Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum Schubert* "pie de perro" en ratas diabéticas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctora en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Diana Rosa RENGIFO ZEVALLOS

ASESOR

Dr. Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rengifo D. Efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum Schubert* “pie de perro” en ratas diabéticas [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diana Rosa Rengifo Zevallos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08743599
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0001-1105-1028
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Pablo Enrique Bonilla Rivera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07212707
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7286-6810
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10223170
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Arroyo Acevedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06785241
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09597625

Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Pablo Enrique Bonilla Rivera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07212707
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos terapéuticos: (Estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos).
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima (Cercado de Lima – Barrios Altos) Urbanización: No aplica Manzana y lote: No aplica Calle: Av. Miguel Grau N°. 755 Latitud: -12.05547 Longitud: -77.0235
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2017 - 2024 (con pausa por la pandemia de COVID-19, 2020-2022)
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **13:30 hrs. del 25 de setiembre de 2025** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por la: Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (asesor), Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo y el Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa, para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **EFECTOS HIPOGLUCEMIANTE Y CICATRIZANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Desmodium vargasianum Schubert* "pie de perro" EN RATAS DIABÉTICAS,** presentado por la Magíster en Administración de Servicios de Salud **Diana Rosa Rengifo Zevallos.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctora en Farmacia y Bioquímica**, Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

18 (Dieciocho) – Muy Bueno – B

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Magíster en Administración de Servicios de Salud **Diana Rosa Rengifo Zevallos,** el Grado Académico de **Doctora en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 16:10 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 16:30 hrs. del 25 de setiembre del 2025

Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha (P. P. T.C.)
Presidenta

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Miembro - Asesor

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P. P.T.C.)
Miembro

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P.P. T.P.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N° 058/FFB-UPG/2015 de la tesis, cuyo título es: **EFECTOS HIPOGLUCEMIANTE Y CICATRIZANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro" EN RATAS DIABÉTICAS,** presentado por la Mg. **DIANA ROSA RENGIFO ZEVALLOS,** para optar al Grado Académico de Doctora en Farmacia y Bioquímica, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **9**% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención al optar al Grado Académico de Doctora en Farmacia y Bioquímica de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 14 de diciembre del 2023

Firma del Asesor _____

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera

DNI: 07212707

DEDICATORIA

A Dios, autor universal de la vida
y de las muchas moradas.
Con mucho amor, a mi madre María
y en memoria de mi padre Luis.
A mi familia, hermanos y amigos,
motivos de superación y fortaleza.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a mi asesor, Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, por su excelente guía, generosidad y paciencia.

Mi agradecimiento al Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo por su orientación y apoyo en las metodologías farmacológicas.

A mis amigos y colegas, que contribuyeron en la realización del presente trabajo de investigación.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica por los gratos e inolvidables años de estudios.

A los docentes de las asignaturas de posgrado del doctorado en Farmacia y Bioquímica, por sus aportes y sugerencias; en especial, mi agradecimiento póstumo al Dr. Fernando Gilbert Quevedo Ganoza.

Mi agradecimiento póstumo al Dr. José Ernesto Raez González por su apoyo invaluable en la lectura de los cortes histológicos, y mi agradecimiento póstumo a la Dra. Bertha Jurado Teixeira, del Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional.

Al Honorable Jurado por sus sugerencias y valiosos conocimientos:

Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha, Presidenta
Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo, Miembro
Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa, Miembro

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Capítulo I. Introducción	
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Justificación teórica	3
1.4. Justificación práctica	4
1.5. Objetivos	5
1.5.1. Objetivo general	5
1.5.2. Objetivos específicos	5
Capítulo II. Marco teórico	6
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación	6
2.2. Antecedentes de la investigación	7
2.2.1. Investigaciones realizadas en especies de *Desmodium*	7
2.2.1.1. Aspecto fitoquímico	7
2.2.1.2. Efecto hipoglucemiante	10
2.2.1.3. Efecto cicatrizante	13
2.3. Bases teóricas	14
2.3.1. Desmodium *vargasianum*	14
2.3.2. Fitoquímicos de la familia fabácea con potencial antidiabético	18
2.3.3. Fármacos antidiabéticos	30
2.3.4. Bases bioquímicas de la diabetes mellitus	31
2.3.4.1. Diabetes mellitus tipo 1	31
2.3.4.2. Diabetes mellitus tipo 2	34
2.3.5. La cicatrización	40
2.3.5.1. Fases de la cicatrización	40
2.3.5.2. Heridas crónicas en diabetes mellitus	48

Pág.

Capítulo III. Metodología 50
3.1. Tipo y diseño de investigación 50
3.1.1. Tipo de investigación 50
3.1.2. Método y diseño de investigación 50
3.2. Material de laboratorio, reactivos y equipos 50
3.3. Muestra de animales de experimentación 51
3.3.1. Unidad de análisis 51
3.3.2. Población y muestra animal 51
3.3.3. Criterios de inclusión y exclusión 51
3.4. Muestra vegetal 51
3.4.1. Unidad de análisis 51
3.4.2. Población y muestra vegetal 52
3.4.3. Criterios de inclusión y exclusión 52
3.5. Procesamiento de la muestra vegetal 52
3.5.1. Recolección y clasificación taxonómica de la especie 52
3.5.2. Obtención del extracto etanólico 56
3.6. Estudio fitoquímico 56
3.6.1. Ensayo de solubilidad 56
3.6.2. Tamizaje fitoquímico 56
3.6.3. Estudio cromatográfico 58
3.6.3.1. Fraccionamiento de flavonoides 58
3.6.3.2. Cromatografía en capa fina 60
3.6.3.3. Cromatografía en capa fina a escala preparativa 60
3.6.4. Estudio de espectrofotometría UV-Vis 60
3.6.5. Cuantificación de flavonoides totales 61
3.6.6. Cuantificación de taninos totales 61
3.6.7. Cuantificación de alcaloides totales 62
3.7. Ensayo de toxicidad aguda oral 62
3.8. Efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico 63
3.8.1. Efecto hipoglucemiante 63

Pág.

3.8.2. Efecto cicatrizante 64
3.9. Estudio histológico 65
3.9.1. Efecto hipoglucemiante 65
3.9.2. Efecto cicatrizante 65
3.10. Evaluación estadística 66
3.11. Consideraciones éticas 66

Capítulo IV. Resultados y discusión 67
4.1. Presentación de resultados 67
4.1.1. Estudio fitoquímico 67
4.1.1.1. Determinación del porcentaje de humedad 67
4.1.1.2. Rendimiento del extracto etanólico 67
4.1.1.3. Ensayo de solubilidad 68
4.1.1.4. Tamizaje fitoquímico 68
4.1.1.5. Estudio cromatográfico 69
4.1.1.6. Estudio de espectrofotometría UV-Vis 72
4.1.1.7. Cuantificación de flavonoides totales 77
4.1.1.8. Cuantificación de taninos totales 77
4.1.1.9. Cuantificación de alcaloides totales 78
4.1.2. Evaluación de toxicidad aguda oral 79
4.1.3. Efecto hipoglucemiante del extracto etanólico 80
4.1.3.1. Evaluación de la glucemia basal 81
4.1.3.2. Evaluación de la glucemia a las 0 horas postratamiento 81
4.1.3.3. Evaluación de la glucemia a la 1 hora postratamiento 82
4.1.3.4. Evaluación de la glucemia a las 2 horas postratamiento 84
4.1.3.5. Evaluación de la glucemia a las 4 horas postratamiento 85
4.1.3.6. Evaluación de la glucemia a las 6 horas postratamiento 86
4.1.3.7. Evaluación de la glucemia a las 24 horas postratamiento 87
4.1.3.8. Evaluación de la glucemia a las 48 horas postratamiento 89
4.1.3.9. Evaluación de la glucemia a las 72 horas postratamiento 90

Pág.

4.1.3.10. Evaluación de la glucemia a las 96 horas postratamiento 91
4.1.3.11. Evaluación de la glucemia durante las 6 horas postratamiento 93
4.1.3.12. Evaluación de la glucemia durante las 96 horas postratamiento 95
4.1.3.13. Evaluación del área bajo la curva (AUC) de la glucemia durante las 6 horas postratamiento 98
4.1.3.14. Evaluación del área bajo la curva (AUC) de la glucemia durante las 96 horas postratamiento 100
4.1.4. Estudio histológico del páncreas en ratas diabéticas 103
4.1.5. Evaluación del efecto cicatrizante en ratas diabéticas 104
4.1.5.1. Resistencia a la tensión postratamiento en ratas diabéticas 104
4.1.5.2. Correlación de las variables glucemia y resistencia a la tensión 105
4.1.6. Estudio histológico de heridas cutáneas en ratas diabéticas 106
4.2. Discusión de resultados 107
4.3. Pruebas de hipótesis 122

Conclusiones 124
Recomendaciones 125
Referencias bibliográficas 126

Anexos

Anexo 1. Identificación taxonómica de *Desmodium vargasianum.* 175
Anexo 2. Diagrama esquemático del proceso de adsorción de flavonoides totales en resina Diaion HP-20. 176
Anexo 3. Representación del reactivo de Neu y sus vías de reacción en flavonoles y flavonas. 177
Anexo 4. Espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$, $AlCl_3$ + HCl) de la fracción F1. 178
Anexo 5. Espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$,) de la fracción F2. 179
Anexo 6. Espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$,) de la fracción F3. 180
Anexo 7. Formación de ROS en el ciclo redox de aloxano. 181
Anexo 8. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de normalidad (Shapiro Wilk). 182

Pág.

Anexo 9. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene). 182

Anexo 10. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de ANOVA de un factor. 183

Anexo 11. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de Tukey. 184

Anexo 12. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo). 187

Anexo 13. Comparaciones múltiples de las glucemias durante las 6 horas postratamiento. Prueba de Tukey. 188

Anexo 14. Comparaciones múltiples de las glucemias durante las 96 horas postratamiento. Prueba de Tukey. 189

Anexo 15. Comparación de las glucemias entre los grupos experimentales a las 6 y 96 horas postratamiento. 190

Anexo 16. Variación del peso corporal en el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Desmodium vargasianum.* 191

Anexo 17. Evaluación del AUC de la glucemia durante las 6 y 96 horas postratamiento. Prueba de Normalidad (Shapiro Wilk). 192

Anexo 18. Evaluación del AUC de la glucemia durante las 6 y 96 horas postratamiento. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene). 192

Anexo 19. Evaluación del AUC de la glucemia durante las 6 y 96 horas postratamiento. Prueba de ANOVA de un factor. 193

Anexo 20. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de normalidad (Shapiro Wilk). 194

Anexo 21. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene). 194

Anexo 22. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de ANOVA de un factor. 195

Anexo 23. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de Tukey. 195

Pág.

Anexo 24. Fotomicrografías de cortes histológicos del páncreas de ratas diabéticas tratadas con el extracto de *D. vargasianum.* 196

Anexo 25. Fotomicrografías de cortes histológicos de heridas cutáneas en ratas diabéticas postratamiento con el extracto de *D vargasianum.* 199

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios de algunas especies de *Desmodium.* 7

Tabla 2. Metabolitos secundarios de fabáceas con efecto hipoglucemiante. 26

Tabla 3. Fármacos antidiabéticos 29

Tabla 4. Porcentaje de humedad de hojas frescas y secas de *D. vargasianum.* 67

Tabla 5. Rendimiento del extracto etanólico. 67

Tabla 6. Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum.* 68

Tabla 7. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum.* 68

Tabla 8. Revelado de flavonoides en cromatografía en capa fina. 70

Tabla 9. Señales con reactivos de desplazamiento del espectro UV de la fracción F1. 72

Tabla 10. Señales con reactivos de desplazamiento del espectro UV de la fracción F2. 73

Tabla 11. Señales con reactivos de desplazamiento del espectro UV de la fracción F3. 73

Tabla 12. Resultados de la cuantificación de alcaloides. 79

Tabla 13. Variación de peso corporal en la prueba de toxicidad aguda. Prueba de Tukey. 80

Tabla 14. Comparación de las glucemias basales entre los grupos experimentales. 81

Tabla 15. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 0 horas postratamiento. 82

Tabla 16. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a la 1 hora postratamiento. 83

Tabla 17. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 2 horas postratamiento. 85

Tabla 18. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 4 horas postratamiento. 86

Pág.

Tabla 19. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 6 horas postratamiento. 87

Tabla 20. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 24 horas postratamiento. 88

Tabla 21. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 48 horas postratamiento. 89

Tabla 22. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 72 horas postratamiento. 91

Tabla 23. Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 96 horas postratamiento. 92

Tabla 24. Niveles de glucemias de los grupos experimentales durante las 6 horas postratamiento. 93

Tabla 25. Niveles de glucemias de los grupos experimentales durante las 96 horas postratamiento. 96

Tabla 26. Comparación del área bajo la curva (AUC) de las glucemias entre los grupos experimentales durante las 6 horas postratamiento. 98

Tabla 27. Área bajo la curva de las glucemias y los porcentajes de eficacia relativa hipoglucemiante durante las 6 horas postratamiento. 99

Tabla 28. Comparación del área bajo la curva (AUC) de las glucemias entre los grupos experimentales durante las 96 horas postratamiento. 101

Tabla 29. Área bajo la curva de las glucemias y los porcentajes de eficacia relativa hipoglucemiante de los grupos experimentales durante las 96 horas postratamiento. 102

Tabla 30. Resistencias a la tensión de los grupos experimentales a las 96 horas postratamiento. 104

Tabla 31. Comparación de las resistencias a la tensión entre los grupos experimentales a las 96 horas postratamiento. 105

Tabla 32. Correlación de Spearman entre la resistencia a la tensión y la glucemia de los grupos experimentales a las 96 horas postratamiento. 105

Pág.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *D. vargasianum*. Field Museum of Natural History – Herbarium 15
Figura 2. Partes de *D. vargasianum* 16
Figura 3. *D. vargasianum*, hoja sección transversal 17
Figura 4. Estructura básica de los flavonoides 18
Figura 5. Tipos de flavonoides: estructuras 19
Figura 6. Flavonoles del género *Desmodium*: estructuras representativas 20
Figura 7. Flavonas del género *Desmodium*: estructuras representativas 21
Figura 8. Taninos hidrolizables: estructuras representativas 22
Figura 9. Estructura del ácido tánico 23
Figura 10. Taninos condensados: estructuras representativas 24
Figura 11. Tipos de alcaloides según su estructura química: alcaloides representativos del género *Desmodium* 25
Figura 12. Diabetes mellitus tipo 1: patogenia 33
Figura 13. Diabetes mellitus tipo 2: mecanismos de la resistencia a la insulina 35
Figura 14. Cicatrización: fases 47
Figura 15. *D. vargasianum* Schubert: partes aéreas 53
Figura 16. Flujograma de la obtención del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* "pie de perro" 54
Figura 17. Flujograma del estudio fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* "pie de perro" 55
Figura 18. Tamizaje fitoquímico 57
Figura 19. Fraccionamiento de flavonoides con resina Diaion HP-20 59
Figura 20. Cromatografía de flavonoides revelada con reactivo de Neu + PEG-400 y visualizada con luz UV 365 nm 70
Figura 21. Cromatografía preparativa del eluato MeOH: H2O (60:40) de la fracción n-BuOH separado con resina adsorbente Diaion HP-20 70
Figura 22. Cromatografía de los eluatos de resina Diaion HP-20 de la fracción n-BuOH frente a estándares 71

Pág.

