

ENSAYO A CIEGO SIMPLE DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE *PHYLLANTHUS NIRURI* (HUEVITO ESCONDIDO) Y SU COMBINACIÓN CON *AZADIRACHTA INDICA* (NIM) EN RATAS WISTAR.

*Gerardo Alberto Isea Fernández*¹, *Egar Enrique Sánchez Camarillo*², *Ilsen Emérita Rodríguez Rodríguez*³, *Alfonso José Hernández Paz*⁴

¹Departamento de Biología Animal. ²Departamento Socio- Económico, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Ciudad Universitaria. Núcleo Agropecuario. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. ³Instituto Socialista de la Pesca y Acuicultura, Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, Sector Sierra Maestra, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. ⁴Ejercicio Profesional Libre, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Rev Venez Endocrinol Metab 2015;13(2): 86-91

RESUMEN

Objetivo: valorar el efecto hipoglucemiante de un extracto acuoso de la planta entera *Phyllanthus niruri*, hojas de *Azadirachta indica* y su combinación.

Métodos: Se diseñó un ensayo cruzado a ciego simple, preparándose extractos acuosos de hojas de *A. indica* y planta entera de *P. niruri*, colocando 70 g en 200 mL de agua a 55-60 °C, conformando tres tratamientos: uno para cada extracto y el tercero la combinación. Como control positivo o de referencia se utilizó el extracto de *A. Indica*. Se emplearon 18 ratas Wistar a las que se administró el tratamiento vía oral una sola vez, a razón de 5 mL/300 g de peso. La glucemia se midió con un glucómetro One Touch Ultra antes y 2h después del tratamiento. Se aplicó la prueba ANOVA a los datos.

Resultados: Hubo disminución de la glucemia con los tres tratamientos. No se encontró diferencia entre los tratamientos probados.

Conclusiones: el extracto acuoso de la planta entera de *Phyllanthus niruri* tiene un efecto hipoglucemiante similar al extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica*. No hubo evidencia de efecto sinérgico.

Palabras clave: plantas medicinales, hipoglucemiantes, *Azadirachta indica*, *Phyllanthus niruri*, ratas Wistar.

A SIMPLE BLIND TEST OF HYPOGLYCEMIC EFFECT OF PHYLLANTHUS NIRURI (HUEVITO ESCONDIDO) AND ITS COMBINATION WITH AZADIRACHTA INDICA (NIM) IN WISTAR RATS.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the hypoglycemic effect of aqueous extract of *Phyllanthus niruri* whole plant and its combination with one of *Azadirachta indica* leaves.

Methods: A single-blind crossover trial was design. One for each extract and the third corresponding to the combination: aqueous extracts of leaves of *Azadirachta indica* and whole plant *Phyllanthus niruri*, placing 70 g of the plant material in 200 mL of water at 55-60 ° C, three treatments were prepared. The comparison was performed using the extract of *Azadirachta indica* as control. Eighteen Wistar rats were used. Treatment was given orally at a dose of 5 mL/300 g. Glucose measurement was made with a glucometer One Touch Ultra before and 2h after administration of the treatment. ANOVA was applied to the data.

Artículo recibido en: Agosto 2014 Aceptado para publicación en: Febrero 2015

Dirigir correspondencia a: Gerardo Alberto Isea Fernández Email: gerardo.isea@fev.luz.edu.ve

Results: There was a decrease in blood glucose levels with the three treatments. No difference was found between the tested treatments regarding the hypoglycemic effect.

Conclusions: The aqueous extract of the whole plant of *Phyllanthus niruri* has a similar hypoglycemic effect to aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves. There was no evidence of synergistic effect.

Keywords: medicinal plants, hypoglycemic, *Azadirachta indica*, *Phyllanthus niruri*, Wistar rats.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido siempre fuente de sustancias farmacológicamente activas y de interés terapéutico, formando parte de la composición de productos para la medicina tradicional y moderna, alimentos y suplementos nutricionales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que más del 80% de la población mundial depende de plantas medicinales para atender problemas de salud en la atención primaria y recomendó mayor investigación en el área, sobre todo en relación al tratamiento de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus. La búsqueda de agentes terapéuticos a partir de plantas se centra en encontrar fármacos más seguros, con probable acción sobre múltiples dianas, acciones farmacológicas sinérgicas y un acceso a menor costo^{1,2}.

