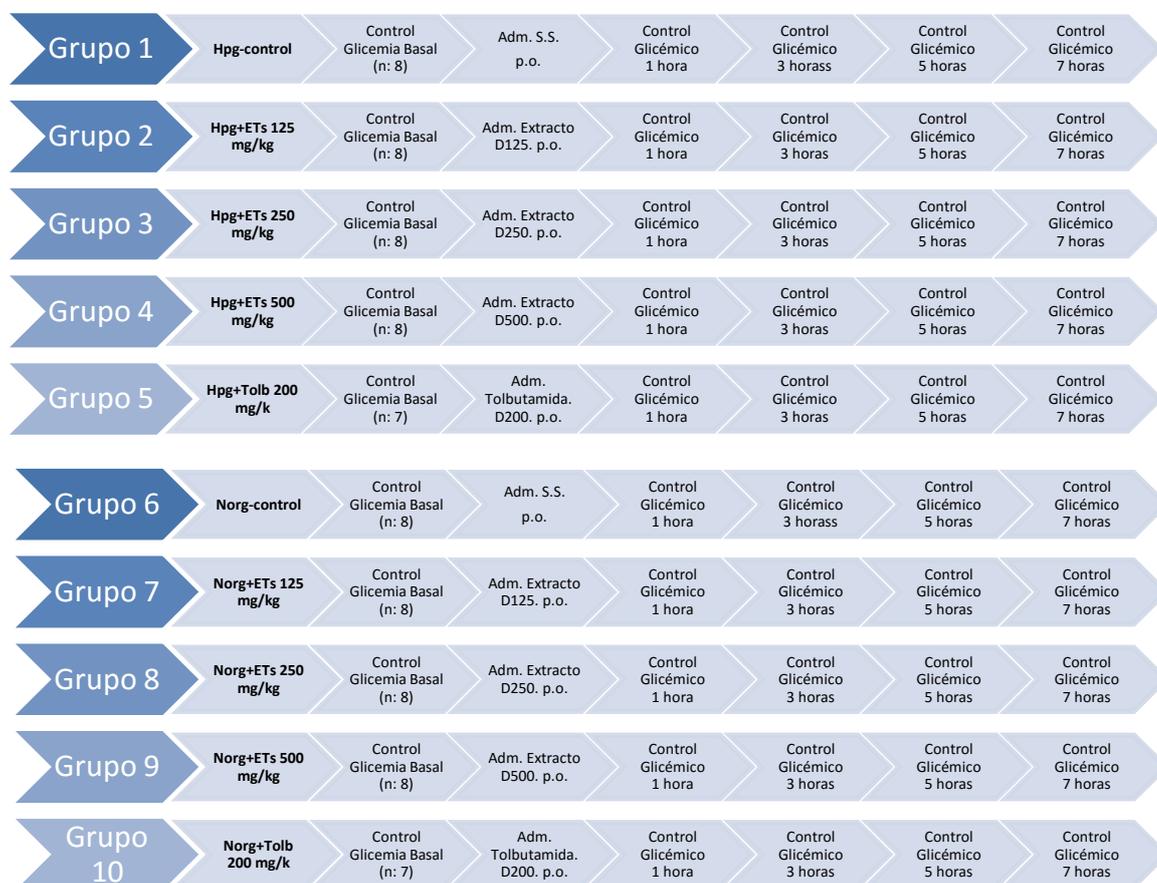


Figura 3. Protocolo de tratamiento agudo. Distribución de grupos experimentales para la evaluación de la influencia del tratamiento oral agudo sobre la glicemia de ratones normo e hiperglicémicos (inducidos por aloxano). Abreviaturas (Norg= normo glicémicos; Hpg= hiperglicémicos; ETs= extracto de Tecoma stans; Tolb= tolbutamida; p.o. = vía oral; n = número de animales; S.S.= solución salina).

4.9.2.- EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD DE ETs SOBRE LA TOLERANCIA ORAL DE LA GLUCOSA DE RATONES NORMO E HIPERGLICÉMICOS

Se administró una solución de glucosa al 50% p/v a los ratones del G6 Norg, G7 Norg y G1 Hpg, G2 Hpg para la evaluación de la tolerancia a la glucosa, se realizaron controles de glicemia a las 0, 30, 60, 90 y 120 minutos.

El ensayo de tolerancia oral de la glucosa fue realizado en ratones normo e hiperglicémicos a la cuarta semana del tratamiento crónico a fin de verificar la existencia o no de variaciones en la curva de la glicemia de los animales (Aguilar-Santamaría et al., 2009).

Dos grupos controles (Norg-control y Hipg-control) recibieron el vehículo (0.1 ml/10g de peso corporal) y dos grupos (Norg-ETs-125 mg/kg y Hipg- ETs-125 mg/kg) recibieron el extracto, fueron sometidos a la sobrecarga oral de glucosa 50% p/v y la glicemia fue medida a 0, 30, 60, 90 y 120 min. del tratamiento.

4.10.- ASUNTOS ÉTICOS

Al tratarse de un estudio experimental con animales de laboratorio, se consideró a los mismos como reactivos biológicos y se trabajó de acuerdo con las normas establecidas en la Comisión de Ética de la Comunidad Europea.⁹

El manejo de los animales se realizó por procedimientos estandarizados y la regla básica a seguir es que “todo animal tratado debe ser sacrificado”, siendo estos depositados en un envoltorio de papel en un congelador para luego ser desechado por la empresa contratada para la disposición final de los mismos, se utilizó para los ensayos el número mínimo necesario de 8 ratones como el grupo mayoritario estimando en este caso efectos secundarios no contemplados, y el menor tiempo de duración de la observación requerida para obtener datos consistentes, cada animal fue empleado una sola vez.

El protocolo fue sometido a consideración del Comité de Ética de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas, UNA por el cual fue aprobado con el código 705 /2021.