Figura 23. Propuesta de las posibles estructuras parciales de los flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* 76
Figura 24. Curva de calibración utilizando quercetina como estándar a 415 nm 77
Figura 25. Curva de calibración utilizando ácido tánico como estándar a 700 nm 78
Figura 26. Evaluación de la glucemia durante las 6 horas postratamiento 94
Figura 27. Reducción de las glucemias (%) durante las 6 horas postratamiento 94
Figura 28. Evaluación de la glucemia durante las 96 horas postratamiento 96
Figura 29. Reducción de las glucemias (%) durante las 96 horas postratamiento 97
Figura 30. Gráfica de la regla de Simpson 1/3 98
Figura 31. Gráfica de la regla de Simpson 1/3 compuesto 100

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de *Desmodium vargasianum* (EDV) en ratas diabéticas. Se trabajó con 48 ratas divididas en 6 grupos, dos grupos controles y cuatro grupos para los tratamientos con EDV en dosis de 50, 250 y 500 mg/kg (EDV 50, 250 y 500) y glibenclamida en dosis de 5 mg/kg (GB 5). Se indujo diabetes con aloxano 130 mg/kg, i.p. Transcurridas 48 horas se hicieron heridas incisas en el dorso y se les administraron los tratamientos por vía oral (intragástrica) durante 4 días, realizando mediciones de glucemia postratamiento. Al final del experimento se evaluó el efecto cicatrizante por el método tensiométrico. Además, se realizó el estudio fitoquímico y la toxicidad aguda oral del extracto etanólico. Los resultados del experimento mostraron que los grupos con tratamiento presentaron reducciones significativas de glucemia ($p<0.05$) con respecto al control positivo y mediante la prueba AUC de glucemia se corroboró que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre EDV 250 y EDV 500. Asimismo, los grupos con tratamiento presentaron diferencias significativas en la resistencia a la tensión ($p<0.01$) con respecto al control positivo. Por otro lado, se confirmó la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides; la cuantificación de flavonoides totales fue de 202.1 ± 1.1 mg QE/g y de taninos 178.5 ± 0.8 mg ATE/g, y se determinó la presencia de flavonas C-glicosiladas. Además, se determinó que EDV no es tóxico. En conclusión, EDV tiene efectos hipoglucemiante y cicatrizante en ratas diabéticas.

PALABRAS CLAVES: *Desmodium vargasianum*, metabolitos secundarios, hipoglucemiante, cicatrizante.

SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the hypoglycemic and wound healing effects of the ethanolic extract of *Desmodium vargasianum* (EDV) in diabetic rats. Forty-eight rats were used, divided into 6 groups, two control groups and four groups for treatments with EDV in doses of 50, 250, and 500 mg/kg (EDV 50, 250, and 500) and glibenclamide in doses of 5 mg/kg (GB 5). A doses of 130 mg/kg, i.p of alloxan was administered. After 48 hours, incised wounds were made on the backs rats, and treatments were administered by oral via (intragastric) for 4 days, with post-treatment blood glucose measurements were taken. In the final of the experiment, the wound healing effect was evaluated by the tensiometric method. In addition, the phytochemical study and the acute oral toxicity of the ethanolic extract were carried out. The experiment results showed that the treatment groups had significant reductions in blood glucose ($p<0.05$) compared to the positive control, and through the glucose AUC test, it was confirmed that there was no significant difference ($p>0.05$) between EDV 250 and EDV 500. Furthermore, the treatment groups showed significant differences in tensile strength ($p<0.01$) compared to the positive control. On the other hand, the presence of flavonoids, tannins, and alkaloids was confirmed; total flavonoid content was quantified at 202.1 ± 1.1 mg QE/g and tannins at 178.5 ± 0.8 mg ATE/g, and the presence of C-glycosylated flavones was determined. In addition, it was found that EDV is not toxic. In conclusion, EDV has hypoglycemic and wound healing effects in diabetic rats.

KEYWORDS: *Desmodium vargasianum*, secondary metabolites, hypoglycemic, wound healing.

SUMÁRIO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos hipoglicemiante e cicatrizante do extrato etanólico de *Desmodium vargasianum* (EDV) em ratos diabéticos. Foram utilizados 48 ratos divididos em 6 grupos, dois grupos de controle e quatro grupos para os tratamentos com EDV nas doses de 50, 250 e 500 mg/kg (EDV 50, 250 e 500) e glibenclamida na dose de 5 mg/kg (GB 5). A diabetes foi induzida por aloxano 130 mg/kg, i.p. Após 48 horas, foram feitas incisões nas costas dos ratos e os tratamentos foram administrados por via oral (intragástrica) durante 4 dias, realizando medições de glicemia pós-tratamento. No final do experimento, avaliou-se o efeito cicatrizante pelo método tensiométrico. Além disso, foi realizado o estudo fitoquímico e da toxicidade oral aguda do extrato etanólico. Os resultados do experimento mostraram que os grupos de tratamento apresentaram reduções significativas de glicemia ($p<0,05$) em relação ao controle positivo, e pela prova AUC da glicemia, confirmou-se que não há diferença significativa ($p>0,05$) entre EDV 250 e EDV 500. Além disso, os grupos de tratamento apresentaram diferenças significativas na resistência à tensão ($p<0,01$) em relação ao controle positivo. Por outro lado, foi confirmada a presença de flavonóides, taninos e alcaloides; a quantificação de flavonoides totais foi de 202,1 ± 1,1 mg QE/g e de taninos de 178,5 ± 0,8 mg ATE/g, e a presença de flavonas C-glicosiladas foi determinada. Além disso, o EDV foi determinado como não tóxico. Em conclusão, o EDV tem efeitos hipoglicemiante e cicatrizante em ratos diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Desmodium vargasianum*, metabólitos secundários, hipoglicemiante, cicatrizante.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

La diabetes es una de las cuatro enfermedades no transmisibles causantes de mortalidad prematura y cuya prevalencia ha aumentado progresivamente en las últimas décadas. A nivel mundial, dentro de las 10 principales causas de defunción, se encuentra en primer lugar la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular[1]; las cuales constituyen las principales complicaciones microvasculares de la diabetes[2]. Asimismo, la diabetes es una causa importante de ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y amputación de los miembros inferiores[3]. A medida que la tendencia de la obesidad vaya en aumento, se tiene mayor riesgo de padecer diabetes y a las complicaciones que puede ocasionar esta enfermedad[4]. La diabetes afecta el proceso de cicatrización de heridas y se prevé que las personas con heridas crónicas en todo el mundo también aumenten[5]. A lo largo de los años, el tratamiento de las heridas crónicas, ha tenido enormes implicaciones sociales y económicas en todo el mundo[6]. Las heridas que no cicatrizan son más que una carga de costos, ya que se ha demostrado que causan pérdida de movilidad y capacidad para realizar diariamente las tareas, pérdida de participación en la fuerza laboral y mala calidad de la vida[7,8]. Por ello, es importante el tratamiento de heridas, para reducir las consecuencias no deseadas[9].

En el Perú, la diabetes es una enfermedad muy prevalente en la población de 15 a más años de edad. Por región natural, en 2017, el mayor porcentaje de personas con diagnóstico de diabetes se encontró en Lima Metropolitana (4.4 %), resto de la Costa (4.0 %) y menor porcentaje en la Sierra (1.8 %) y Selva (2.7 %)[10].

En cuanto, a los medicamentos más utilizados que se prescriben para el tratamiento de la diabetes tipo 1 es la insulina y para la diabetes tipo 2, en la monoterapia: metformina y en la terapia combinada: metformina más una sulfonilurea/tiazolidinediona/inhibidor de DDP-4/inhibidor del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2/agonistas del receptor GLP-1/insulina (ADA, 2018)[11]. Sin embargo, estos medicamentos pueden causar diferentes reacciones adversas, siendo de importancia el riesgo de hipoglucemia en el uso no controlado de las sulfonilureas y meglitinidas, y con la insulina el riesgo de hipoglucemia, cetoacidosis diabética

hasta el coma[12]. Las sulfonilúreas pueden causar hipoglucemia cuando es tomado con medicamentos, tales como: anticoagulantes, cloranfenicol, fluconazol, antagonistas de H2, inhibidores de MAO, sulfonamidas y antidepresivos tricíclicos; entre las interacciones con otros medicamentos es que pueden disminuir el efecto reductor de glucosa de las sulfonilureas al aumentar el metabolismo hepático y la excreción renal, o inhibiendo la secreción de insulina[12]. En el grupo de biguanidas se encuentra la metformina, que es el fármaco de elección para la diabetes tipo 2, especialmente para personas con sobrepeso, pero está contraindicado en casos que presenten enfermedades renales, pacientes con enfermedad pulmonar grave, falla cardiaca descompensada, enfermedad hepática extrema, o alcoholismo crónico[12].

Una de las estrategias de la OMS sobre medicina tradicional y complementaria (MTC) para el periodo 2014-2023 es su incorporación en los sistemas de salud, que tiene como objetivo aprovechar su posible contribución a la salud. En los sistemas de salud a nivel mundial, la integración de la MTC a la medicina convencional es sumamente apropiada para tratar enfermedades crónicas, dar calidad de vida al paciente cuando la curación no es posible[13].

Desmodium vargasianum, es una especie nativa del Perú, cuyas hojas son empleadas en decocción como analgésico, diurético, afecciones hepáticas, depurador renal, mialgias, antiinflamatorio[14] y en el lavado de heridas infectadas[15]. En nuestro país la especie *Desmodium vargasianum* ha sido estudiada en el aspecto morfo – histológico, microhistoquímico[16] y análisis fitoquímico preliminar de hojas y tallos[17]. Por otro lado, en la literatura no se han reportado estudios sobre los potenciales efectos hipoglucemiante y cicatrizante de la especie *Desmodium vargasianum*. En nuestro país, se han realizado estudios sobre el efecto cicatrizante[18] en la especie *Desmodium molliculum* y otros ensayos sobre su efecto antibacteriano[19,20,21] y efecto antiinflamatorio[22].

1.2. Formulación del problema

La diabetes es una enfermedad crónica de alta prevalencia en el Perú y en el mundo, es causante de mortalidad prematura por las complicaciones asociadas en el curso de la enfermedad, incluyendo las heridas crónicas que no cicatrizan y pueden llegar a la amputación de miembros inferiores, y por otro lado, los efectos adversos que pueden ocasionar el uso de los fármacos antidiabéticos, trae consigo que el tratamiento de la diabetes sea integrado a la medicina complementaria mediante el uso de plantas medicinales antihiperglucemiantes y a la vez mejoren el proceso de cicatrización de heridas cutáneas; es así que cabe preguntar si **¿El extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert tendrá los efectos hipoglucemiante y cicatrizante en ratas diabéticas?**

1.3. Justificación teórica

En la literatura se ha reportado muchas investigaciones en diferentes especies de la familia Fabácea, habiéndose encontrado que un gran número de especies tienen efecto hipoglucemiante por la presencia de metabolitos secundarios. Las investigaciones realizadas en el extranjero en diferentes especies del género *Desmodium* tales como *D. gangeticum*, *D. oblongum*, *D. triquetrum*, *D. caudatum*, *D. gyrans*, *D. adscendens*, *D. sambuens*, *D. styracifolium,* reportan la presencia de compuestos fenólicos entre ellos glucósidos fenólicos, flavonoides[23,24,25,26,27,28,29,30,31], taninos[29]; triterpenos[24], alcaloides[32] y saponinas[33]. Asimismo, en el extranjero se realizaron investigaciones del género *Desmodium* en ensayos in vivo e in vitro en las especies *D. pulchelum*, *D. gangeticum*, *D. triflorum*, *D. velutinum*, *D. gyrans*, *D triquetrum*, que demuestran su efecto antioxidante[34], antimicrobiano[35,15], analgésico[36], antiinflamatorio[35], hipoglucemiante[37,38,39,40,41,42,43] y cicatrizante[41,44,45]. En nuestro país tenemos dos especies conocidas como *D. molliculum* y *D. vargasianum*, de las cuales se han realizado investigaciones en la especie *Desmodium molliculum* que demuestran su efecto cicatrizante[46,47], antiinflamatorio[48], analgésico[48], hepatoprotector[49], anticonceptivo y postcoital[50]. Asimismo, tenemos la especie *Desmodium vargasianum* en la cual sólo se ha reportado su efecto antiinflamatorio[51]. Es así que, en base a estos antecedentes se decidió realizar el presente estudio para evaluar los efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto de *Desmodium vargasianum* en ratas diabéticas.

1.4. Justificación práctica

Las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud al integrar la medicina complementaria con la medicina convencional[52], tal es el caso del tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes para prevenir las complicaciones que causa esta enfermedad, dentro de ellas las heridas crónicas. Asimismo, considerando que la diabetes es una enfermedad crónica muy prevalente[10], causante de mortalidad prematura[53] con tratamiento largo y costoso, es importante realizar un estudio sobre los potenciales efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* en ratas diabéticas, así como determinar los principales metabolitos secundarios presentes en la planta, que pudiesen explicar estos efectos. Al demostrar estos efectos, es un aporte a la medicina complementaria, teniendo en cuenta que esta especie se encuentra ampliamente distribuida en diferentes departamentos de nuestro país.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar los efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro" en ratas diabéticas.

1.5.2. Objetivos especificos

1. Determinar los principales metabolitos secundarios contenidos en el extracto etanólico.
2. Determinar los tipos de flavonoides contenidos en el extracto etanólico.
3. Cuantificar los flavonoides y taninos totales contenidos en el extracto etanólico.
4. Determinar la toxicidad aguda oral del extracto etanólico a dosis límite.
5. Evaluar si el extracto etanólico administrado por vía oral tiene efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas.
6. Evaluar si el extracto etanólico administrado por vía oral tiene efecto cicatrizante en ratas diabéticas.

CAPITULO 2: MARCO TEORICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

El conocimiento científico es la base de toda investigación y junto con la tecnología encaminan hacia el progreso del investigador y de la sociedad. La ciencia no sólo es "investigación cuantitativa" también se dedica en comprender el mundo objetivo empleando métodos científicos, sin permitir que las limitaciones de la ciencia misma sean capaces de dar acceso a formas de conocimiento no científicos[54].

Las investigaciones siempre se encuentran relacionadas dentro de un complejo de red, del conocimiento científico, tienen lazos consanguíneos dentro de un núcleo en una red esencial de principio y continuidad entre ellas que contribuyen al progreso de la investigación[55].

La presente investigación pretende servir al conocimiento científico en el campo de la medicina tradicional respecto al manejo de plantas medicinales para su empleo en enfermedades crónicas tales como la diabetes mellitus tipo 2 que tiene una alta prevalencia en nuestro país.