Desde el año 2005 la investigación sobre el efecto hipoglucemiante de *Phyllanthus niruri* despertó gran interés, sin embargo, aún son pocas las investigaciones al respecto, pero además, disímiles en las condiciones experimentales, particularmente dosis empleadas, tiempo de medición de la glucemia, condición de las unidades experimentales y contradictorias en sus resultados. *Phyllanthus niruri* es una planta de pequeño tamaño (15-30 cm) propia de regiones tropicales y subtropicales, a la que se atribuyen además efectos antioxidantes y de litotricia, razón por la que se conoce popularmente como “Chanca Piedra”. Por otra parte, el efecto hipoglucemiante de *Azadirachta indica* ha sido mucho más investigado y está bien documentado². El objetivo de la presente investigación fue comparar el probable efecto hipoglucemiante de *Phyllanthus niruri* y su combinación con *Azadirachta indica*, respecto al conocido efecto hipoglucemiante de *Azadirachta indica*.

MÉTODOS

Se trabajó en los Laboratorios de la Cátedra de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Se utilizaron ratas Wistar, machos, adultas normales, con un peso de 190-300 g. Se sometieron a un período de aclimatación de 7 días a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y se alimentaron con un producto comercial para la especie, restringiendo el acceso entre la administración del tratamiento y la medición de la glucemia, estableciendo así un período de ayuno de $17 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$. Se administró libremente agua de grifo, restringiéndose solo durante $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$, desde la medición de glucemia pretratamiento hasta su medición postratamiento. Alimento y agua se dosificaron diariamente según peso a 12 y 10% del mismo, respectivamente. La medición de la glucemia se realizó 2h después de administrado el tratamiento, en muestra de sangre (1-2 gotas) obtenida de la vena safena, utilizando un glucómetro One Touch® Ultra Johnson & Johnson como en otras investigaciones³. Los tratamientos se administraron mediante sonda gástrica como dosis única.

El trabajo se ajustó al Código de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela⁴. Las hojas de *A. indica* y la planta entera *P. niruri* se colectaron en el municipio Maracaibo del estado Zulia entre las 7 y las 9 pm. La identificación de las plantas fue realizada por el profesor Guillermo Sthormes, curador del Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, muestra sin número de colección, herbario referencial de frutales.

En ambos casos, hojas o planta entera fresca, se lavaron con agua de grifo, cortándose finamente con tijera hasta completar 70 g, y se colocaron en un recipiente de acero inoxidable con 200 mL de

agua de grifo a temperatura entre 55 a 60 °C durante 30 min. Luego de filtrada (papel filtro Whatman N° 2), la infusión obtenida se almacenó a 4 °C durante 12 h hasta su utilización, un procedimiento popularmente descrito en Venezuela para el uso medicinal de estas plantas.

Se elaboró un diseño cruzado con tres tratamientos (A, B y C), seis secuencias de tratamientos y tres réplicas. Cada réplica se realizó con 6 unidades experimentales a las que se aplicaron los tratamientos según la secuencia que aparece en la tabla I. El tiempo de reposo entre tratamientos fue de 24 h, con el objeto de evitar probables efectos residuales. Fue un estudio a ciego simple, pues el investigador que

administró los tratamientos y realizó la lectura de la glucemia, no conoció la naturaleza de las sustancias administradas hasta finalizado el ensayo.

Las unidades experimentales se identificaron aleatoriamente en cada réplica con números del 1 al 6. El primer día los tratamientos fueron suministrados según correspondía: rata 1, tratamiento A; rata 2, tratamiento B; rata 3, tratamiento C; rata 4, tratamiento B; rata 5, tratamiento C; rata 6, tratamiento A; y así sucesivamente para los días 2 y 3. En cada réplica se trabajó con animales diferentes, para totalizar 18 unidades experimentales. Cada día, previo a la administración del tratamiento correspondiente,

Tabla I. Secuencia de aplicación de tratamientos por réplica.

Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
A	B	C	B	C	A
B	C	A	A	B	C
C	A	B	C	A	B

los animales se pesaron para ajustar la dosis, agua y alimento del siguiente día. Se prepararon nuevos extractos acuosos para trabajar en cada réplica. Los tratamientos se administraron a razón de 5 mL/300 g. Los porcentajes de variación de glucemia se obtuvieron mediante la siguiente fórmula¹: % Variación de Glucemia = (Glucemia final – Glucemia inicial) / Glucemia inicial x 100. Los resultados se expresaron como valor medio y su desviación estándar. A los datos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) comprobándose previamente sus tres supuestos básicos: normalidad, independencia de errores y varianza constante. Se verificó además la ausencia de efectos residuales después del segundo y tercer tratamiento. Se consideraron diferencias significativas con $p < 0,05$.

RESULTADOS

El análisis de varianza (ANOVA) del efecto hipoglucemiante de los tres tratamientos probados mostró que no existe diferencia entre

los mismos ($p=0,9186$). En la tabla II se muestra la variación promedio de la glucemia para cada tratamiento expresada en términos de porcentaje; se observa que hubo disminución de la glucemia con los tres tratamientos, estando la variación porcentual entre $-9,035 \pm 2,88$ y $-11,960 \pm 2,69$, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

Para asegurar que el método de análisis estadístico de los datos fue el correcto y soportar los resultados obtenidos, se verificaron los tres supuestos básicos del análisis de la varianza. Mediante la prueba de Durbin-Watson ($p=2,33$) se comprobó la independencia de los errores, lo que permite afirmar la independencia de cada observación o resultado de la medición de glucemia. El supuesto de normalidad se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p=0,69$), se verificó el supuesto de varianza constante y se estableció la ausencia de efectos residuales después del segundo ($p=0,3749$) y tercer ($0,9596$) tratamiento.

Tabla II. Variación promedio porcentual de la glucemia en ratas normales tras administración oral de extractos acuosos de *Azadirachta indica*, *Phyllanthus niruri* y su combinación.

Tratamiento	Media de la variación de la glucemia (%)
Extracto hojas de <i>A. indica</i> (A)	-9,035 ± 2,88
Extracto de <i>P. niruri</i> (B)	-9,720 ± 3,50
Combinación de extractos (C)	-11,96 ± 2,69 ₀

DISCUSIÓN

La investigación permitió indagar sobre el probable efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de la planta entera de *Phyllanthus niruri* y su combinación con el extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica*. El diseño experimental y análisis estadístico permitió disminuir el número de unidades experimentales y la influencia de la variación entre individuos. La comparación se realizó con el extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica* pues su efecto hipoglucemiante está bien documentado, tanto en ratas normales como diabéticas^{3,1,5}.

Investigaciones recientes señalan que la disminución de la glucemia ($p < 0,001$), por administración de un extracto acuoso de *Azadirachta indica*, se corresponde con un incremento del glucógeno hepático, en músculo esquelético y músculo cardíaco tras 1h y 2h de la administración del tratamiento¹. Como acción farmacodinámica se sugiere también la presencia de sustancias parecidas a la insulina, interferencia con la absorción de carbohidratos, incremento en la actividad de la insulina, incremento del número de células beta pancreáticas y disminución de hiperglucemia inducida por adrenalina, mecanismos en los que participarían sustancias identificadas como nimbina, nimbidina, nimbinene, nimbosterol y quercetina. Así, en la India, especialidades farmacéuticas a partir de *Azadirachta indica* han recibido aprobación oficial para el tratamiento de la diabetes mellitus^{3,1,5,6}. Rahman y col compararon el efecto hipoglucemiante oral de *Azadirachta*

indica (500 mg · kg⁻¹) tras trituración seca de sus hojas disueltas en agua destilada, observando disminución de la glucemia a las 4 h tras la administración del tratamiento en ratas⁷.