4.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se efectuó la gestión y análisis estadísticos de los datos mediante el uso de regresión lineal o ANOVA seguida de comparaciones múltiples o el test de *Student* (t-test) según los datos utilizando el software bioestadístico Prism 7.0. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5.- RESULTADOS

5.1.- ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE ETs

El estudio cualitativo de la composición química de ETs denota presencia de alcaloides diversos, esteroides y/o triterpenoides, leucoantocianidinas y terpenos (cuadro 1)

TABLA 1: Análisis fitoquímico preliminar del extracto metanólico de las hojas de <i>Tecoma stans</i>.	
Metabolitos secundarios	Resultado
Alcaloides, alcaloides de amonio cuaternario y/o óxidos de aminas.	+
Alcaloides fenólicos.	-
Esteroides y/o triterpenoides libres.	+
Flavonoides	-
Leucoantocianidinas	+
Naftoquinonas y/o antraquinonas.	-
Saponinas, taninos.	-
Lactonas terpénicas.	-
Cumarinas.	-
Glicósidos cardiotónicos	-
Terpenos.	+

5.2.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *T. STANS*

El análisis de los espectros de masa obtenidos de los picos presentes en el cromatograma del extracto de *T. stans* permitió identificar algunos componentes del mismo, siendo estos flavonoides como la quercetina, apigenina, kaempferol, crisoeriol y alcaloides como la tecomina y tecostanina. Los mismos fueron descritos con anterioridad para esta especie.¹² Estos se muestran en la figura 3.

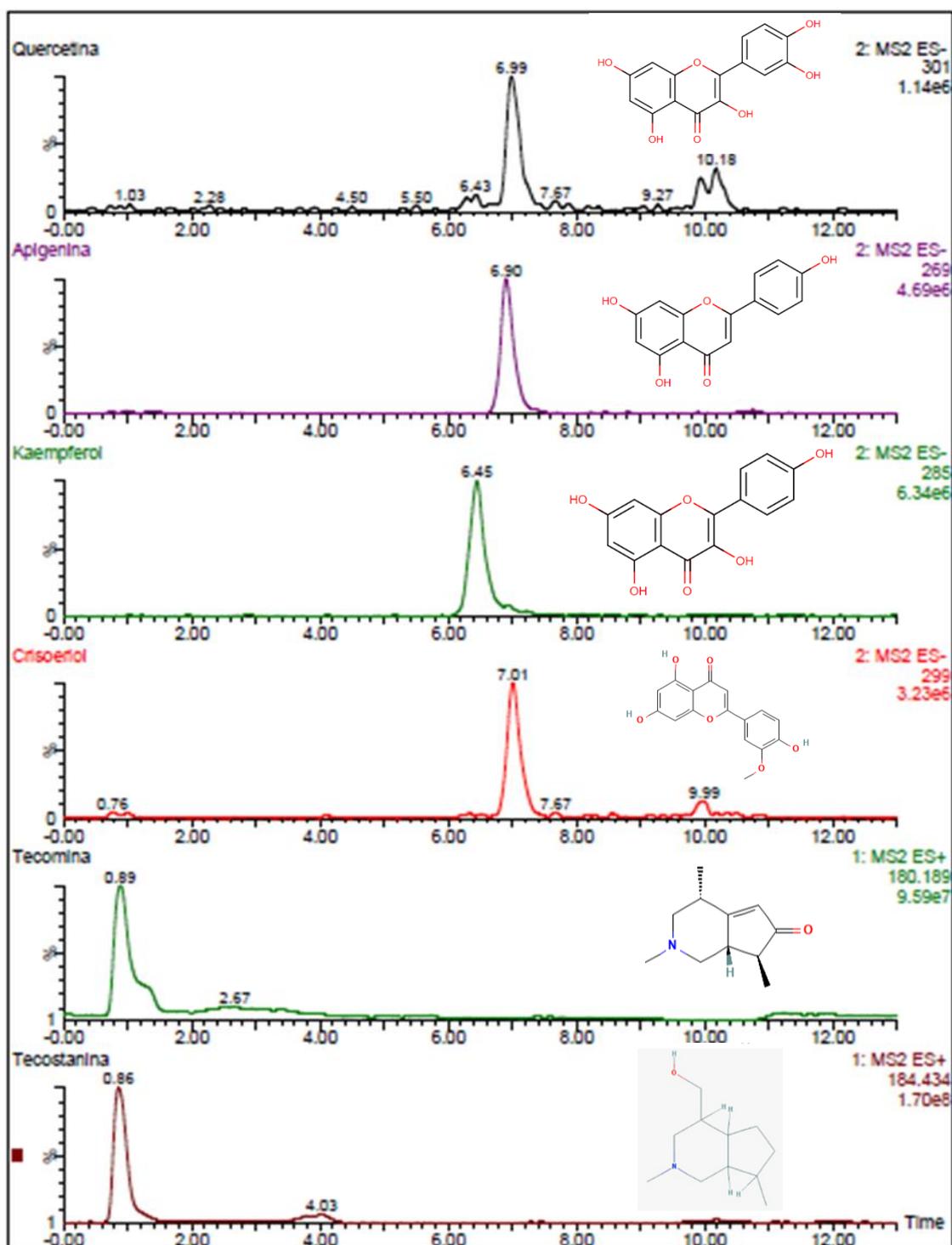


Figura 3. Cromatogramas de compuestos identificados en el extracto metanólico de *Tecoma stans*.

El análisis de los cromatogramas en modo positivo mostró un pico con tiempo de retención 0,86 minutos al cual corresponde un ion molecular de masa $[M+H]^+$ 184,43 el cual fue identificado como el alcaloide tecostanina, ya descrito en *T. stans*. También se observó otro pico con tr 0,89 minutos el cual presentó un ion molecular protonado de masa m/z 180,19 el cual corresponde al alcaloide tecomina, ya descrito también para esta especie.

El análisis en modo negativo mostró cuatro picos con tiempos de retención de 6,45; 6,90; 6,99 y 7,01 minutos que corresponden a iones moleculares desprotonados con masas m/z de 285,0; 269,0; 301,0 y 299,0 los cuales fueron asignados a los flavonoides kaempferol, apigenina, quercetina y crisoeriol, también descritos para *T. stans*.

5.3.- DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA Y EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL ETs EN RATONES

La administración oral de ETs de hasta 3000 mg/kg, p.o. no provocaron respuesta letal en 24 h de observación ni en 14 días posteriores. Además, no fue apreciado cambios morfo-anatómicos en los órganos evaluados (hígado, corazón, riñón ni gastrointestinal) con la dosis más alta (3000 mg/kg) indicando que la dosis letal es superior a los 3000 mg/kg y es indicativo de una relativa seguridad e inocuidad del ETs utilizado. Asimismo, la administración oral de dosis muy inferiores de ETs (125, 250, y 500 mg/kg, p.o.) no provocaron cambios en el comportamiento general de los ratones por lo que fueron seleccionados como dosis para los ensayos principales.