2.2. Antecedentes de la investigación

2.2.1. Investigaciones realizadas en especies del género *Desmodium*

2.2.1.1. Aspecto fitoquímico

2.2.1.1.1. Investigaciones en el extranjero

Tabla 1. **Metabolitos secundarios de algunas especies del género *Desmodium.***

Especie	Metabolitos secundarios
D. gangeticum	Aislaron e identificaron compuestos glucósidos: (*6S,9R*)-roseosido **(1)**, kaempferol-3-O-rutinosido (nicotiflorina) **(2)**, quercetin-3-O-rutinosido (rutina) **(3)**, β-sitosterol-3-O- β-D-glucopiranosido **(4)** y ácido protocatequico **(5)**[23].
D. oblongum	Aislaron e identificaron tres nuevos flavonoides C-alquilados: 4'-hidroxi-8-isobutiril-7-metoxi-6-metil-flavona **(1)**, 4,7-dimetoxi-8-isobutiril-6-metil-flavona **(2)**, y 4',7-dimetoxi-8-isobutiril-flavona **(3)**, junto con tres flavonoides conocidos, luteolina **(4)**, kaempferol **(5)** y quercetina **(6)**[25].
D. gangeticum	Aislaron e identificaron del extracto acuoso tres glucósidos fenólicos: β-D-glucopiranosido (**1**), leonurisido A (**2**) y siringaresinol-4'-O-β-D-glucopiranosido (**3**)[26].
D. elegans	Aislaron e identificaron varios alcaloides desmodeleganina (1), bufotenina (2) hidroxi- N, N -dimetiltriptamina N (12) -óxido (3), 2-(5-metoxi-1H-indol-3-il)-N, y N – dimetiletilamina[56].
D. triquetrum	Aislaron y determinaron nueve compuestos fenólicos del extracto etanólico: 6'-O-cis - p - cumaroil-3,5-dihidroxifenil-β-D-glucopiranosido **(1)**, tadehaginosido **(2)**, rutina **(3)**, quercetina-3-O-β-D-glucopiranosido **(4)**, quercetina-3-O-β-D-galactopiranósido **(5)**, 6-O- (E) - p - hidroxi-cinamoil-β-glucosa **(6)**, 6-O- (E) - p - hidroxi-cinamoil-α-glucosa **(7)**, kaempferol-3-O-β-D-rutinosido **(8)** y 3-O-β-D-galactopiranosilo(6-1)-α-L-rhamnosil quercetina **(9)**[27].

Tabla 1. **Metabolitos secundarios de algunas especies del género *Desmodium*** (continuación)

Especie	Metabolitos secundarios
D. caudatum	Identificaron el ácido lacceroico, ácido gédico, estigmasterol, betulina, citrusinol, yukovanol, kaempferol, ácido protocatecuico, sofocarpina, matrina, N, N dimetiltriptamina y 5-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina[28].
D. adscendens	Identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos contenidos en las hojas. Algunos de los compuestos identificados son el ácido p-cumarico, epicatequina, rutina y quercetina. El análisis cuantitativo determinó que las antocianinas se encuentran en mayor cantidad y los taninos condensados en menor cantidad[29].
D. sambuens	Aislaron e identificaron trece compuestos del extracto etanólico: β-amirina **(1)**, ácido betulico **(2)**, daucosterol **(3)**, ácido triacontanoico **(4)**, lup-20(29)-en-3-ona **(5)**, tetracosanoico-2,3-dihidroxipropilester **(6)**, estigmast-5-eno-3 beta, 7alfa-ol **(7)**, metil feoforbida **(8)**, acido O-hidroxibenzoico **(9)**, beta-sitosterol **(10)**, d-catequina **(11)**, luteolina **(12)**, epigalocatequina **(13)**[57].
D. velutinum	Identicaron, taninos: ácido tánico y galotanino; flavonoides: rutina y apigenina; polifenoles: ácido p-cumárico y ácido ferúlico[58].
D. gangeticum	Aislaron e identificaron de las partes aéreas: Compuestos fenólicos tales como, ácido gálico, ácido protocatequico, ácido salicílico, ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina y kaempferol[30].
D. styracifolium	Aislaron e identificaron de la planta entera nueve compuestos: 6-C-glicopiranosil-8-C-arabinosil apigenina **(1)**, 6-C-glicopiranosil luteolina **(2)**, 6-C-glicopiranosil-8-C-xilosil apigenina **(3)**, 6-C-glicopiranosil-8-C-glicopiranosil apigenina **(4)**, apigenina **(5)**, luteolina **(6)**, estigmasterol-3-O-β-D glucopiranósido **(7)**, β - dausterol **(8)** y β-sitosterol **(9)**[59].

Tabla 1. **Metabolitos secundarios de algunas especies del género *Desmodium*** (continuación)

Especie	Metabolitos secundarios
D. styracifolium	Aislaron e identificaron de las partes aéreas un nuevo alcaloide: desmodimina **(1)** y un nuevo metabolito reconocido como goma, llamado desmodilactona **(2)**. Así mismo, se logró aislar e identificar la lupenona **(3)**, lupeol **(4**), tritriacontano **(5**), ácido esteárico **(6)**, beta-sitosterol **(7)** y éster eicosil del ácido eicosanoico **(8)**[31].
D. styracifolium	Aislaron e identificaron de la planta entera dos saponinas triterpenoides y sus estructuras se caracterizaron como soyasaponina I y una nueva saponina, 3-0-[α-L-ramnopiranosil-(l→2)-β-D-galactopiranosil-(1→2)-βD-glucuronopiranosil] soyasapogenol E[33].

2.2.1.1.2. Investigaciones en Perú

Pastor realizó el estudio morfo-histológico y microhistoquímico de *D. vargasianum*. Los ensayos microhistoquímicos revelaron la presencia de ácidos orgánicos, proteínas, alcaloides y taninos en los cortes histológicos de hojas y tallos. Así mismo, el ensayo fitoquímico preliminar dio positivo para esteroides[16].

Barreto y Bonilla realizaron la investigación de metabolitos secundarios contenidos en el extracto de *Desmodium molliculum,* determinando la presencia de flavonoides como genisteína y saponinas[60].

2.2.1.2. Efecto hipoglucemiante

2.2.1.2.1. Investigaciones en el extranjero

Bisht et al. (2013) realizaron el estudio del efecto hipoglucemiante de varios extractos de la planta entera de *D. gangeticum* en ratas albinas Wistar inducidas a diabetes con estreptozotocina – nicotinamida (40 y 110 mg/kg p.c. respectivamente) por vía intraperitoneal. A los 7 días postratamiento con los extractos etanólico y acuoso de *D. gangeticum* 100 mg/kg p.c., los valores promedio de glucemia fueron: 201.7 y 185.7 mg/dl respectivamente y a los 21 días postratamiento los valores promedio de glucemia fueron: 122.1 y 109 mg/dl respectivamente; evidenciándose diferencia significativa ($p<0.01$) con respecto al grupo control de ratas diabéticas[42].

Noor et al. (2013) realizaron el estudio del efecto antidiabético del extracto etanólico de la corteza de *D. pulchelum*, indujeron diabetes con aloxano 120 mg/kg p.c. a ratas albinas Wistar. Las ratas diabéticas tratadas con el extracto de *D. pulchellum* y con glibenclamida mostraron una disminución significativa ($p<0.05$) de glucemia a intervalos de una hora en comparación con el grupo control de ratas diabéticas. Después de 3 horas postratamiento de las ratas diabéticas tratadas con glibenclamida 5mg/kg y extracto de *D. pulchelum* a dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg p.c., las reducciones de glucemia fueron: 73.6, 18.7, 23.5 y 34.0 % respectivamente. De otro lado, el estudio de la toxicidad oral aguda mostró que el extracto de *D. pulchellum* era seguro hasta 4 000 mg/kg de peso corporal y no detectaron anomalías orgánicas macroscópicas[43].

Ramkumar et al. (2020) estudiaron el efecto antidiabético de los compuestos fenólicos de las hojas de *Desmodium triflorum* sobre la glucosa sérica en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. El estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de los compuestos activos de las hojas de *D. triflorum* sobre la glucosa sérica en ratas Wistar machos, normales y diabéticas. Las fracciones aisladas mediante cromatografía en columna de los extractos etanólicos de *D. triflorum* se administraron por vía oral a una dosis de 100 mg/kg p.c. y se utilizó metformina, como fármaco antidiabético estándar (50 mg/kg p.c.). La fracción F, que por análisis espectral

indicó presencia de compuestos fenólicos (grupos hidroxi y galoil), mostró una fuerte actividad antidiabética comparable con metformina[37].

Ramkumar et al. (2020) estudiaron la actividad de inhibición de los extractos etanólicos de hojas de *D. triflorum* sobre las enzimas (aldosa reductasa, α-amilasa y α-glucosidasa), mediante un modelo antidiabético in vitro. La extracción Soxhlet se realizó con una serie de disolventes en orden de polaridad creciente: éter de petróleo, acetato de etilo y etanol. Evaluaron el efecto antidiabético de los extractos concentrados y secos, empleando técnicas estándar in vitro. Los resultados indicaron que el extracto etanólico de *D. triflorum* presenta actividad de inhibición de las enzimas aldosa reductasa, α-amilasa y α-glucosidasa. Este estudio proporciona evidencia científica que el extracto de *D. triflorum* tiene efecto antidiabético[38].

Ozougwu y Akuba (2018) evaluaron la actividad de inhibición del extracto metanólico de hojas de *Desmodium velutinum* (EMHDV) sobre las enzimas α-amilasa pancreática y α-glucosidasa intestinal in vitro y el efecto hipoglucemiante in vivo. El ensayo in vitro se realizó con diferentes concentraciones de EMHDV (20-100 µg/mL) y se utilizó el fármaco acarbosa. Se investigó el efecto hipoglucemiante in vivo del extracto en ratas hiperglucémicas inducidas con carga de almidón y sacarosa. Los resultados mostraron que los valores de IC_{50} de α-amilasa y α-glucosidasa obtenidos para EMHDV (IC_{50} de 88.2 y 83.5 µg/mL) fueron mayores que la acarbosa (IC_{50} de 73.5 y 73.9 µg/mL), lo que sugiere que el EMHDV posee una potencia inhibitoria ligeramente menor que la del estándar farmacológico. Los resultados del efecto hipoglucemiante in vivo revelaron que el extracto de *D. velutinum* logró una reducción significativa ($p<0,05$) de la glucemia posprandial en ratas dentro de las 2 h posteriores a la carga de almidón y sacarosa. Concluyen que EMHDV es un potente inhibidor de enzimas metabolizadoras de carbohidratos y podría ser utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2[39].

Ramadas (2011) estudió los efectos antidiabético y cicatrizante del extracto etanólico de *Desmodium triflorum* en ratas diabéticas Wistar albinos inducidas con aloxano (120 mg/kg p.c., vía i.p) y estreptozotocina (50 mg/kg p.c., vía i.p). Los tiempos de tratamientos para los grupos de ratas diabéticas inducidas con aloxano (glucemia >250 mg/dl) y estreptozotocina

(glucemia > 200 mg/dl) y tratados con dosis de 250 y 500 mg/kg p.c. de extracto etanólico al 70 % de *Desmodium triflorum* fueron de 10 y 15 días respectivamente. Utilizaron glibenclamida a dosis de 10 mg/kg p.c. como fármaco control. Los niveles séricos de glucosa, urea, colesterol y creatinina se redujeron significativamente durante el estudio del efecto antidiabético. Demostraron que *D. triflorum* presentó efecto antidiabético significativo al ser comparado con el grupo control diabético. El efecto cicatrizante del extracto *D. triflorum* administrado por vía oral fue casi similar en comparación al fármaco control (goma de acacia al 2%). Hallaron reducción del tiempo en la contracción del área de la herida, periodo de epitelización y aumento de la resistencia a la rotura de la piel[41].

Govindarajan et al. (2007) evaluaron el efecto del extracto alcohólico liofilizado de las partes aéreas de *Desmodium gangeticum* sobre la glucemia en ratas macho Sprague-Dawley (160-180 g), que fueron inducidas a diabetes con estreptozotocina (50 mg/kg p.c, vía i.p.). Confirmaron la diabetes de las ratas midiendo la glucemia en ayunas 96 h después de la administración de estreptozotocina, las ratas con valores de glucemia superiores a 200 mg/dL fueron consideradas diabéticas y se utilizaron en el experimento. Después de la inducción, las ratas se dividieron en 4 grupos de seis ratas cada uno. Utilizaron goma arábiga (control) para suspender los extractos. Grupo I: ratas no diabéticas que recibieron una solución de goma arábiga al 2%; Grupo II: ratas diabéticas que recibieron una solución de goma arábiga al 2 %; Grupo III: ratas diabéticas tratadas con extracto de *D. gangeticum* a dosis de 200 mg/kg p.c.; Grupo IV: ratas diabéticas tratadas con solución acuosa de glibenclamida a dosis de 600 μg/kg p.c. La administración fue diaria por vía oral, mediante sonda intragástrica. Observaron disminución significativa de la glucemia ($p<0.05$) al final del día 15 del período experimental tras el tratamiento con el extracto de *D. gangetícum*. La dosis de 200 mg/kg p.c. produjo una reducción promedio de glucemia del 37.1 %, mientras que la dosis de glibenclamida 600 μg/kg la redujo significativamente ($p<0.05$) en un 50.7 %. Concluyeron que el extracto de *D. gangetícum* presenta actividad antidiabética, al menos en parte, mediante la estimulación directa de las células β pancreáticas para la secreción de insulina[40].

2.2.1.3. Efecto cicatrizante

2.2.1.3.1. Investigaciones en el extranjero

Shirwaikar et al. (2003) estudiaron el efecto cicatrizante del extracto etanólico de hojas secas de *D. triquetrum* a dosis de 200 mg/kg p.c. por vía oral utilizando modelos de herida por incisión y por excisión en ratas adultos Wistar 200-220 g. Se utilizó emulsión de acacia 1 % como fármaco control. Observaron a los 10 días posherida un incremento en la resistencia a la ruptura de la piel (464 ± 7.30 g) en heridas por incisión, un aumento significativo de la tasa de contracción (90.3 ± 0.86 %), así como un incremento en la resistencia del granuloma y del peso del granuloma seco, acompañado de una disminución significativa en el período de epitelización en heridas por excisión[45].

2.2.1.3.2. Investigaciones en Perú

En nuestro país se han realizado diversas investigaciones sobre el efecto cicatrizante de *Desmodium molliculum* por vía tópica, en las que se ha demostrado su actividad cicatrizante. Entre ellas destacan las realizadas por Aguilar[46], Lozano et al.[18] y Zavaleta[61]. Nuestro trabajo difiere de los anteriores, ya que el efecto cicatrizante se evaluó en ratas diabéticas inducidas con aloxano, mediante administración oral a través de sonda intragástrica.

2.3. Bases teoricas

2.3.1. *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro"

La planta *D. vargasianum* Schubert pertenece al género *Desmodium*, el cual deriva del griego desmos que significa "cinta que sujeta", pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae), subfamilia Faboideae (Papilionoideae) con 275 especies distribuidas en los trópicos y subtrópicos de todo el mundo[62]. En Perú crece varias especies del género *Desmodium*, entre ellas tenemos: *D. adscendens* "pega pega", *D. axilare* "pega pega grande", *D. tortuosum*, *D. triflorum* "trebolillo"[63], *D. incanum* y *D. styracifolium*[64], *D. barbatum*, *D. cajanifolium*, *D. delotum*, *D. distortum, D. glabrum, D. intortum*, *D. molliculum*, *D. uncinatum, D. scorpiorus* y *D. vargasianum*[65].

D. vargasianum Schubert es un subarbusto conocido con los nombres comunes de "pie de perro"[14, 66], "pega pega"[67] y "miñate"[68]. Es subfruticosa y erguida[69], postrado-ascendente de hasta 1.00 m. de alto, muy ramificada[14]. Su tallo es simple estriado y densamente canescente[65]. Presenta hojas compuestas y alternas, pecíolo 1-2 cm de largo, limbo trifoliado, folíolo elíptico, ligeramente mucronado, haz y envés de los folíolos pubescentes[69] y con nervaduras prominentes en el envés[14]. Sus flores son pedunculadas, dispuestas en racimos simples, terminales[14] con raquis finamente angulado y corola papilionada azul-violeta[69]. La flor es de color violáceo, de 10-15 mm de largo, pedicelo 4 - 5 mm de largo, con pelos hirsutos, cáliz sinsépalo[69]. El fruto es un lomento estipitado[14].