De acuerdo a los resultados de la presente investigación, aunque se puede establecer un orden en el porcentaje de disminución de la glucemia, los tratamientos no fueron diferentes entre sí; por tanto, dada la reconocida actividad hipoglucemiante de *Azadirachta indica*, debe sugerirse que *Phyllanthus niruri* tiene una actividad hipoglucemiante similar, aunque no se pudo demostrar un efecto sinérgico en las condiciones experimentales en que se realizó la investigación. En ratas con diabetes inducida con alloxan, la administración de extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A Juss) o *Vernonia amygdalina* (Del.) a las dosis de 400 mg · kg⁻¹ y 200 mg · kg⁻¹ respectivamente, o su combinación, mostraron efecto hipoglucemiante entre la primera y séptima hora tras la administración del tratamiento (28,56%, 47,31% y 24,78% respectivamente), aunque también consideraron los autores poco probable la existencia de una acción sinérgica¹.

Los resultados de esta investigación coinciden con los presentados por Okoli y col⁸ quienes encontraron que el extracto metanólico de la planta entera de *Phyllanthus niruri*, tiene efecto hipoglucemiante en ratas normales. Estos autores probaron dosis de 200 y 400 mg/kg, y midieron la glucemia a las 0,5h, 1h, 2h y 4h. Ezeonwu y col⁹ encontraron un efecto hipoglucemiante sinérgico dosis dependiente del extracto etanólico de

Phyllanthus niruri y *Moringa oleifera*. Se ensayaron en esa investigación dosis de 150, 200, 300 y 500 mg/kg, midiendo la glucemia a las 2h y 3h. Otras investigaciones como las de Lemus y col¹⁰, Mazunder y colaboradores¹¹ y Nwanjo¹², también sugieren que *Phyllanthus niruri* tiene un efecto hipoglucemiante, si bien en estos se administraron dosis diarias por un tiempo que alcanzó o superó los 14 días, investigaciones éstas realizadas en ratas normales y diabéticas. Aunque el mecanismo hipoglucemiante no se conoce, se sugiere una acción parecida a la insulina⁸.

Dado que en el presente estudio solo se valoró el efecto agudo de una dosis única, midiendo la glucemia tras 2h de la administración del tratamiento, sus resultados son necesariamente limitados, y solo sugieren la potencial utilidad de la planta *Phyllanthus niruri* en el tratamiento de la diabetes mellitus. Por esto, resulta conveniente en el futuro, proponer nuevos objetivos de investigación, que implican a la vez cambios metodológicos para, por ejemplo, valorar el efecto hipoglucemiante del material vegetal seco, lo que facilitaría una valoración dosis – respuesta, incluyendo en los ensayos animales de experimentación normoglicémicos, pero también con diabetes inducida.

Finalmente, considerando que la diabetes mellitus es una enfermedad crónica, puede sugerirse también valorar el efecto hipoglucemiante tras la administración de dosis múltiples interdiarias durante períodos prolongados de tiempo, que permitirían al mismo tiempo realizar evaluaciones toxicológicas subcrónicas y crónicas de la planta. En éste sentido, debe señalarse que, hasta el presente, son pocos los hallazgos toxicológicos registrados para la planta *Phyllanthus niruri*; por ejemplo necrosis hemorrágica en túbulos renales¹³. Otras investigaciones no han encontrado evidencia de genotoxicidad, citotoxicidad y toxicidad subcrónica¹⁴. Ensayos de toxicidad aguda tampoco han arrojado evidencia de efectos tóxicos tras valorar cambios hematológicos y de química sanguínea, incluyendo actividad de

enzimas hepáticas, sugiriendo una dosis letal 50 superior a los 5.000 mg por kilogramo de peso vivo¹⁵.