5.4.- INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL AGUDA DE ETs SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS

La dosis de 125 mg/kg de ETs provoca reducción de la glicemia de manera significativa a las 7 h del tratamiento en comparación al grupo de animales diabéticos tratados con solución salina (Figura 4). Conjuntamente, se aprecia un efecto similar con el grupo tratado con tolbutamida (200 mg/kg p.o.). Por otro lado, animales normo

glicémicos tratados con las diferentes muestras, no mostraron variaciones significativas en el nivel de la glicemia durante el periodo de 7 h. (Figura 5)

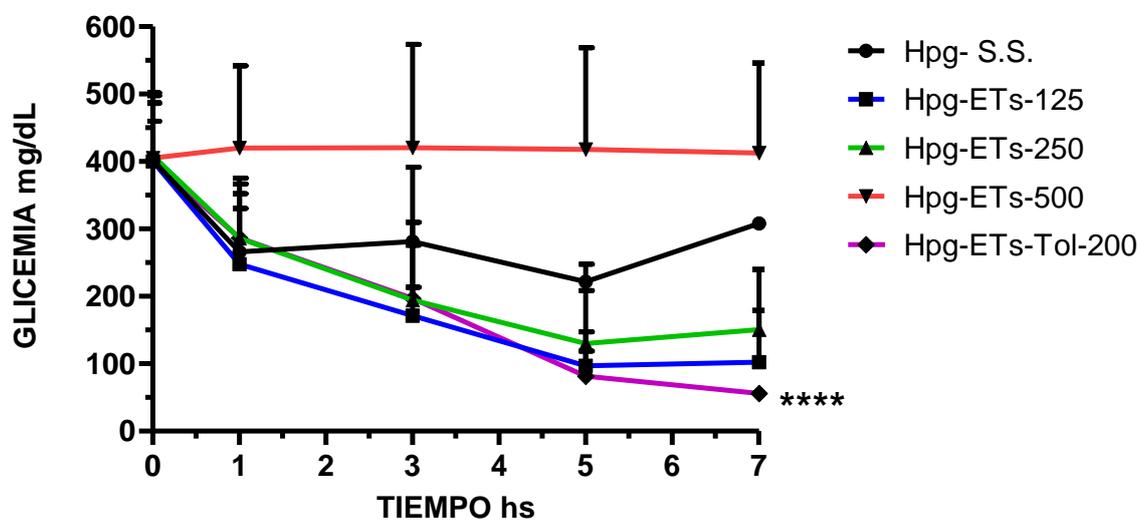


Figura 4. Variación cronológica aguda por 7h de la glicemia de ratones con hiperglucemia inducida por aloxano sometidos al tratamiento con una sola dosis de las muestras en estudio. Hpg-Ss recibió solo solución salina, Hpg-ETs 125, Hpg-ETs 250, Hpg-ETs 500 recibieron oralmente *T. stans* y Hpg-Tol 200 (control positivo). Las curvas representan los promedios \pm desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado por regresión lineal y ANOVA de una vía seguida de comparación múltiple de Dunnett al final del tratamiento. N=6, ****p<0.0001 significativamente diferentes al grupo tratado con el vehículo.

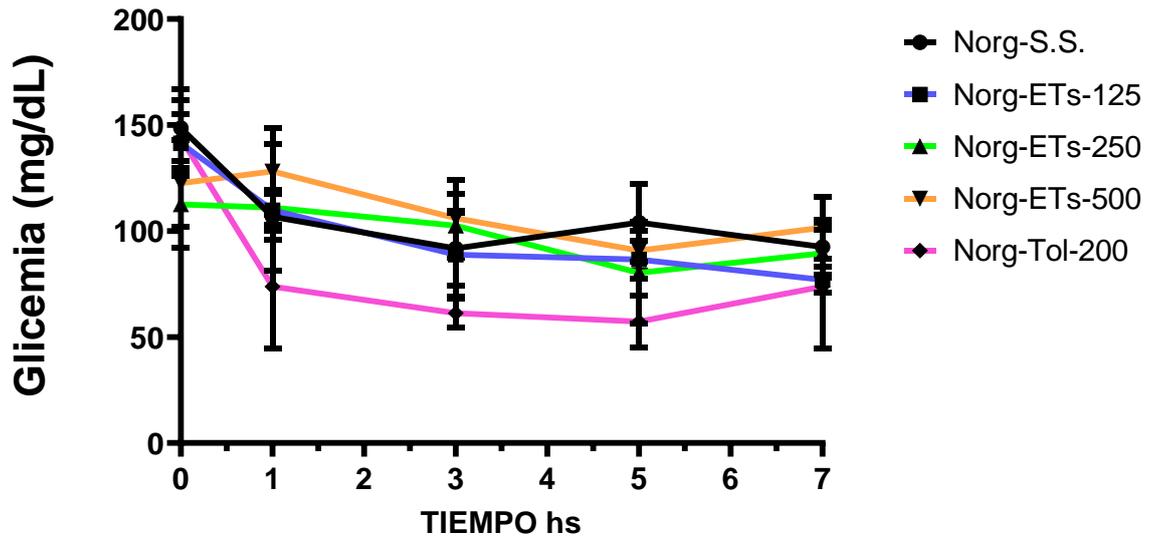


Figura 5. Variación cronológica aguda por 7h de la glicemia de ratones con normoglucémicos sometidos al tratamiento con una sola dosis de las muestras en estudio. Norg-Ss recibió solo solución salina, Norg-ETs 125, Norg-ETs 250, Norg-ETs 500 recibieron oralmente T. stans y Norg-Tol 200 (control positivo). Las curvas representan los promedios \pm desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado por regresión lineal y ANOVA de una vía seguida de comparación múltiple de Dunnett al final del tratamiento. N=6, no se aprecia diferencia significativa comparado al grupo tratado con el vehículo.

5.5.- INFLUENCIA DE ETs SOBRE LA TOLERANCIA ORAL DE LA GLUCOSA DE RATONES NORMO E HIPERGLUCÉMICOS

En el ensayo de tolerancia oral a la glucosa no se apreció modificación de la glicemia de animales normo glicémicos tratados con 125 mg/kg de ETs (Norg-ETs-125 mg/kg) comparados con el control (Norg-control) y sometidos a la carga oral de glucosa. Asimismo, en animales hiperglicémicos tratados con 125 mg/kg de ETs (Hípg- ETs-125) no se aprecia diferencia significativa a los 120 min. de observación de la curva de la glicemia en comparación al control (Hípg- SS) (Figura 6).