D. vargasianum es una planta nativa, crece en Bolivia[70], Ecuador[71] y Perú[65,72], cuyo tipo de hábitat corresponde a zonas de vegetación arbustiva, matorrales, pastizales y bosques montanos secundarios[73]. Son invasoras en cultivos de *Medicago sativa* "alfalfa"[69]. En Perú crece en los departamentos de Apurímac, Ayacucho, Cuzco, Huancavelica, Junín, La Libertad y Lima[65], Ancash, Cajamarca, Lambayeque, La Libertad y Piura[14].

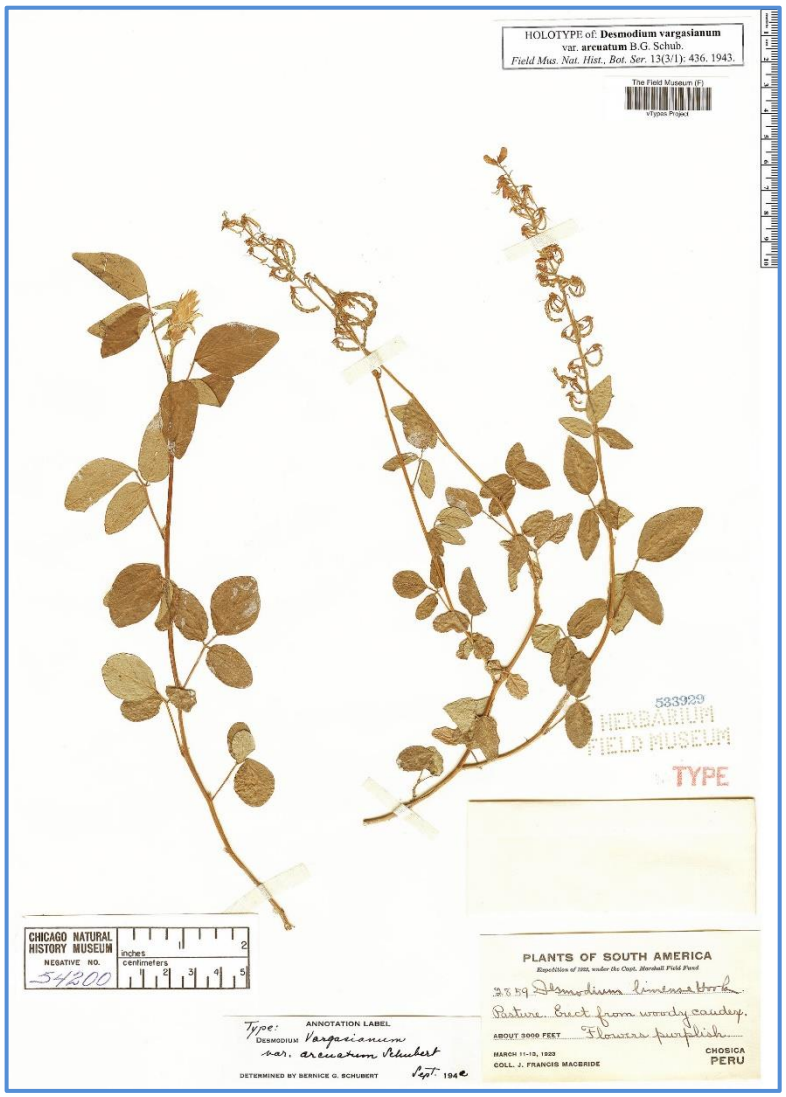


Figura 1**.** ***Desmodium vargasianum***. Field Museum of Natural History - Herbarium

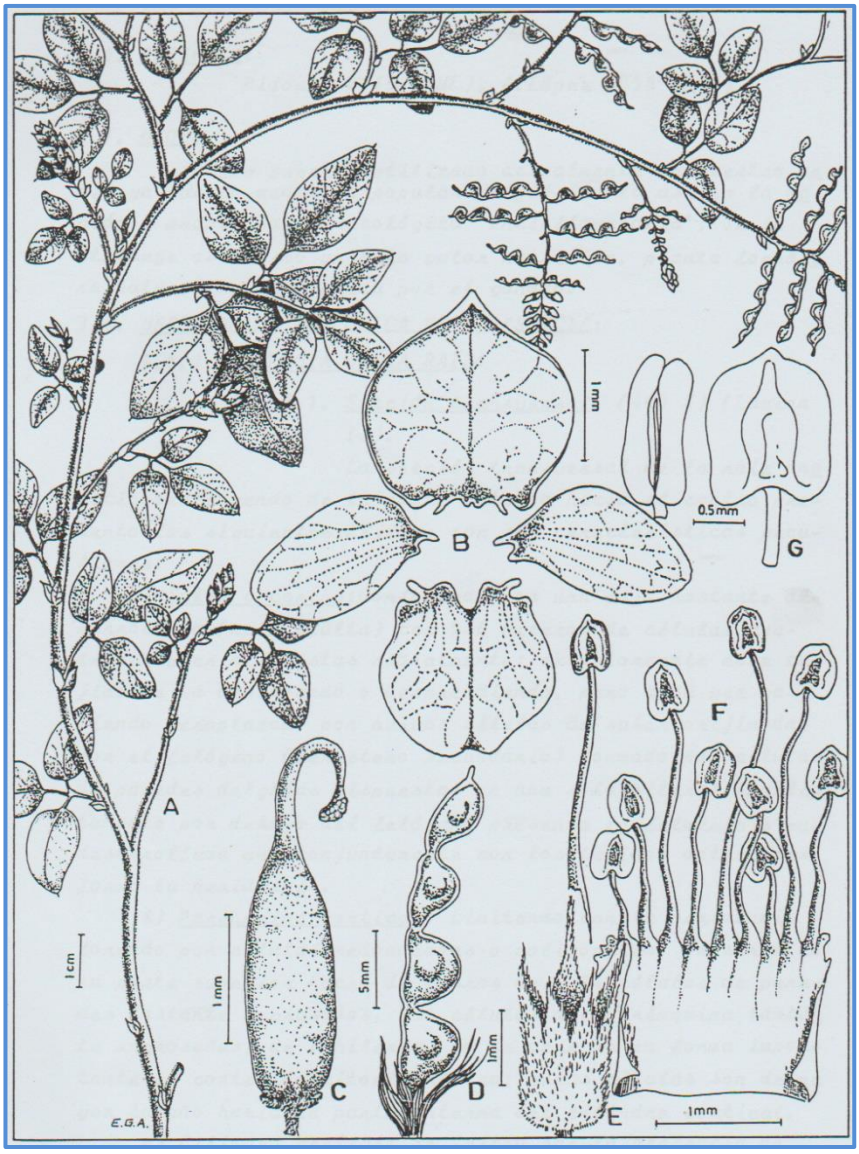


Figura 2. **Partes de *Desmodium vargasianum Schubert*:** A. tallo, B. corola (papilionada), C. gineceo, D. fruto (lomento), E. cáliz, F. androceo (estambres diadelfos), G. detalle de la antera (Fuente: Pastor, 1987[16]).

A nivel histológico, las hojas de *D. vargasianum* presenta parénquima en empalizada en dos hileras de células, con la peculiaridad de que las células de la primera hilera son aproximadamente el doble de longitud de las células de la segunda hilera. Así mismo, el parénquima lagunoso presenta grandes espacios o meatos. Además, esta especie carece en absoluto de estomas en la cara adaxial (superior), en cambio la cara abaxial (envés) los presenta abundantes, grandes y rodeados típicamente de 5-6 células anexas o acompañantes[16].

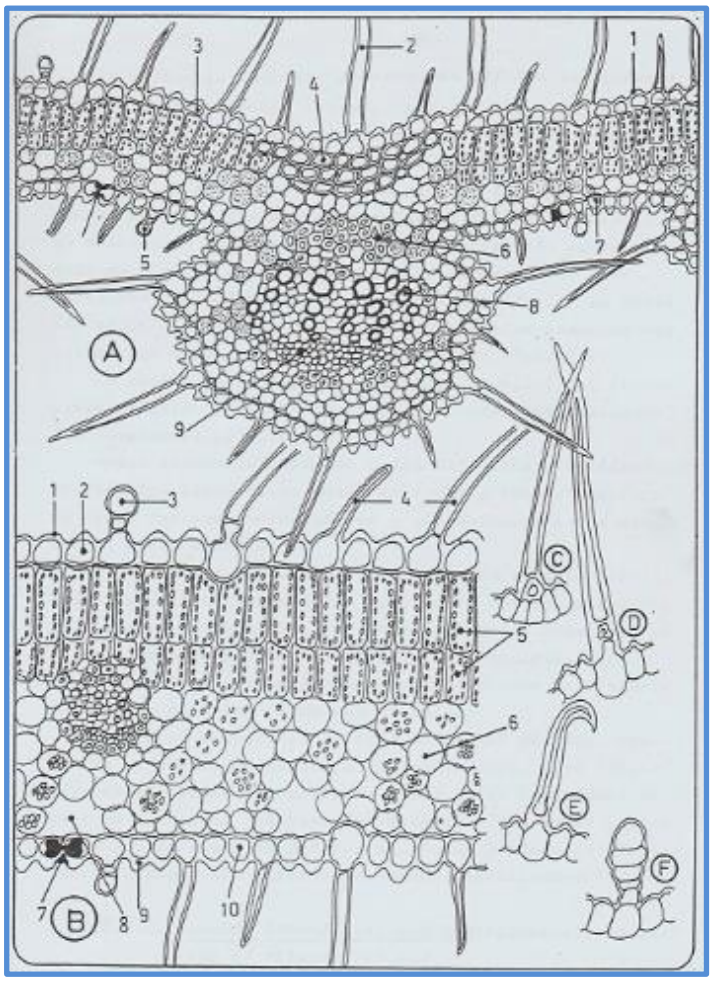


Figura 3. ***Desmodium vargasianum*** **Schubert, hoja sección transversal.** A1: cutícula; A2: tricoma unicelular; A3: epidermis; A4: colénquima; A5: pelo glanduloso; A6: parénquima; A7: epidermis inferior, A8: leño, A9: liber; B1: cutícula; B2: epidermis superior; B3: pelo glanduloso; B4: tricoma unicelular; B5: parénquima en empalizada; B6: parénquima lagunoso; B7: estomas; B8: cámaras subestomáticas; B9: cutícula; B10: epidermis inferior; C; D y F: Diferentes tipos morfológicos de pelos (Fuente: Pastor, 1987[16]).

En la medicina tradicional peruana se emplean las hojas en decocción *de D. vargasianum* como analgésico, diurético, afecciones hepáticas, depurador del riñón y mialgias, así como antiinflamatorio[14]. Una etnia de la provincia de Loja de Ecuador, lo usa para lavar heridas infectadas[15]. De otro lado, esta planta es de utilidad forrajera para el ganado [67]. Otras especies de *Desmodium* también son utilizadas en forma tradicional en nuestro país, por mencionar alguna de ellas, la planta entera de *D. styracifolium* es usada externamente sobre la herida[64], *D. molliculum* es usada para curar heridas, hemorragias, inflamación de los riñones y neumonía[64] y las hojas de *D. intortum* "hierba ángel" es usada como cicatrizante de heridas[74].

2.3.2. Fitoquímicos de la familia Fabácea con potencial antidiabético

Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos ampliante distribuidos en las plantas, consisten de anillos C6—C3—C6, es decir, anillos A y B unidos por un anillo C de tres átomos de carbono, con diferentes patrones de sustitución para producir una serie de subclases de compuestos[75]. La mayoría de los flavonoides están unidos a varios residuos de azúcar como glucosa, galactosa, rutinosa, ramnosa, xilosa, arabinopiranosa y arabinofuranosa, rara vez disponibles en formas de aglicona[76].

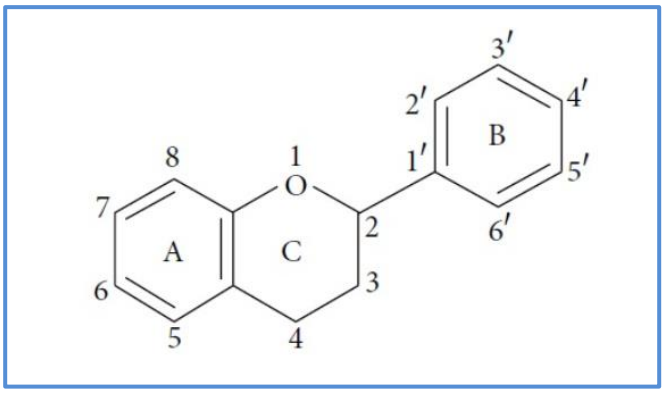


Figura 4. **Estructura básica de los flavonoides** (Fuente: Wang et al., 2018[75]).

Los flavonoides son biosintetizados a partir de derivados de los ácidos acético/fenilalanina mediante la vía del ácido shikímico[75]. Las flavonas y flavonoles contienen el mayor número de compuestos, representando en sentido estricto a los flavonoides, concretamente a la categoría 2-benzo-γ-pirona o 2-fenil- cromona[75]. Ver figura 4. Según el grado de oxidación y saturación en el anillo C heterocíclico, los flavonoides se dividen en varios grupos[77] que se representan en la figura 5.

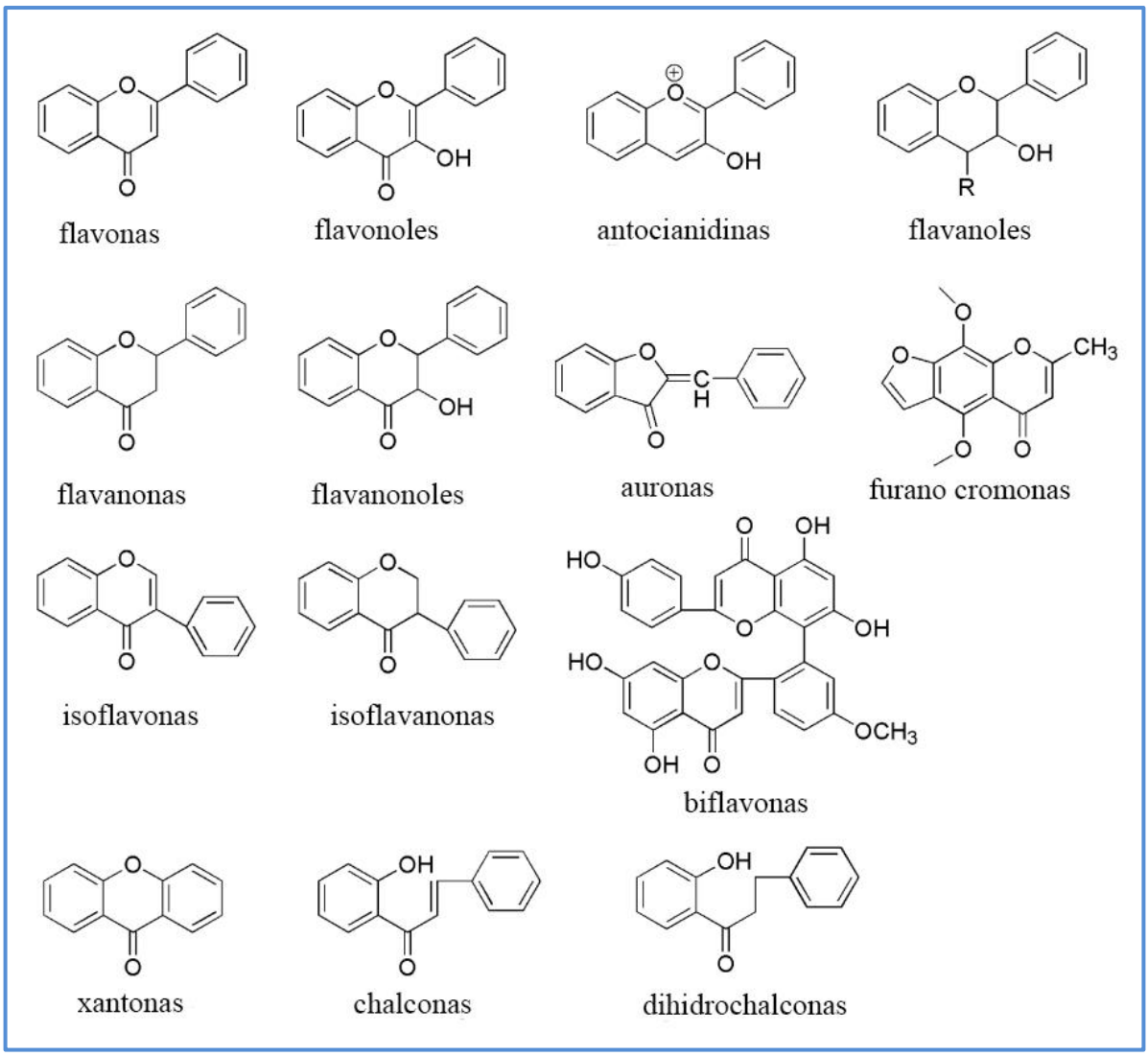


Figura 5. **Tipos de flavonoides: estructuras** (Fuente: Wang et al., 2018[75]).