Se concluye que el extracto acuoso de la planta entera de *Phyllanthus niruri* tiene un efecto hipoglucemiante similar al extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica* a la dosis probada, pero no un efecto sinérgico en ratas normales.

AGRADECIMIENTO

La investigación fue realizada con el apoyo financiero del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), Proyecto N° CC-0381-11.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ebong PE, Atangwho IJ, Eyong EU, Egbung GE. The antidiabetic efficacy of combined extracts from two continental plants: *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) and *Vernonia amygdalina* (Del.) (African Bitter Leaf). *Am J Biochem Biotechnol* 2008;4:239-244.
2. Khatkar S, Priyanka D, Sachin, Malik N, Khatkar A, Redhu N. Biological and medicinal properties of *Azadirachta indica*: a review. *IJPPR* 2013;4:979-985.
3. Akpan HD, Ekaidem IS, Usuh IF, Ebong PE, Isong NB. Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* (neem) leaves some indices of pancreatic function in alloxan-induced diabetic wistar rats. *Pharmacologia* 2012;3:420-425.
4. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. República Bolivariana de Venezuela. (2008). Código de Bioética y Bioseguridad. 3ra ed. Caracas. Accesado 28 julio 2014. Disponible en: <http://www.fonacit.gov.ve/documentos/bioetica2009.pdf>.
5. Das L, Gunindro N, Ghosh R, Debbarma A. Mechanism of action of *Azadirachta indica* Linn. (Neem) aqueous leaf extract as hypoglycemic agent. *Indian Med Gaz* 2014;1:29-32.
6. Pandey A, Tripathi P, Pandey R, Srivastava R, Goswami S. Alternative therapies useful in the management of diabetes: A systematic review. *J Pharm BioAllied Sci* 2011;3:504-512.
7. Rahman MW, Mostofa M, Sardar SA, Sultana MR,

- Haque MM, Choudhury ME. Investigation of comparative hypoglycemic effect of Neem (*Azadirachta indica*), Karala (*Momordica charantea*) and Nayantara (*Cathranthus roseus*) with Glibenclamide on rat. *Int J Pharmacol* 2005;1:257-260.
8. Okoli CO, Ibiam AF, Ezike AC, Akah PA, Okoye TC. Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. *Afr J Biotechnol* 2010;9:248-259.
9. Ezeonwu VU. Effects of bi-herbal ethanolic extract of *Phyllanthus niruri* and *Moringa oleifera* on the plasma glucose level and hematological parameters of streptozotocin-induced diabetic albino rats. *JMAB* 2012;4:26-31.
10. Lemus M, Ramos Y, Liscano A, D'Armas H. Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* (euphorbiaceae) en ratas diabéticas. *Revista Científica FCV-LUZ* 2013; 23:11-18.
11. Mazunder UK, Gupta M, Rajeshwar Y. Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *Phyllanthus niruri* (euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur Bull Drug Res* 2005;13:15-23.
12. Nwanjo H. Studies on the effect of aqueous extract of *Phyllanthus niruri* leaf on plasma glucose level and some hepatospecific markers in diabetic wistar rats. *IJLM*. 2006; 2. Accesado 5 julio 2014. Disponible en <http://ispub.com/IJLM/2/2/3286>.
13. Ajibade VA, Famurewa O. Histopathological and Toxicological effects of crude saponin extract from *Phyllanthus niruri*, L (Syn. *P. franternus*. Webster) on Organs in animal studies. *GJMR* 2012;12:1-8.
14. Asare G.A, Bugyei K, Sittie A, Yahaya E.S, Gyan B, Adjei S, Addo P, Wiredu E.K, Adjei DN, Nyarko AK. Genotoxicity, cytotoxicity and toxicological evaluation of whole plant extracts of the medicinal plant *Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae). *GMR* 2012;100-111.
15. Asare GA, Addo P, Bugyei K, Adjei S, Otu-Nyarko LS, Wiredu EK, Nyarko A. Acute toxicity studies of aqueous leaf extract of *Phyllanthus niruri*. *Interdiscip Toxicol* 2011;4: 206-210.