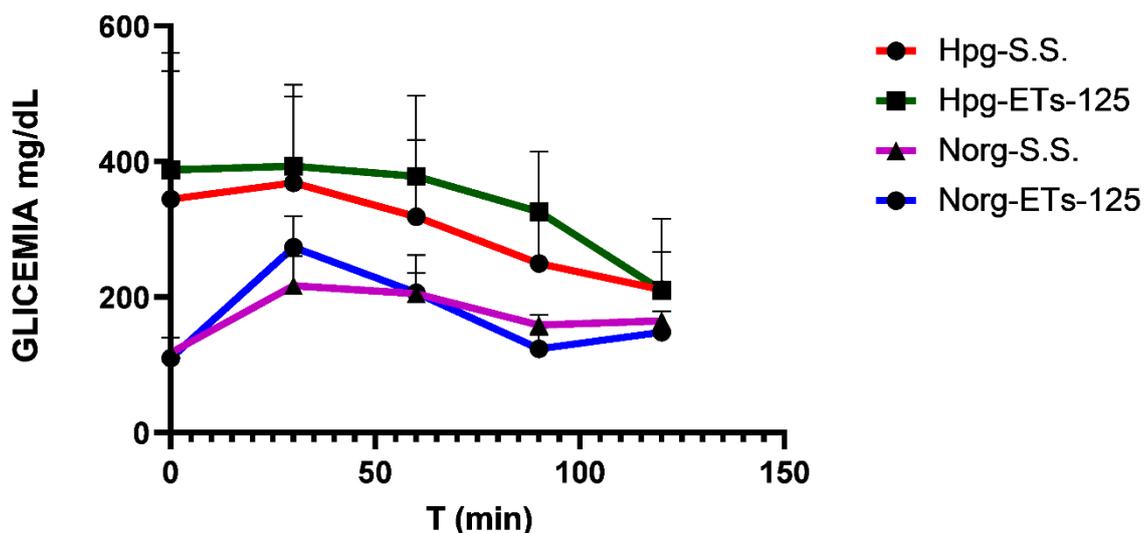


Figura 6. Variación cronológica aguda por 120 min. de la glicemia de ratones normo (Norg-Ss y Norg-ETs 125) e hiperglicémicos por aloxano (Hpg-Ss y Hpg-ETs 125) sometidos a la tolerancia oral a sobrecarga de glucosa. Las curvas representan los promedios \pm desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado (según condición normo o hiperglicémico) por regresión lineal y no denotó diferencia significativa comparado respectivamente, al grupo tratado con el vehículo.

5.6.- INFLUENCIA DE ETs SOBRE EL PESO CORPORAL DE RATONES NORMO E HIPERGLICÉMICOS TRATADOS ORALMENTE DURANTE 28 DÍAS

Se representa en la figura 7A la influencia del tratamiento oral durante 4 semanas con las diferentes dosis de ETs (125, 250 y 500 mg/kg, p.o.) sobre el peso corporal de ratones con hiperglicemia inducida por aloxano. Se aprecia una estabilización del peso corporal de los animales hiperglicémicos tratados con 125 mg/kg de ETs de manera significativa al final de las cuatro semanas de tratamiento en comparación al grupo de animales diabéticos tratados con solución salina. Además, como es esperado, se aprecia ganancia del peso corporal con el grupo de ratones, con hiperglicemia inducida por aloxano, tratados con 200 mg/kg de tolbutamida (control anti hiper glicémico) con lo que valida el método y diseño empleado. Por otro lado, animales normo glicémicos tratados con las diferentes muestras, no mostraron variaciones significativas en la ganancia del peso corporal durante el periodo de 4 semanas comparados al grupo que recibió solución salina (Figura 7B).