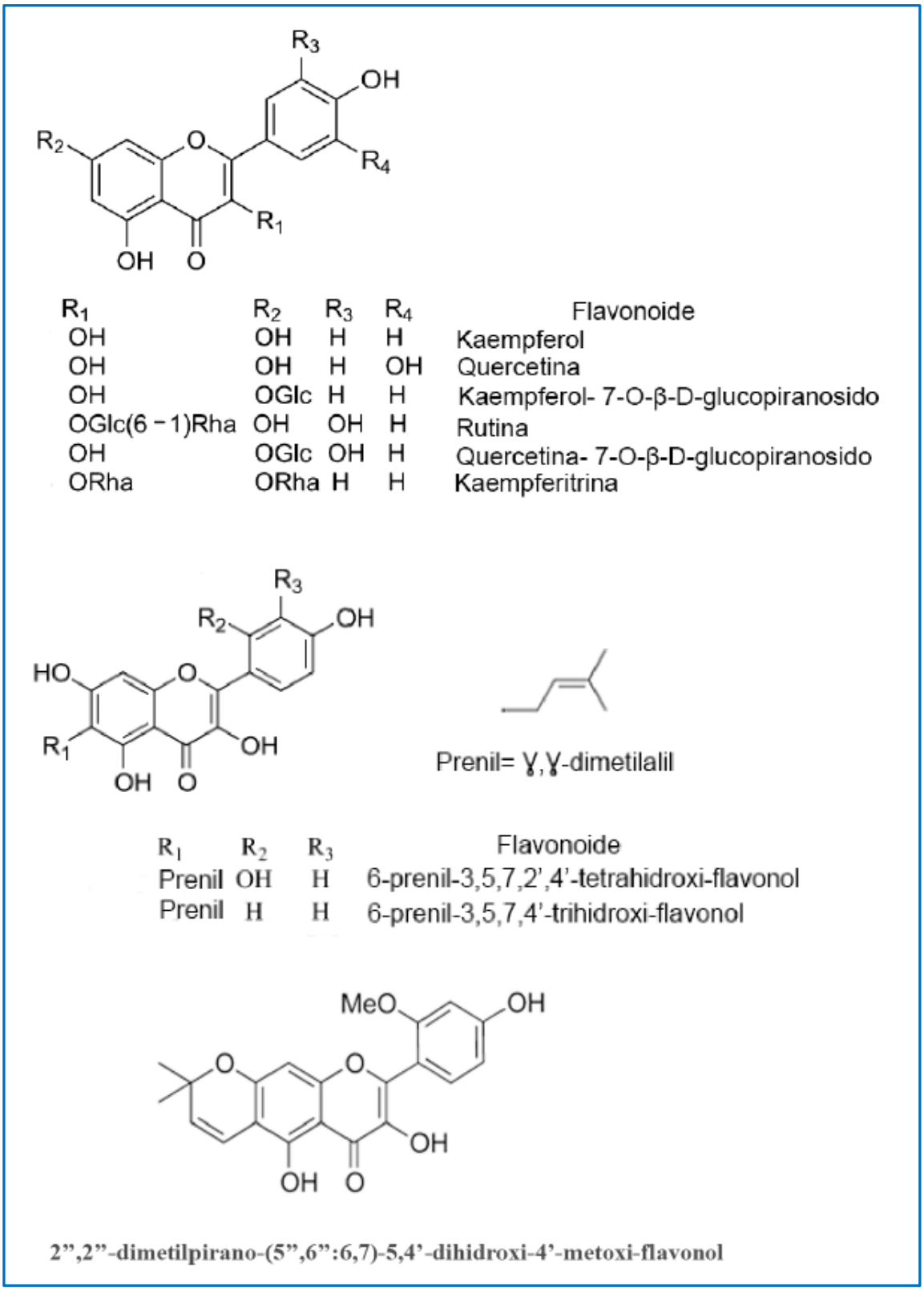
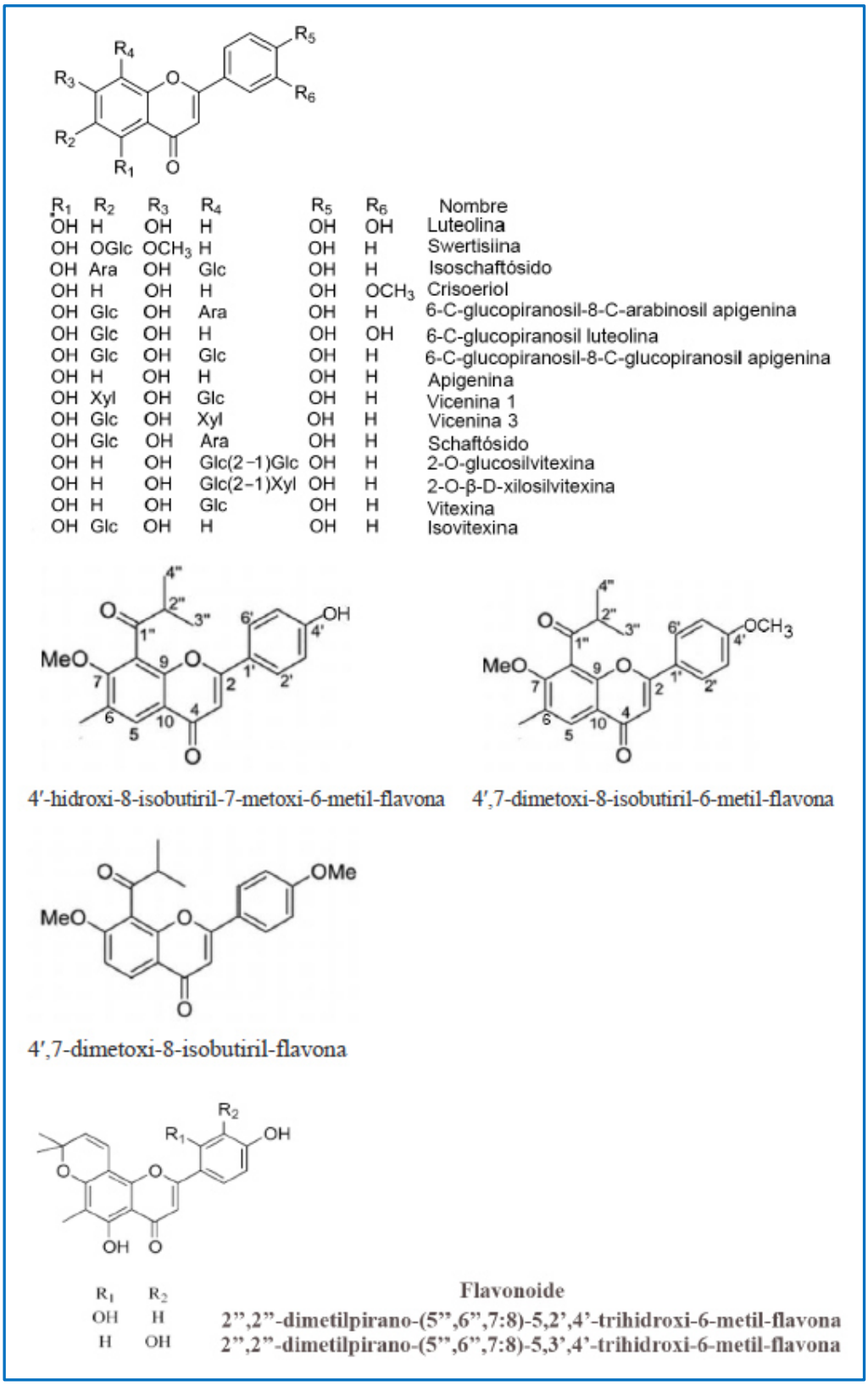


Figura 6. **Flavonoles del género *Desmodium*: estructuras representativas** (Fuente: Ma et al., 2011; Sasaki et al., 2014[78,79]).



R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	Nombre
OH	H	OH	H	OH	OH	Luteolina
OH	OGlc	OCH_3	H	OH	H	Swertisiina
OH	Ara	OH	Glc	OH	H	Isoschaftósido
OH	H	OH	H	OH	OCH_3	Crisoeriol
OH	Glc	OH	Ara	OH	H	6-C-glucopiranosil-8-C-arabinosil apigenina
OH	Glc	OH	H	OH	OH	6-C-glucopiranosil luteolina
OH	Glc	OH	Glc	OH	H	6-C-glucopiranosil-8-C-glucopiranosil apigenina
OH	H	OH	H	OH	H	Apigenina
OH	Xyl	OH	Glc	OH	H	Vicenina 1
OH	Glc	OH	Xyl	OH	H	Vicenina 3
OH	Glc	OH	Ara	OH	H	Schaftósido
OH	H	OH	Glc(2−1)Glc	OH	H	2-O-glucosilvitexina
OH	H	OH	Glc(2−1)Xyl	OH	H	2-O-β-D-xilosilvitexina
OH	H	OH	Glc	OH	H	Vitexina
OH	Glc	OH	H	OH	H	Isovitexina

4′-hidroxi-8-isobutiril-7-metoxi-6-metil-flavona

4′,7-dimetoxi-8-isobutiril-6-metil-flavona

4′,7-dimetoxi-8-isobutiril-flavona

R_1	R_2	Flavonoide
OH	H	2",2"-dimetilpirano-(5",6",7:8)-5,2',4'-trihidroxi-6-metil-flavona
H	OH	2",2"-dimetilpirano-(5",6",7:8)-5,3',4'-trihidroxi-6-metil-flavona

Figura 7. **Flavonas del género *Desmodium*: estructuras representativas**
(Fuente: adaptado de Li et al., 2017; Ma et al., 2011; Sasaki et al., 2014[25,78,79]).

Los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos de las plantas superiores[80]. Los taninos hidrolizables son ésteres de ácido fenólico (ácido gálico y ácido elágico) y polioles (generalmente glucosa)[81]. Los taninos hidrolizables se subclasifican ampliamente en galotaninos y elagitaninos. Las cadenas de éster de poligaloil que se encuentran en los galotaninos están formadas por enlaces depsídico meta o para, que involucran un grupo hidroxilo fenólico en lugar de un grupo hidroxilo alifático. De otro lado, los taninos condensados (proantocianidinas) son polímeros de flavan-3-ol (como catequina y epicatequina)[81]. Los taninos condensados son básicamente polímeros de flavanoles no hidrolizables que están muy entrelazados[82].

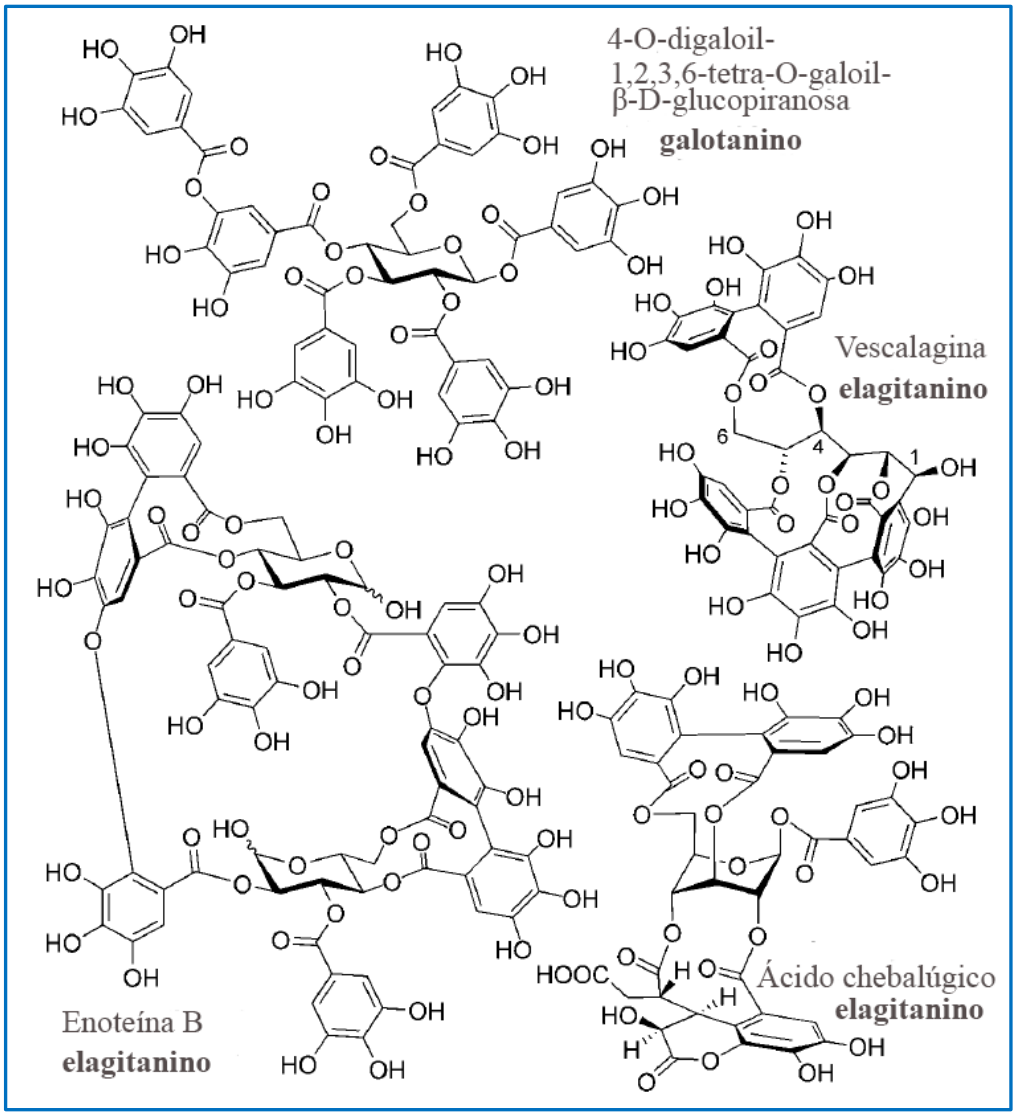


Figura 8. **Taninos hidrolizables: estructuras representativas** (Fuente: Quideau et al., 2011[83]).