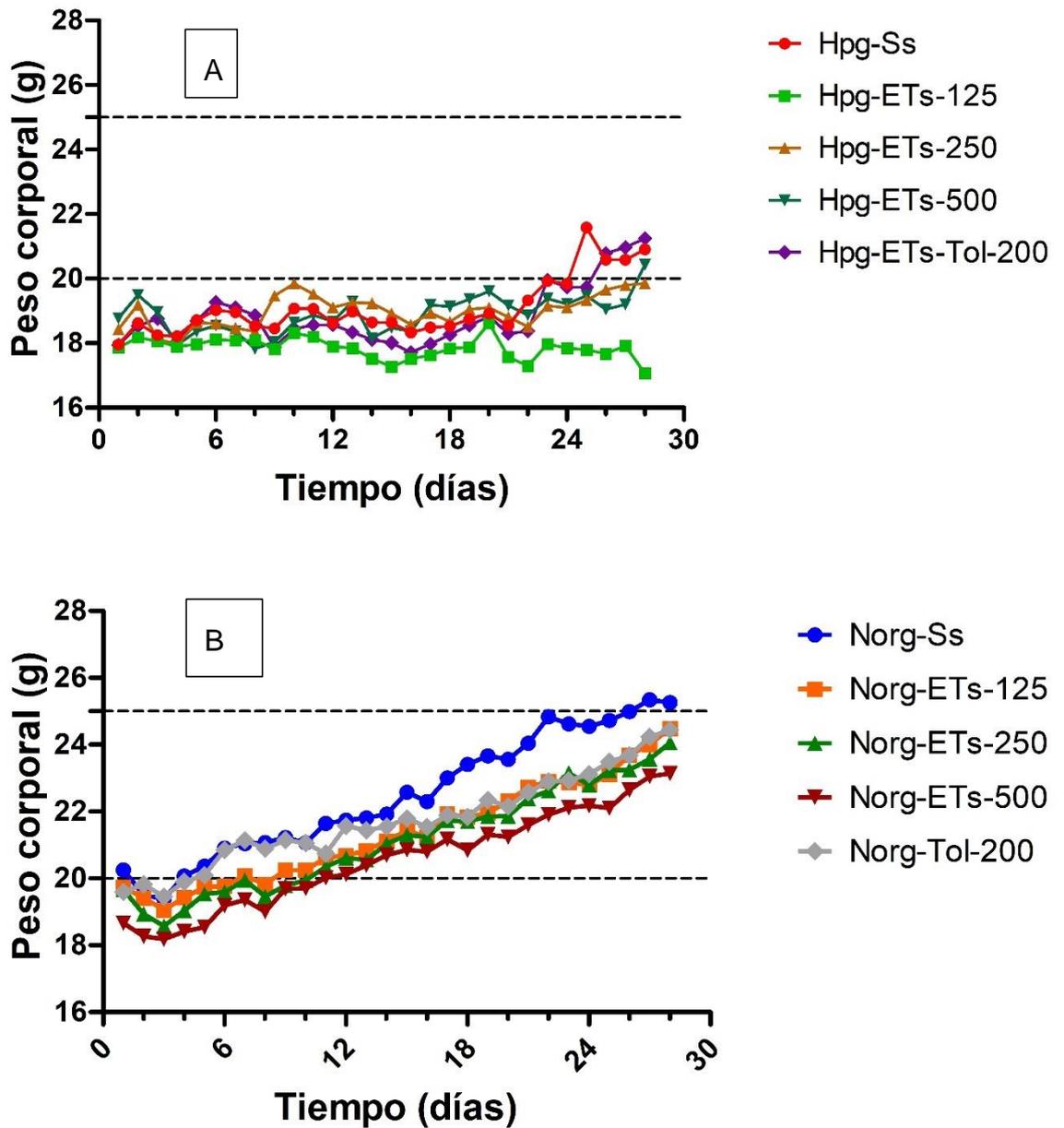


Figura 7. Variación cronológica del peso corporal de ratones A) hiperoglucémicos por aloxano (Hpg-Ss, Hpg-ETs 125, Hpg-ETs 250, Hpg-ETs 500 y Hpg-Tol 200) y B) normoglucémicos (Norg-Ss y Norg-ETs 125, Norg-ETs 250, Norg-ETs 500 y Norg-Tol 200) sometidos a 4 semanas de tratamiento. Las curvas representan los pesos promedios sin desvío estándar.

5.7.- INFLUENCIA DE ETs SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES HIPERGLUCÉMICOS TRATADOS ORALMENTE DURANTE 28 DÍAS

Se aprecia en la figura 8 que la dosis de 125 mg/kg de ETs provoca reducción del 33 % en animales con hiperglicemia inducida por aloxano ($238 \pm 150,3$ mg/dL; $p < 0.05$) de manera significativa al final de las cuatro semanas de tratamiento en comparación al grupo de animales diabéticos tratados con solución salina ($357 \pm 107,3$ mg/dL). Además, se aprecia un efecto similar de atenuación de la hiperglicemia en 27% con el grupo tratado con 200 mg/kg de tolbutamida ($261,7 \pm 125$ mg/dL; $p < 0.05$) el control anti hiper glicémico con lo que valida el método y diseño empleado. Por otro lado, animales normo glicémicos tratados con las diferentes muestras, no mostraron variaciones significativas en el nivel de la glicemia durante el periodo de 4 semanas (Figura 10)

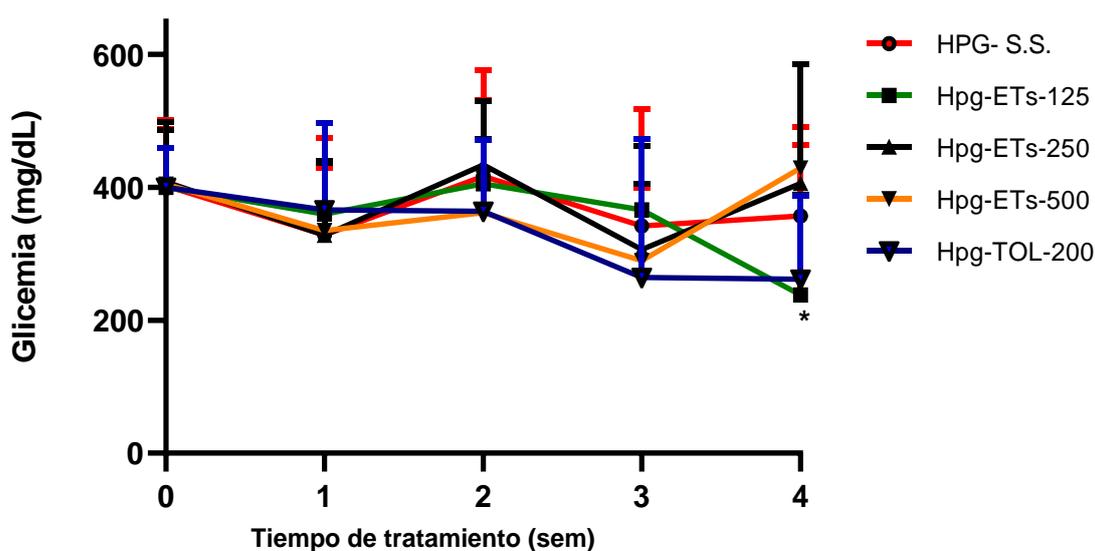


Figura 8. Variación de la glicemia de ratones con hiperglicemia inducida por aloxano por 4 semanas. Hpg-Ss recibió solo solución salina, Hpg-ETs 125, Hpg-ETs 250, Hpg-ETs 500 recibieron oralmente T. stans y Hpg-Tol 200 (control positivo). Las curvas representan los promedios \pm desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado por regresión lineal y ANOVA de una vía seguida de comparación múltiple de Dunnett al final del tratamiento. N=6, * $p < 0.05$ significativamente diferentes al grupo tratado con el vehículo.