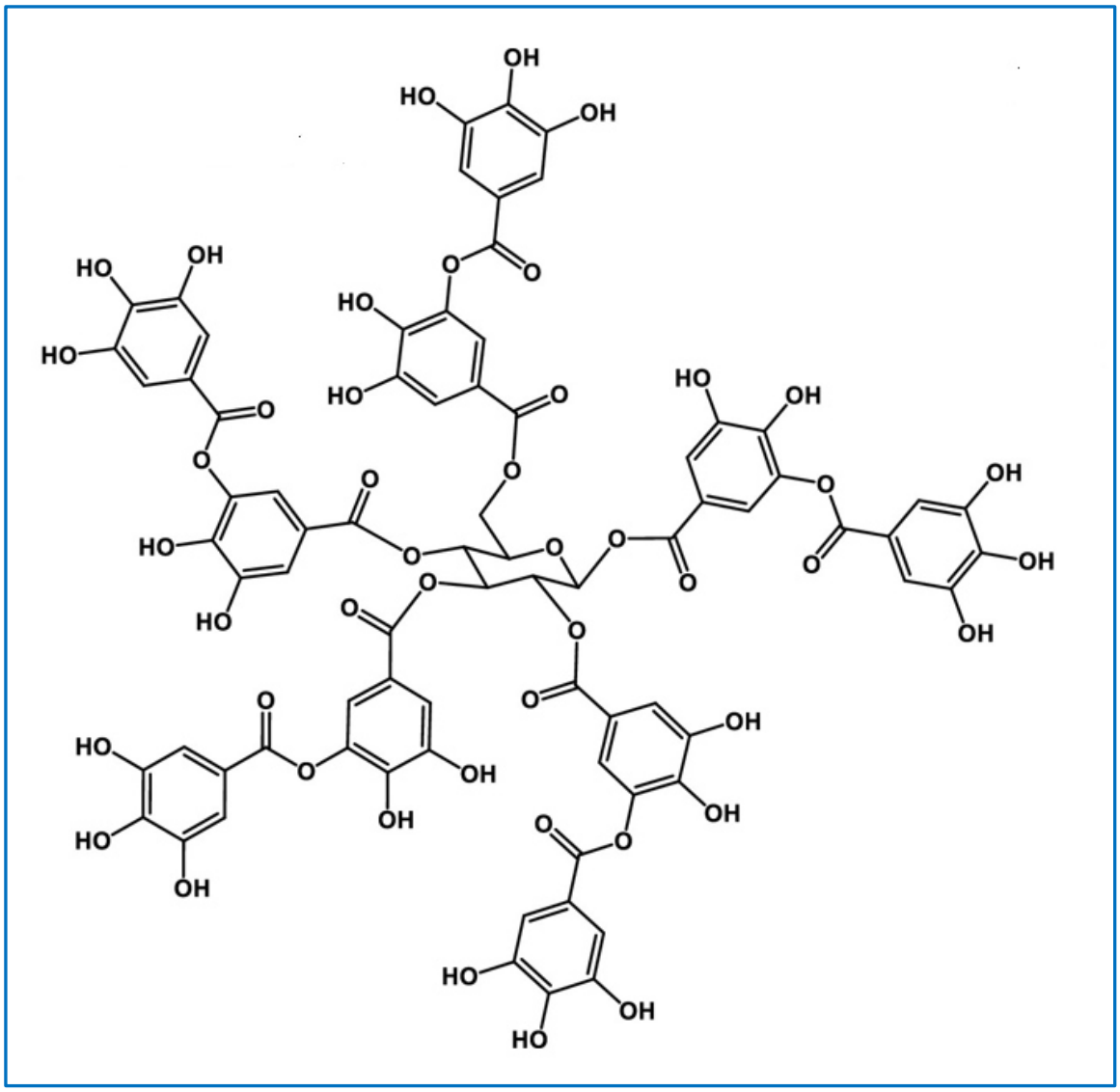


Figura 9. **Estructura del ácido tánico (1,2,3,4,6-pentadigaloil-β-D-glucosa)** (Fuente: adaptado de Haslam, 1992[84]).

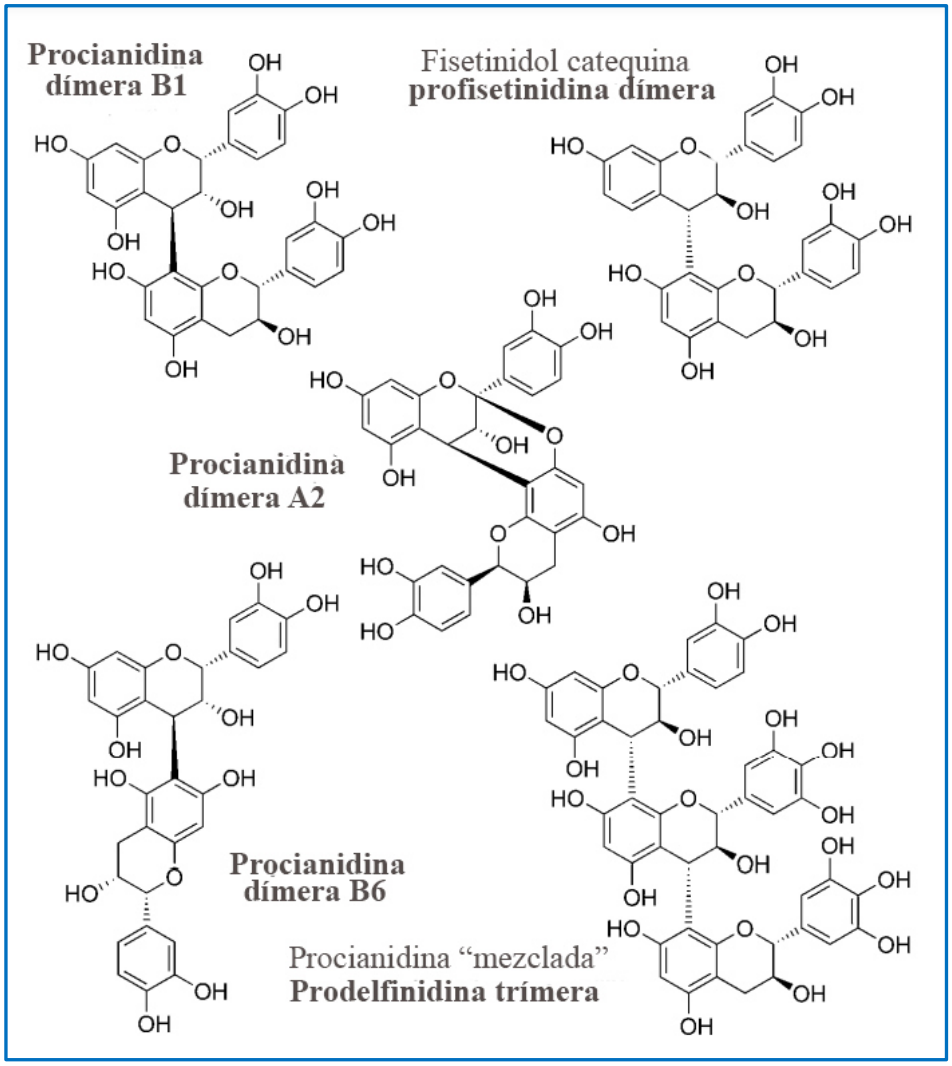


Figura 10. **Taninos condensados: estructuras representativas** (Fuente: Quideau et al, 2011[83]).

Los alcaloides son metabolitos secundarios presentes en plantas, animales, hongos y bacterias, presentan normalmente un nitrógeno básico por lo general heterocíclico; se encuentran aproximadamente en el 20 % de las plantas[85]. La lupanina es un alcaloide quinolizidínico, aislado de especies de Lupinus (Fabaceae)[86]. Wiedemann et al., 2015[87] mostraron que la lupanina actúa como un modulador positivo de la secreción de la insulina de las células beta pancreáticas y mejora la homeostasis de la glucosa al inhibir directamente los canales de potasio dependientes de ATP (adenosin trifosfato). La oximatrina es un alcaloide de la clase quinolizidina obtenido de la raíz de *Sophora flavescens* (Fabaceae) presenta efecto antihiperglicémico y disminuye el estrés oxidativo[88].

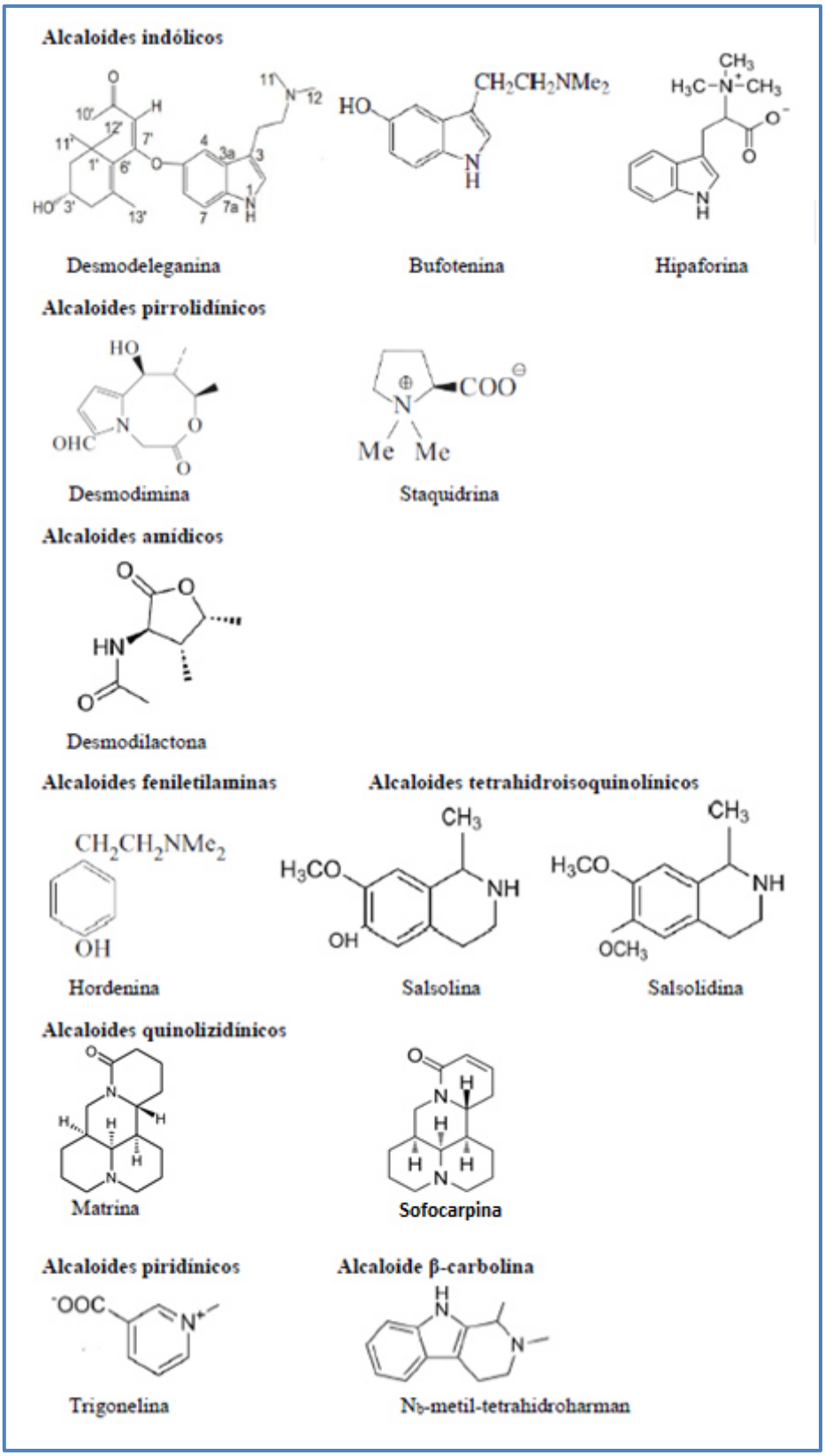


Figura 11. **Tipos de alcaloides según su estructura química: alcaloides representativos del género *Desmodium*** (Fuente: Ma et al, 2011; Buckingham & Munasinghe, 2015[78,89]).

Tabla 2. **Metabolitos secundarios de la familia Fabácea con efecto hipoglucemiante.**

METABOLITO SECUNDARIO	ESPECIE	MECANISMO DE ACCIÓN EN DIABETES MELLITUS
ALCALOIDES		
Trigonelina	*Trigonella foenum-graecum* (semilla)	Efecto hipoglucemiante, translocación de GLUT4[90]
Lupanina	*Lupinus sp*	Efecto hipoglucemiante[86]
Oximatrina	*Sophora flavescens*	Efecto hipoglucemiante, disminuye el estrés oxidativo[88]
FLAVONOIDES		
Apigenina	*Desmodium oblongum*[25] *Desmodium styracifolium*[59] *Desmodium velutinum*[58]	Activación parcial de la vía de señalización IRS/PI3K/Akt y expresión de GLUT4, promueve la síntesis de glucógeno y disminuye la producción de ROS y productos finales de glicación avanzada (AGE) e inhibe la expresión de NF-κB[91].
Isovitexina	*Desmodium uncinatum*[24]	Disminución de la apoptosis celular y el estrés oxidativo debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes[92]
Kaempferol	*Desmodium gangeticum*[30] *Desmodium oblongum*[25]	Kaempferol activa AMPK y PPARα; inhibe C/EBPα, SREBP1c y PPARγ[93].
Luteolina	*Desmodium oblongum*[25] *Desmodium styracifolium*[59]	Activación parcial de la vía de señalización IRS/PI3K/Akt, expresión de GLUT4 e inhibe la expresión de NF-κB[91].
Quercetina	*Desmodium adscendens*[29] *Desmodium oblongum*[25]	Mejora la translocación de GLUT4 a través de la activación de AMPK, bloquea al inhibidor de la tirosina quinasa, estimula la captación de glucosa por las células musculares, aumenta la captación de glucosa en el hígado, disminuye la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática, regula NF-κB, reduce la peroxidación lipídica[94].
Rutina	*Desmodium adscendens*[29] *Desmodium gangeticum*[30] *Desmodium triquetrum*[27] *Desmodium velutinum*[58]	Inhibe las enzimas G6Pasa, PEPCK, glucógeno fosforilasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa en el hígado y los riñones, disminuye el nivel de caspasa 3 y aumenta el nivel de Bcl-2 que muestra actividades antiapoptóticas, activa la translocación de GLUT4 y transporte de glucosa a las células musculares, mejora la sensibilidad a la insulina[94]. Inhibe la α-glucosidasa y la α-amilasa, y reducen la absorción de glucosa en el intestino delgado[95].
Vitexina	*Desmodium triflorum*[96]	Mejora la sensibilidad a la insulina, activa proteínas clave como la Nrf2[97].
Kaempferol-3,7-*O*-(α)-dirhamnosido (kampferitrina)	*Bauhinia forficate (hojas)*	Efecto hipoglucemiante, efecto antioxidante[98]

Tabla 2. **Metabolitos secundarios de la familia Fabácea con efecto hipoglucemiante** (continuación)

METABOLITO SECUNDARIO	ESPECIE	MECANISMO DE ACCIÓN EN DIABETES MELLITUS
Kaempferol 3-O-β-D-glucopiranosil(1→2)-O-[α-L-rhamnopiranosil (1→6)]-β-D-galactopiranósido, **Kaempferol** 3-O-β-D-glucopiranosil(1→2)-O-[α-L-rhamnopiranosil (1→6)]-β-D-glucopiranósido	*Gycine max (hojas)*	Disminución del nivel de Hb1Ac, en la prueba de tolerancia oral a la glucosa, del nivel de triglicéridos y de la actividad de la sintasa de ácidos grasos[99]
[1′′(*R*)-5,4′,1′-trihidroxi-6,7-(3′′,3′′- dimetilcromano) flavona, y, [(2*S*)-4′-*O*-metil-6-metil-8-prenil-naringenina	*Eysenhardtia platycarpa (hojas)*	Efecto hipoglucemiante[100].
Glabridin (flavonoide polifenolico)	*Glycyrrhiza glabra*	A nivel del hígado, riñones y páncreas: aumento significativo de la enzima superóxido dismutasa y disminución significativa de malondialdehido[101].
Isoflavonoides: Daidzeina, Genisteina, Formononetina[102]	*Genista tinctoria, Genistella sagittalis (partes aéreas), Glycine sp. (fruto)*[102]	Efecto hipoglucemiante, mejora la sensibilidad a la insulina[103,104].
7,4'-Dihidroxi-8-C-glicosil-isoflavona (puerarina)	*Pueraria lobata (raíz)*	Efecto hipoglucemiante, mejora la sensibilidad a la insulina, disminuye la inflamación, disminuye el estrés oxidativo e inhibe la formación de AGE[105].
[1″(*R*)-5,4′,1′-trihidroxi-6,7-(3″,3″- dimetilcromano) flavona, y, [(2*S*)-4′-*O*-metil-6-metil-8-prenil-naringenina	*Eysenhardtia platycarpa (hojas)*	Efecto hipoglucemiante[100].
TANINOS		
Ácido tánico	*Desmodium velutinum* [58]	Induce la fosforilación del receptor de insulina (IR) y Akt, así como la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) e inhibe la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1[106]. Inhibe la α-glucosidasa y α-amilasa[107].
2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico	*Caesalpinia ferrea*	Inhibe la aldosa reductasa[108].
OTROS POLIFENOLES		
Catequina	*Cassia fistula* (hojas)	Efecto hipoglucemiante[109].
Epicatequina	*Pterocarpus marsupium*	Estimula la secreción de la insulina[110]
Marsupsina, Pterosupina Pteroestilbeno	*Pterocarpus marsupium* (duramen)	Efecto hipoglucemiante[111]

Tabla 2. **Metabolitos secundarios de la familia Fabácea con efecto hipoglucemiante**

(continuación)

METABOLITO SECUNDARIO	ESPECIE	MECANISMO DE ACCIÓN EN DIABETES MELLITUS
Glicirrizina	*Glycyrrhiza glabra*	Eficaz contra la hiperglucemia, la hiperlipidemia y el estrés oxidativo asociado[112].
Bakuchiol	*Otholobium pubescens* *Psoralea corylifolia*	Efecto hipoglucemiante[113]. Efecto hipoglucemiante[114].
4-hydroxi-isoleucina	*Trigonella foenum-graecum (semillas)*	Estimula la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por vía PI3K / Akt. Mejora la sensibilidad a la insulina[90,115].
1-(4-metoxi-5-benzofuranil)-3-fenil-1,3-propanediona (Pongamol)	*Pongamia pinnata*	Estimula la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por vía PI3K / Akt[116].
8-hidroxi-6,7-dimetoxi cumarina (fraxidin)	*Teramus labialis* (partes aéreas)	Efecto hipoglucemiante[117].
Pinitol	*Bauhinia holophylla*	Efecto hipoglucemiante[118,119].

2.3.3. Fármacos antidiabéticos

Tabla 3. **Fármacos antidiabéticos**

Fármaco	Mecanismo de acción	RAMS[12,120,121,122,123]	Duración de la acción [12,121,123]
Sulfonilureas: Glicacida Glimepirida Glipizida Gliburida (Glibenclamida)	Aumentan la liberación de la insulina en el páncreas. Se unen al receptor de la sulfonilurea, que está asociado con el canal de potasio sensible a ATP, se despolariza la membrana, se abre el canal de calcio activado por voltaje y da como resultado la afluencia de calcio y la liberación de la insulina[12,121].	Hipoglucemia, aumento de peso.	 16-24 h 16-24 h 12-18 h 12-24 h
Meglitinidas o Glinidas: Repaglinida, Mitiglinida, Nateglinida	Estimulan la secreción pancreática al cerrar los canales de potasio dependientes de ATP en las células beta del páncreas. El mecanismo es similar al de las sulfonilureas, pero tienen una afinidad menor y disociación más rápida, de corta duración; menor riesgo de hipoglucemia sostenida, porque el canal KATP no permanece cerrado mucho tiempo después de la comida[12, 121.]	Hipoglucemia, trastornos visuales - Disturbios gastrointestinales - Otros: Dolor de espalda, cuadro pseudogripal, rinitis, bronquitis, dolor de espalda.	 5-8 h 5-8 h 2-4 h
Biguanidas: Metformina	Activa la proteína cinasa dependiente de adenosín monofosfato (AMPK). En el hígado, la activación de AMPK inhibe la gluconeogénesis, disminuye la síntesis de ácidos grasos y colesterol, y aumenta la oxidación de ácidos grasos. A nivel muscular, aumenta la captación de glucosa mediante la translocación de GLUT4. Mejora la sensibilidad a la insulina. A nivel intestinal, reduce la absorción intestinal de glucosa, aumenta la secreción de GLP-1(efecto incretínico indirecto)[12,121].	- Trastornos gastrointestinales: anorexia, náuseas, vómitos, indigestión, calambre o inflamación abdominal, diarrea. - El uso de la metformina también se ha asociado a una reducción de 20-30% en los niveles de vitamina B12 en sangre, y estos niveles deben ser monitoreados.	3-4 h
Tiazolidinedionas (Glitazonas): Pioglitazona	Son agonistas selectivos de PPARγ, aumentan la sensibilidad a la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo. Regulan la expresión génica de los lípidos uniéndose a PPARγ. Mejoran la captación de glucosa en músculo y reducen la producción hepática de glucosa de forma indirecta, al disminuir la resistencia a la insulina[12,121].	- Retención hidrosalina - Edema - Anemia - Aumento de peso - Edema macular - Fracturas óseas en mujeres	Hasta 24 h
Inhibidores de la α-glucosidasa: Acarbosa Miglitol	Inhiben la enzima α-glucosidasa del epitelio intestinal que hidroliza los oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos en glucosa y otros monosacáridos (fructosa, galactosa)[12,121].	Trastornos gastrointestinales: diarrea, flatulencia, meteorismo**,** dolor abdominal, náuseas y vómitos	4 h

Tabla 3. **Fármacos antidiabéticos** (continuación)

Fármaco	Mecanismo de acción	RAMS[12,120,121,122,123]	Duración de la acción[12,121,123]
Agonistas de los receptores de GLP-1(péptido similar al glucagón tipo 1: Albiglutida Dulaglutida Exenatida Lixisenatida Liraglutida	Son agonistas del receptor de GLP-1. Inhiben la degradación de GLP-1 vía DPP-4 y activan su receptor GLP-1R, lo que aumenta el monofosfato de adenosina ciclico (AMPc) y el calcio intracelular, provocando que el páncreas libere insulina dependiente de glucosa. Regulan los niveles de glucosa posprandial al enlentecer el vaciado gástrico, promover la saciedad y disminuir el aumento de glucagón posprandial en pacientes diabéticos[12,121].	Trastornos gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza, vómitos, anorexia, pérdida leve de peso, pancreatitis.	Semanal Semanal Semanal 24 h 24 h
Inhibidores de DPP-4 o gliptinas: Sitagliptina Vildagliptina Saxagliptina Linagliptina Alogliptina	Inhiben la enzima DPP-4 (cataboliza incretinas), con lo que se aumentan los niveles de incretinas, y con ello se aumenta la insulinemia y se reduce la glucemia tanto en ayunas como posprandial[12,121].	Rinitis, infecciones de las vías respiratorias superiores, dolores de cabeza, pancreatitis, reacciones alérgicas poco frecuentes.	12-16 h 12 h 24 h 24 h 24 h
Inhibidores de SGLT2: Dapaglifozina Canaglifozina Empaglifozina	Inhiben el trasportador de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT2) generando una pérdida urinaria de 50-100 gramos diarios de glucosa[12,121].	Vulvovaginitis, balanitis, infecciones genitales y del tracto urinario (leves y bien tolerados), poliuria, prurito, sed, diuresis osmótica, constipación.	~10-14 h
Insulinas y Análogos de insulina prandial Lispro, asparto y Glulisina **Insulina humana recombinante** Insulina NPH **Análogos de insulina basal:** Glargina Detemir Degludec **Insulina inhalada** Afrezza	Aumentan la utilización y eliminación de glucosa. Disminuyen la producción hepática de glucosa[12,121].	Dolor y tumefacción en el lugar de la inyección, anafilaxia, erupción, hipoglucemia (temblores, palpitaciones, sudoración), cetoacidosis diabética, coma.	3-4 h 10-16 h 12-24 h 12-20 h 24- 42 h 2-3 h

2.3.4. Bases bioquímicas de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de trastornos del metabolismo de los carbohidratos, en el que la glucosa se subutiliza como fuente de energía y se produce en exceso debido a la gluconeogénesis y glucogenólisis inadecuadas, lo que resulta en hiperglucemia[124]. La diabetes mellitus se clasifica en cuatro categorías generales: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) que es debida a la destrucción autoinmune de las células β, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que es debida a la pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β, identificada como resistencia a la insulina; diabetes mellitus gestacional diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo y tipos específicos de diabetes debido a otras causas[125].

2.3.4.1. Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) consiste en la destrucción autoinmune de las células β que conduce a una deficiencia absoluta de insulina, se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β por parte de células T CD4+ y CD8+ y macrófagos que se infiltran en los islotes; representa el 5-10% de los sujetos diabéticos [126,127,128]. Aunque DM1 se puede diagnosticar a cualquier edad, es una de las enfermedades crónicas más comunes en la infancia, con mayor incidencia entre los 5-7 años de edad y en la pubertad[129].

La DM1 se considera una enfermedad poligénica, la susceptibilidad genética reside en el antígeno leucocitario humano (HLA)[130]. Los individuos con los genotipos de riesgo HLA DR3 y HLA DR4 tienen más probabilidades de desarrollar la enfermedad[131]. Aunque DM1 se relaciona principalmente con la predisposición genética de un individuo, en realidad, se trata de una compleja interacción de factores genéticos, inmunitarios y ambientales que destruyen la función de las células β del páncreas[132]. Los autoantígenos de las células β, los macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos B y los linfocitos T están implicados en la patogénesis de la diabetes autoinmune[127]. La mayoría de los anticuerpos de las células de los islotes se dirigen contra el ácido glutámico decarboxilasa (GAD) dentro de las células β pancreáticas[133]. Junto con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las células presentadoras de antígenos (APC) migran a los ganglios linfáticos del páncreas. Los autoanticuerpos y las células T autorreactivas se activan en presencia de APC y se dirigen contra los autoantígenos de las células β[132]. Las citocinas proinflamatorias como IL-6 (interleucina-6), TNF-α (factor de

necrosis tumoral alfa), IFN-α (Interferón alfa), IL-17 (interleucina-17) e IL-21 (Interleucina-21) amplifican la inflamación a través de la proliferación y activación de células inmunes diabetogénicas, incluidas Th1, Th17, CD8+, Células T y células NK[134]. La inflamación de los islotes beta pancreáticos con infiltración leucocitaria (insulitis) activa las APC, que desencadenan la activación de las células T CD4+ (colaboradoras o helper), liberando citocinas que activan las células T CD8+ (citotóxicos), que conducen a la destrucción de las células β[135]. Las evidencias experimentales respaldan la noción de que los niveles altos de glucosa pueden modular el equilibrio de la familia de caspasas proapoptóticas y proteínas Bcl anti-apoptóticas hacia la apoptosis, lo que lleva a la muerte de las células β[135].

La apoptosis consta de una vía extrínseca (mediada por receptores) e intrínseca. La vía extrínseca incluye la vía Fas para la interacción de CD4+ (células T auxiliares) y CD8+ (células T citotóxicas), mientras que la vía intrínseca incluye la vía impulsada por mitocondrias en un equilibrio entre proteínas de la familia Bcl2 anti-apoptóticas (Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w) y proapoptóticas (Bad, Bid, Bik y Bak)[135]. El sistema perforina/granzima: perforina y granzima están contenidos en gránulos dentro de las células T CD8+. Perforina está involucrada en la formación de poros a través de las membranas a través de mecanismos Ca^{2+} dependientes[135]. El poro permite la entrada de granzima (serina proteasa) dentro de la célula, causando la escisión y activación de varios objetivos, como el efector caspasa-3 y la proteína Bcl-2 del tipo BH3 (proteína Bid)[135]. La vía de la apoptosis extrínseca se activa a través de la unión de un ligando a un receptor de muerte, que a su vez conduce, con la ayuda de las proteínas adaptadoras (FADD/TRADD), al reclutamiento, dimerización y activación de caspasa-8 [136]. En la vía intrínseca, el citocromo C liberado de las mitocondrias forma el apoptosoma en combinación con pro-caspasa-9, Apaf-1 (el factor activador de apoptosis) y ATP para activar la caspasa-9, que a su vez participa en la activación de las caspasas 3,6,7 [136]. La caspasa-8 puede participar en la activación de la vía intrínseca a través de la excisión del BID o en la activación de las caspasas-3, 6 y 7 ejecutadoras de la apoptosis[136].