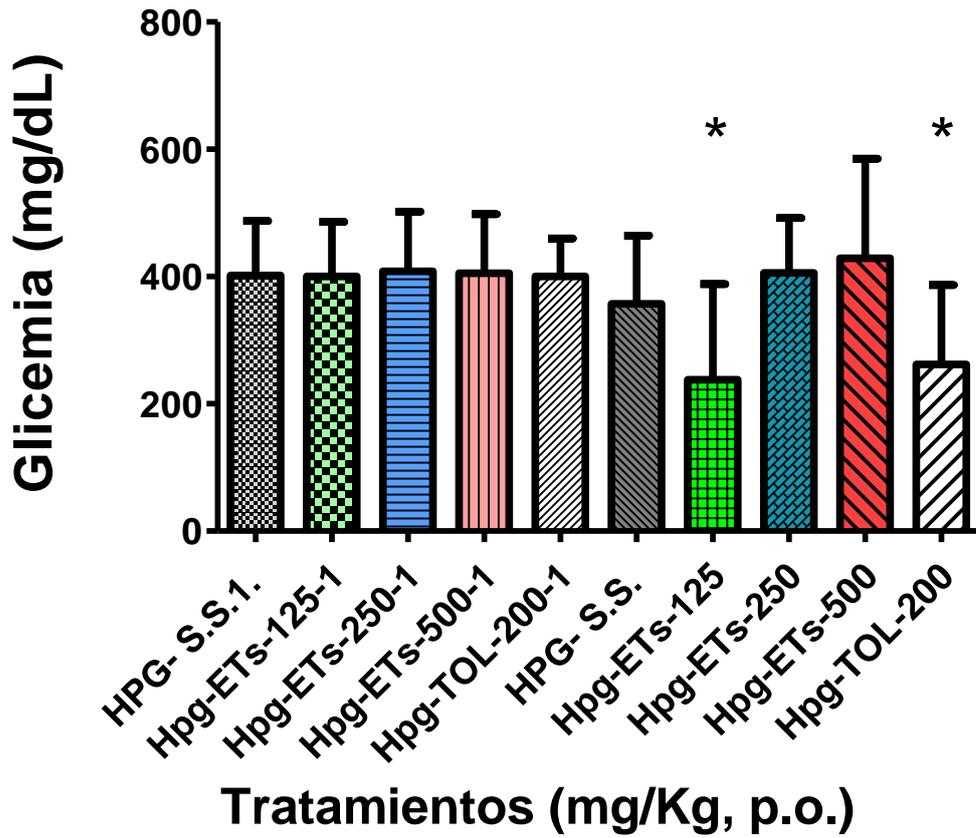


Figura 9. Variación de la glicemia de ratones con hiperglucemia inducida por aloxano al inicio comparado al nivel final de las 4 semanas. Hpg-Ss recibió solo solución salina, Hpg-ETs 125, Hpg-ETs 250, Hpg-ETs 500 recibieron oralmente T. stans y Hpg-Tol 200 (control positivo). Las barras representan los promedios \pm desvío estándar. El análisis estadístico de los tratamientos grupales de inicio y final, correspondiente, empleando el test de student. N=6, *p<0.05 significativamente diferentes al grupo tratado con el vehículo.

5.8.- INFLUENCIA DE ETs SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMOGLUCÉMICOS TRATADOS ORALMENTE DURANTE 28 DÍAS

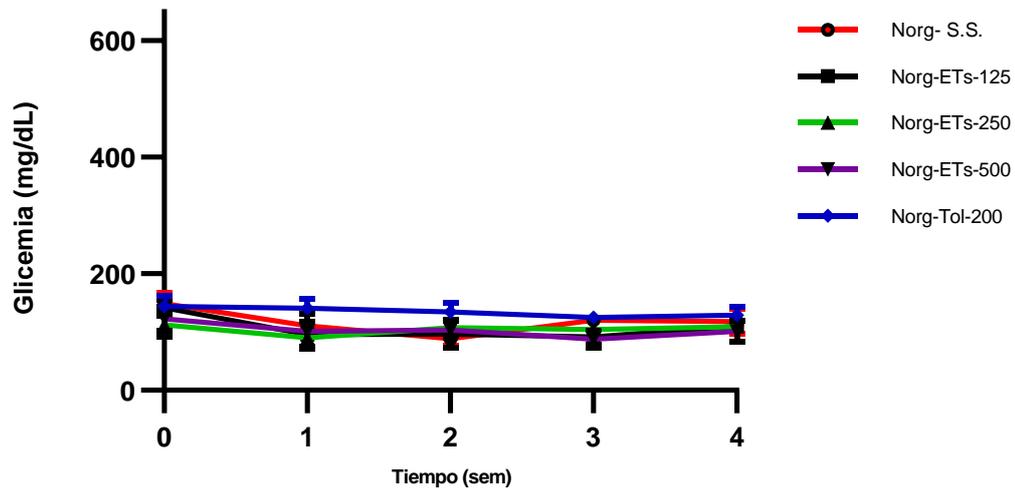


Figura 10. Variación de la glicemia de ratones normoglicémicos tratados durante 4 semanas. Norg-Ss recibió solo solución salina, Norg-ETs 125, Norg-ETs 250, Norg-ETs 500 recibieron oralmente T. stans y Norg-Tol 200 (control positivo) durante el tratamiento. Las curvas representan los promedios \pm desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado por regresión lineal y ANOVA de una vía seguida de comparación múltiple de Dunnett al final del tratamiento. N=6, no existe diferencia significativa al grupo tratado con el vehículo.

6.- DISCUSIÓN

FITOQUÍMICA

- En este trabajo de investigación se verifica la presencia de componentes como alcaloides, esteroides y/o triterpenoides libres, flavonoides y terpenos preliminarmente, luego en la evaluación de la “huella dactilar”, se identificaron alcaloides y flavonoides (quercetina, apigenina, kaemferol, crisoeriol, tecomina y tecostanina) por LCMS.
- Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura donde un estudio fitoquímico preliminar demostró la presencia de flavonoides en el extracto metanólico de las hojas de Ts. (Agarwal, S.K., Karthikeyan, V., 2014)
- Hammouda y Motawi (1959) identificaron el primer alcaloide de la hoja y lo nombraron **tecomina**. Posteriormente, en 1966, Hammouda y Amer informaron sobre el siguiente alcaloide llamado **tecostanina**. Otros reportaron que los alcaloides de las hojas incluyen boschniakina, 4-hidroxitecomanina, N-normetilskitantina, 5-hidroksitantina, 7-hidroksytanthine, γ -skytanthina, tecomanina y 4-noractinidina. Poco a poco, el interés se desplazó hacia la identificación y determinación otras moléculas funcionales en la hoja, así como otras partes de la planta. Otros componentes funcionales informados en la hoja incluyen ácidos fenólicos, como, clorogénico, ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido gálico, cafeico, vainílico, o-cumárico, y ácidos sinápicos; sitosteroles; triterpenoides; y flavonoides, como, flavonona, **apigenina**, **crisoeriol**, **kaempferol**, luteolina, **quercetina**, rutina, 7,8-dihidroxi 4,6-dimetoxi flavona y verbascósido (Anand, M., & Basavaraju, R., 2020). Se han descrito compuestos aislados (crisoeriol, apigenina, luteolina y verbascósido) con la capacidad de inhibir la actividad de la lipasa pancreática. (Rastogi y Mehrotra, 1993; Lins y Felicio, 1993; Srivastava, 1994; Marzouk y col., 2006; Ramirez et al., 2016).

ENSAYOS FARMACOLÓGICOS AGUDOS

- En este trabajo de investigación se verifica la presencia de componentes como alcaloides, esteroides y/o triterpenoides libres, flavonoides y terpenos preliminarmente, luego en la evaluación de la “huella dactilar”, se identificaron alcaloides y flavonoides (quercetina, apigenina, kaemferol, crisoeriol, tecomina y tecostanina) por LCMS.

- Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura donde un estudio fitoquímico preliminar demostró la presencia de flavonoides en el extracto metanólico de las hojas de Ts. (Agarwal, S.K., Karthikeyan, V., 2014)
- Hammouda y Motawi (1959) identificaron el primer alcaloide de la hoja y lo nombraron **tecomina**. Posteriormente, en 1966, Hammouda y Amer informaron sobre el siguiente alcaloide llamado **tecostanina**. Otros reportaron que los alcaloides de las hojas incluyen boschniakina, 4-hidroxitecomanina, N-normetilskitantina, 5-hidroksitantina, 7-hidroksyantina, γ -skytanthina, tecomanina y 4-noractinidina. Poco a poco, el interés se desplazó hacia la identificación y determinación otras moléculas funcionales en la hoja, así como otras partes de la planta. Otros componentes funcionales informados en la hoja incluyen ácidos fenólicos, como, clorogénico, ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido gálico, cafeico, vainílico, o-cumárico, y ácidos sinápicos; sitosteroles; triterpenoides; y flavonoides, como, flavonona, **apigenina**, **crisoeriol**, **kaempferol**, luteolina, **quercetina**, rutina, 7,8-dihidroxi 4,6-dimetoxi flavona y verbascósido (Anand, M., & Basavaraju, R., 2020). Se han descrito compuestos aislados (crisoeriol, apigenina, luteolina y verbascósido) con la capacidad de inhibir la actividad de la lipasa pancreática. (Rastogi y Mehrotra, 1993; Lins y Felicio, 1993; Srivastava, 1994; Marzouk y col., 2006; Ramirez et al., 2016).

ENSAYO FARMACOLÓGICO CRÓNICO POR 28 DÍAS

- La influencia de ETs sobre el peso corporal determinada sigue un patrón típico de ascenso débil en los animales diabéticos en contraposición a los animales normoglucémicos. Se denotó que la dosis menor (125mg/kg) del ETs provoca la aparente estabilización del peso corporal en valores casi a valores del inicio del ensayo mientras que las dosis mayores son similares al grupo de animales diabéticos tratados con tolbutamida y con solución salina. Desconocemos los mecanismos y componentes del ETs involucrados en estos efectos; sin embargo, la inhibición de la alfa glucosidasa intestinal y la lipasa pancreática apuntan como mecanismos factibles de estos efectos.
- En la literatura consultada no se aprecian datos sobre la influencia del peso corporal en ratones diabéticos inducidos por aloxano.
- En nuestro estudio se constató que en la administración de la menor dosis (125mg/kg) del ETs en animales diabéticos por aloxano, provoca reducción de la glicemia de

manera significativa al final del tratamiento en comparación al grupo de animales diabéticos tratados con solución salina. También, se aprecia un efecto similar con el grupo tratado con tolbutamida. Los, animales normoglucémicos tratados con las diferentes muestras, no mostraron variaciones significativas en el nivel de la glicemia durante el periodo de 4 semanas.

- En la literatura mencionan que teniendo presente la detección de alcaloides y considerando que ya fueron aislados más de un centenar de compuestos químicos es comprensible el potencial terapéutico atribuido a este recurso natural para reducir el nivel elevado de azúcar sanguíneo, o como anti inflamatorio, anti cáncer, antioxidante, hepatoprotector, cicatrizante, anti bacteriano y anti fúngico entre otros (Anand and Basavaraju, 2021).
- Los alcaloides tecostanina y tecomina inyectados a perros han mostrado actividad hipoglucemiante y potente efecto hipotensor (Hammouda and Amer, 1966; Hammouda and Khalafallah, 1971; Lozoya-Meckes and Mellado-Campos, 1985). El efecto antidiabético de extracto acuoso de las hojas de *T. stans* en ratas se debe a un efecto inhibidor de la alfa glucosidasa intestinal (Aguilar-Santamaría et al., 2009). También, ha sido reportado la actividad inhibidora de la lipasa pancreática como posible acción benéfica sobre la glicemia y por la que se recomienda su uso antes de las comidas (Ramirez et al., 2016).
- Finalmente, se deja constancia de la realización de investigaciones histopatológicas y séricas adicionales para mejorar los conocimientos farmacológicos sobre *T. stans* y fortalecer los potenciales beneficios clínicos que ofrecería a los pacientes con diabetes o prediabetes.

7.- CONCLUSIONES

Fue caracterizada la composición química del extracto por medio de un análisis fitoquímico preliminar constatándose presencia de alcaloides, esteroides y/o triterpenoides libres, flavonoides y terpenos.

Además, la “huella dactilar” cromatográfica por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (LCMS) determinó la presencia de alcaloides y flavonoides (quercetina, apigenina, kaemferol, crisoeriol, tecomina y tecostanina).

Basados en los resultados se concluye que la administración oral de T. stans (ETs) en ratones es poco tóxico, seguro e inocuo en ratones. ETs no afecta el comportamiento general de ratones sometidos a las dosis seleccionadas para el ensayo principal.

En el estudio agudo y la prueba de la tolerancia a la glucosa no fueron observados efectos llamativos y serán objeto de estudios posteriores para determinar su significancia global.

Se evaluó la influencia crónica del extracto metanólico de las hojas de T. stans sobre la glicemia de ratones normo e hiperglicémicos. Fue detectado que la menor dosis (125 mg/kg) administrada de ETs provoca reducción de la hiperglicemia de manera significativa al final del tratamiento en comparación al grupo de animales diabéticos tratados con solución salina. Se constató que T. stans reduce 33% la intensidad de la hiperglicemia inducida por aloxano en animales. Por otro lado, animales normo glicémicos tratados con las diferentes muestras, no mostraron variaciones significativas en el nivel de la glicemia durante el periodo de estudio. Cabe resaltar que la dosis más baja ETs afecta el incremento del peso corporal de los animales tras 28 días de tratamiento. Este hecho requiere de estudios posteriores para discriminar entre el riesgo o el beneficio de lo observado.

En el ensayo de tolerancia oral de la glucosa no se observan cambios significativos de la glicemia de animales normo glicémicos tratados con la menor dosis comparados con el control y sometidos a la carga oral de glucosa. Esto podría deberse a que la dinámica de liberación de insulina u otros factores no estarían afectados. En el mismo sentido, en animales hiperglicémicos tratados con la menor dosis del ETs no genera una curva de respuesta diferente y significativa durante los 120 min. de observación

en comparación al grupo diabético control. Lógicamente, serán requeridos estudios adicionales para esclarecer los mecanismos de las respuestas observadas.

Trabajos adicionales químico – farmacológicos se encuentran en proceso para consolidar los resultados obtenidos al presente trabajo. Es la primera vez que la planta es estudiada a nivel País empezando con la identificación botánica, análisis fitoquímico y análisis farmacológico en ratones, esta investigación da como aporte estudios relevantes en cuanto a su actividad en animales diabéticos, se destaca el comportamiento de la estabilidad del peso en los animales diabéticos con respecto a los sanos dando un dato importante a nivel de los estudios realizados en otros Países y que no se encuentran en la literatura.

8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-Santamaría L, Ramírez G, Nicasio P, Alegría-Reyes C, Herrera-Arellano A. En Paraguay el 10% de la población padece diabetes [Internet]. PubMed. 2009 [citado 20 abril 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19397980/>
2. Lozoya-Meckes M, Mellado-Campos V. Is the Tecoma stans infusion an antidiabetic remedy? [Internet]. PubMed. 1985 [citado 20 abril 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19397980/>
3. Ramirez G, Zamilpa A, Zavala M, Perez J, Morales D, Tortoriello J. Chrysoeriol and other polyphenols from Tecoma stans with lipase inhibitory activity. J Ethnopharmacol [Internet]. 2016;185:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.014>
4. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social P. En Paraguay el 10% de la población padece diabetes [Internet]. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. 2020 [citado 13 enero 2021]. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/portal/22132/en-paraguay-el-10-de-la-poblacion-padece-diabetes.html>
5. Vázquez Chacón JY. Tecoma stans: características, hábitat, usos, cultivo [Internet]. lifeder. 2019 [citado 10 enero 2021]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/tecoma-stans/>
6. M. González Torres, Dionisio M. Catálogo de Plantas Medicinales Usadas en Paraguay. Asunción, Paraguay; 1970. 256-258 p.
7. Sanabria Galindo A. Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1983. 113 p.
8. -Bublitz MA, Ibarrola DA, Hellióñ-Ibarrola MC, Dölz JH, Kennedy ML. Acute and chronic anti-hyperglycemic effect of Prosopis ruscifolia extract in normoglycemic and alloxan-induced hyperglycemic rats. J Appl Pharm Sci. 2016;6(5):178–84.
9. Real Decreto 17344,1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, Ministerio de la Presidencia- España, BOE 252, 34367-34391 (2005).
10. Abdel-Mageed WM, Backheet EY, Khalifa AA, Ibraheim ZZ, Ross SA. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from Tecoma

mollis. *Fitoterapia* [Internet]. 2012;83(3):500–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.025>

11. Cruz EC, Andrade-Cetto A. Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type 2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala. *J Ethnopharmacol*. 2015;159:238–44.

12. Anand M, Basavaraju R. A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021;265(July 2018):113270. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113270>

13. theplantlist P. *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth is an accepted name [Internet]. The Plant List. 2012 [citado 22 junio 2021]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-318412>

14. Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C., Herrera-Arellano, A., 2009. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *J. Ethnopharmacol*. 124, 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.033>

15. Anand, M., Basavaraju, R., 2021. A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *J. Ethnopharmacol*. 265, 113270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113270>

16. Hammouda, Y., Amer, M.S., 1966. Antidiabetic Effect of Tecomine and Tecostanine. *J. Pharm. Sci.* 55, 1452–1454. <https://doi.org/10.1002/JPS.2600551228>

17. Hammouda, Y., Khalafallah, N., 1971. Stability of Tecomine, the Major Antidiabetic Factor of *Tecoma Stans* (Juss.) f. Bignoniaceae. *J. Pharm. Sci.* 60, 1142–1145. <https://doi.org/10.1002/JPS.2600600806>

18. Irwin, S., 1968. Comprehensive Observational Assessment: Ia. A Systematic, Quantitative Procedure for Assessing the Behavioral and Physiologic State of the Mouse. *Psychopharmacologia* 13, 222–257.

19. Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>

20. Lozoya-Meckes, M., Mellado-Campos, V., 1985. Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy? *J. Ethnopharmacol*. 14, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(85\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(85)90022-4)

21. OECD, 2001. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (chptr). *Oecd Guidel. Test. Chem.* 1–14. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>

22. Ramirez, G., Zamilpa, A., Zavala, M., Perez, J., Morales, D., Tortoriello, J., 2016. Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity.

J. Ethnopharmacol. 185, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.014>

23. Roux, S., Sablé, E., Porsolt, R.D., 2004. Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 27, 1–23. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>

9.- ANEXOS

1

Ciudad de residencia: Itauguá km 25 – Barrio San Roque

ENCUESTA

1- **Conoce la planta Lapachito o campanilla?**

Rta.: Si

2- **Sabe de algún uso popular medicinal?**

Rta.: Si

Si la respuesta es SI, contesta las siguientes preguntas

3- **Cuál sería el uso medicinal?**

Rta.: para Diabetes

4- **Como lo utilizan?**

Rta.: infusión

5- **Que cantidad de hojas utilizan y cuantas veces al día?**

Rta.: Una pequeña cantidad. Solo una vez al día

6- **Donde lo consiguen?**

Rta.: en la zona

7- **Es seguro y efectivo?**

Rta.: creo que si

8- **Cuanto tiempo utiliza?**

Rta.: por un periodo intercalado de 3 meses.

Ciudad de residencia: Itauguá km 28 – Barrio San Roque

ENCUESTA

1- Conoce la planta Lapachito o campanilla?

Rta.: Si

2- Sabe de algún uso popular medicinal?

Rta.: Si

Si la respuesta es SI, contesta las siguientes preguntas

3-Cuál sería el uso medicinal?

Rta.: para Diabetes

4- Como lo utilizan?

Rta.: en el mate

5- Que cantidad de hojas utilizan y cuantas veces al día?

Rta.: Una pequeña cantidad. Dos vez al día

6- Donde lo consiguen?

Rta.: en la zona

7- Es seguro y efectivo?

Rta.: creo que si

8- Cuanto tiempo utiliza?

Rta.: todos los días.

Ciudad de residencia: Itauguá km 28 – Barrio San Roque

ENCUESTA

1- Conoce la planta Lapachito o campanilla?

Rta.: Si

2- Sabe de algún uso popular medicinal?

Rta.: Si

Si la respuesta es SI, contesta las siguientes preguntas

3-Cuál sería el uso medicinal?

Rta.: para Diabetes

4- Como lo utilizan?

Rta.: en el mate y como té

5- Que cantidad de hojas utilizan y cuantas veces al día?

Rta.: Una pequeña cantidad. Dos veces al día

6- Donde lo consiguen?

Rta.: en la zona

7- Es seguro y efectivo?

Rta.: Si, muy efectiva

8- Cuanto tiempo utiliza?

Rta.: todos los días.