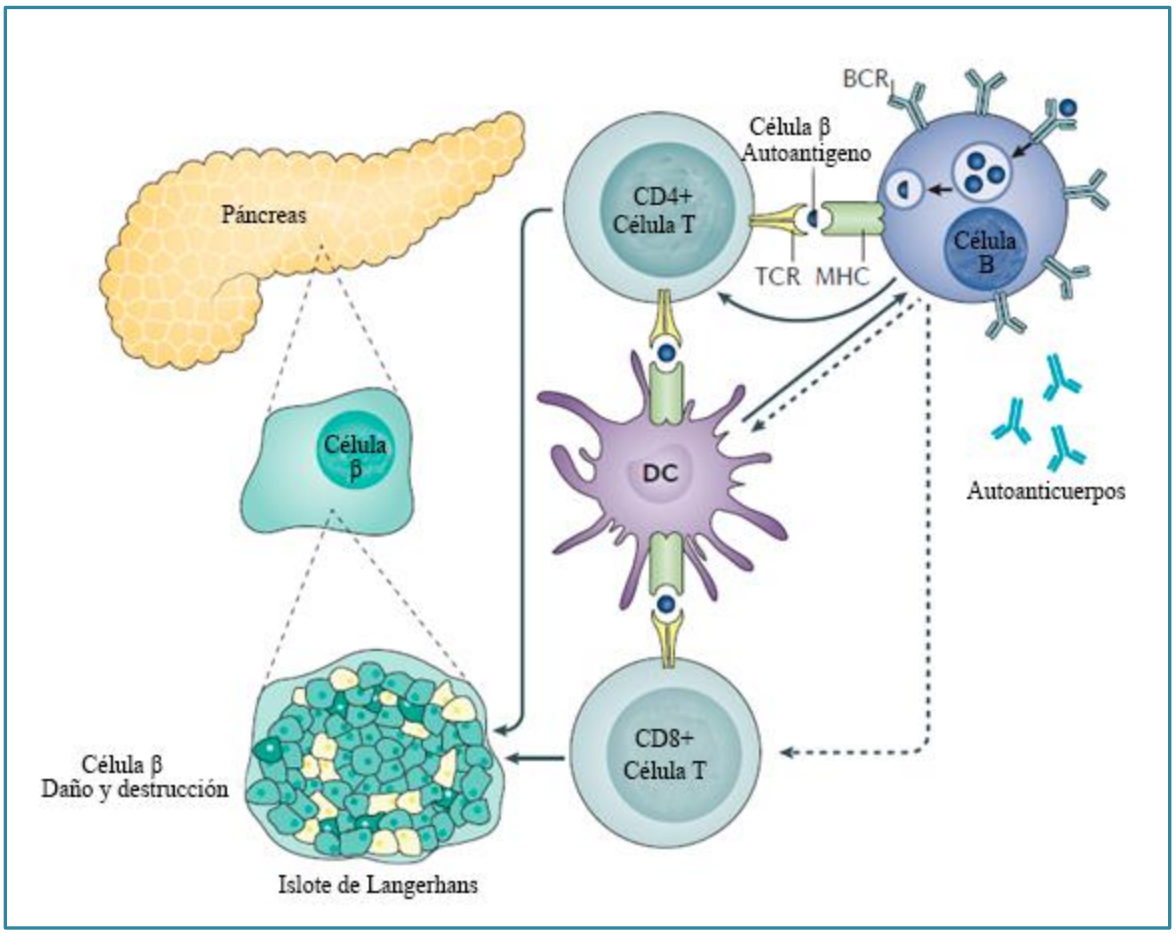


Figura 12. **Diabetes mellitus tipo 1: patogenia**. La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad autoinmune. Las células B activadas interactúan con las células T CD4+ y CD8+, así como también con las células dendríticas (DC). La presentación de antígenos por parte de las células B y las DC impulsa la activación de células T específicas de células β. Además, la exposición de las células B a los autoantígenos de las células β conduce a la producción de autoanticuerpos dirigidos a los islotes, que sirven como biomarcadores de enfermedad asintomática. Las flechas discontinuas indican las posibles interacciones entre las células B y células T CD8+ y entre células B y DCs. BCR, receptor de células B; TCR, receptor de células T (Fuente: adaptado de Katsarou et al., 2017[137]).

2.3.4.2. Diabetes mellitus tipo 2

Una característica central de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la resistencia a la insulina, condición en la que las células no responden de manera adecuada a la insulina[138]. Esta forma de diabetes está presente en el 90 a 95% de las personas con diabetes[138]. Durante un estado de resistencia a la insulina, ésta es ineficaz y, por lo tanto, en un principio, se dispara la producción de insulina a fin de reducir el aumento de los niveles de glucosa, pero, con el tiempo, puede desarrollarse un estado de producción relativamente inadecuada de insulina[139]. La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos y los pacientes que no son obesos por criterios de peso tradicionales pueden tener un aumento del porcentaje de grasa corporal que se distribuye predominantemente en la región abdominal[125]. La resistencia a la insulina en los tejidos metabólicos, como el adiposo, hepático y muscular constituye un rasgo característico de la disfunción metabólica inducida principalmente por la obesidad[140].

La resistencia a la insulina es la consecuencia de las alteraciones en la señalización de esta hormona, debido a mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de moléculas efectoras localizadas río abajo del mismo[141]. El receptor de insulina (IR) es una glicoproteína tetrámera compuesto por 2 subunidades α (extraplasmática) y 2 subunidades β (extraplasmática, transmembrana y citoplasmática) que en su región citoplasmática presenta el dominio tirosina cinasa con sus residuos de tirosina[142]. La unión asimétrica de la insulina a la subunidad α del receptor de insulina genera un cambio conformacional que se transmite al dominio tirosina quinasa que estimula su actividad catalítica, lo que induce a la fosforilación en residuos de tirosina, el reclutamiento de sustratos intracelulares y su posterior fosforilación[142,143]. La insulina después de interaccionar con su receptor, éste recluta y fosforila primordialmente dos proteínas adaptadoras: IRS, el principal mediador de las acciones metabólicas de la insulina y SHC, que media las acciones de proliferación y crecimiento celulares[144]. Estas proteínas adaptadoras funcionan organizando complejos moleculares que desencadenan cascadas de señalización intracelular[144]. La mayor parte de las acciones de la insulina se llevan a cabo mediante la activación de dos vías principales de señalización: la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) /Akt también llamada proteína cinasa B (PKB), responsable de la mayor parte de sus acciones metabólicas, y la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPK/Ras), que regula la expresión genética y los efectos mitógenos asociados a la insulina[145].

Entre las alteraciones más comunes de la resistencia a la insulina se encuentran la alteración del IR, el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel del IR y del IRS, el aumento de fosforilación de residuos de Tyr, la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4[146]. IRS-2 es una molécula clave de señalización que promueve el crecimiento y la supervivencia de las células b, cuya inhibición contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina en el hígado y otros tejidos sensibles a la insulina[147]. La hiperglucemia en sí misma disminuye la secreción de insulina y está implicado en el daño de las células β[148].

En los estados de resistencia a la insulina, se ha observado una elevación de IL-6 circulante de dos a tres veces. La IL-6 disminuye la fosforilación de tirosina del sustrato IRS1, y disminuye la asociación de la subunidad p85 de fosfatidilinositol 3-cinasa (PIK3) con IRS-1 en respuesta a los niveles fisiológicos de insulina. Además, la activación de Akt (serina-treonina cinasa) dependiente de la insulina, es notablemente inhibida por IL-6[149]. Estos eventos están mediados por aumentos en la expresión del supresor de la proteína de señalización de citocinas-3 (SOCS-3)[150].

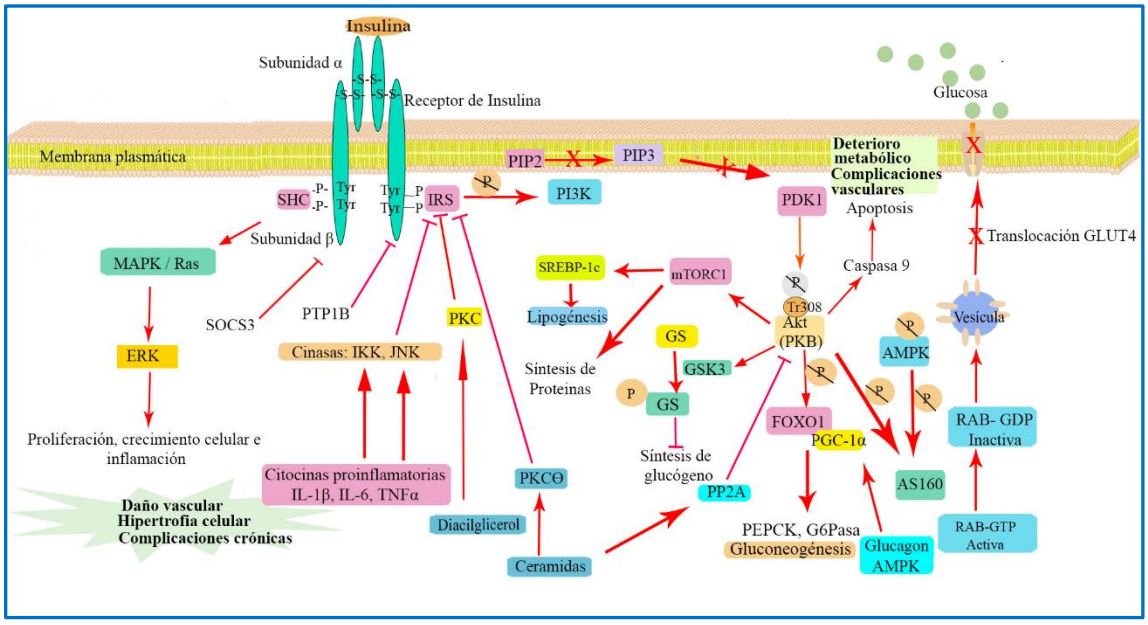


Figura 13. **Diabetes mellitus tipo 2: mecanismos de la resistencia a la insulina**. Elaboración propia.

La obesidad induce alteraciones funcionales en el tejido adiposo, hepático y muscular que conllevan a una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, lo que contribuye a la resistencia a la insulina; que hace que la obesidad sea un factor de riesgo importante para diabetes mellitus tipo 2[151]. En el estado de obesidad existe un incremento en la acumulación de lípidos, particularmente en el tejido adiposo, lo cual provoca el aumento en el número y tamaño de los adipocitos, la expansión del tejido adiposo y la alteración en la secreción de adipocinas y citocinas proinflamatorias, así como la liberación inusual de lo natural de ácidos grasos libres (AGL)[152,153]. Los AGL y las citocinas proinflamatorias actúan en los tejidos metabólicos, como en el tejido hepático y el muscular, modificando la respuesta inflamatoria, así como el metabolismo de los lípidos, contribuyendo, por tanto, al síndrome metabólico. También, se ha demostrado que la obesidad incrementa la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y que esto contribuye de manera sustancial a la producción y secreción de citocinas en respuesta a la obesidad[152,153].

En la obesidad hay un aumento de la secreción de citocinas como, TNF-α, IL-1β (Interleucina 1 beta) o IL-6, que inducen la resistencia a la insulina a través de múltiples mecanismos, como la activación de Ser / Thr cinasas, la disminución en la expresión de IRS-1, GLUT-4 y del receptor PPARγ (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas), la activación de SOCS-3 (proteínas supresoras de la señalización de citocinas) en adipocitos y la activación de los receptores TLR-1 y TLR-4 (Toll-Like receptors)[138]. TLR4 es el receptor de los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas bacterianas, juega un papel crítico en la inmunidad innata, su estimulación activa vías proinflamatorias e induce la expresión de citocinas en una variadas de tipos de células; las vías inflamatorias se activan en tejidos de animales y humanos obesos y juegan un papel importante en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad[154]. Los ácidos grasos de cadena larga no esterificada (FFA/NEFA) pueden aumentar la expresión de TLR-4 en el músculo esquelético y tejido adiposo con obesidad, que indica un papel potencial de este receptor en la inflamación asociada con obesidad o mejora de la sensibilidad a la insulina en personas con resistencia a la insulina[154,155]. Al igual que SOCS3 (supresor de la señalización de citosinas-3), el PTP-1B (fosfotirosina fosfatasa 1B) es otra proteína de señalización implicada en la regulación negativa de señalización de insulina; la resistina (implicada en procesos pro inflamatorios) es considerada

como hormona clave que vincula la resistencia a la insulina con la obesidad, especialmente a través de la activación de las vías de señalización de TLR-4 (Toll Like Receptor -4)[156].

Otro mecanismo involucra al retículo endoplasmático (RE), que es una organela celular compleja donde se realizan importantes funciones celulares, como captación y almacenamiento del calcio intracelular, desintoxicación celular, biosíntesis de lípidos y esteroides (RE liso) y la síntesis de proteínas y modificaciones postraduccionales en el ER rugoso[157]. En condiciones de estrés se acumulan proteínas mal plegadas en el RE y como respuesta a ello se da inicio a un mecanismo de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) que desencadena la activación de las tres cinasas sensoras de estrés (PERK, IRE1 y ATF6), generando el aumento en el nivel de chaperonas moleculares y enzimas de plegamiento que ayudan en el plegado de proteínas y evitan la formación de proteínas desplegadas o mal plegadas[158,159]. La activación de la cinasa PERK promueve la activación de NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), ocasionando su translocación hacia el núcleo, en donde promueve la expresión de una variedad de genes involucrados en vías inflamatorias como el TNFα, la IL1β y la IL6, que activan cinasas (JNK, IKKβ y PKC) que fosforilan en residuos de Ser del receptor o del IRS-1, lo que conlleva resistencia a la insulina[160]. A su vez, la cinasa IRE1, a través de su interacción con el factor 2 asociado al receptor del TNFα (TRAF2), lleva a la activación de cinasas (IKKβ y JNK) que fosforilan a IRS1 y que se ha asociado a una disminución en el estado de fosforilación en Tyr del IRS, lo que reduce su capacidad para interactuar con otras proteínas de señalización, alterándose principalmente las vías de PI3K/Akt y de MAP cinasas[141,161,162]. Bajo estrés del RE, las vías de señalización (PERK, IRE1 y ATF6) de UPR participan en la regulación positiva de la producción de citocinas inflamatorias a través de NF-kB (vía fosforilación de Akt), GSK-3β (por inhibición de PI3K/Akt) y MAPKs: JNK, p38, y ERK[163]. Además, se ha demostrado que las alteraciones en los niveles de expresión de ATPasa de la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático-endoplásmico (SERCA), que tienen como función de trasladar el calcio del citosol al lumen del RE, se asocian al desarrollo de estrés del RE y posteriormente a resistencia a la insulina[161,164].

Por otro lado, el papel principal de las mitocondrias, la respiración celular, se asocia a su vez con diversas funciones, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

y la desintoxicación; β-oxidación y procesamiento de acetil-CoA, generado a partir de ácidos grasos, glucosa y oxidación de aminoácidos a través del ciclo del ácido tricarboxílico; y actividades complejas de la cadena de transporte de electrones mitocondriales[165,166]. La disfunción mitocondrial se refiere a alteraciones en la ultraestructura y funcionamiento de mitocondrias, que pueden ocurrir debido a una alteración de los procesos sintéticos en la célula o la acción directa de los agentes dañinos en los orgánulos[167]. Entre las características cruciales de la disfunción mitocondrial se tiene: disminución del número de mitocondrias en los tejidos, profundas anomalías ultraestructurales de los orgánulos, alteración de la biogénesis mitocondrial, actividad reducida de complejos multienzimáticos mitocondriales, supresión de la síntesis de ATP, alteración de la homeostasis del calcio, producción excesiva de ROS y la apertura del poro MPT; todos estos procesos tienen lugar en el curso de la diabetes mellitus tipo 1 y 2. La disfunción mitocondrial puede desencadenar un daño irreversible en las estructuras celulares y causar la muerte celular por apoptosis[167].

La DM2 puede presentarse con reducciones adquiridas o heredadas de la capacidad de fosforilación oxidativa mitocondrial, fosforilación oxidativa submáxima estimulada por ADP (adenosin difosfato) y plasticidad de las mitocondrias y/o menor contenido mitocondrial en las células del músculo esquelético y potencialmente también en los hepatocitos[168]. La resistencia a la insulina surge por defectos en la oxidación del ácido graso mitocondrial, que a su vez conducen a aumentos en los metabolitos de ácidos grasos (acetil CoA y diacilglicerol) que interrumpen la señalización de la insulina[169]. La producción de superóxido mitocondrial, inducida por hiperglucemia, activa la proteína de desacoplamiento 2 (UCP2) que disminuye la relación ATP/ADP y, por tanto, se reduce la respuesta secretora de insulina[170]. Al estar activadas UCP2 dejan escapar protones a través de la membrana de la mitocondria y disminuyen así la síntesis de ATP y al disminuir ATP regula negativamente la secreción de insulina estimulada por la glucosa[171]. Varios estudios demuestran que la sobreproducción de superóxido, inducido por hiperglucemia, por la cadena de transporte de electrones mitocondrial parece ser el primer y clave evento en la activación de todas las demás vías implicadas en la patogenia de las complicaciones diabéticas[172]. El estrés oxidativo es un mediador clave en el desarrollo y la progresión de la diabetes y sus complicaciones debido a la mayor producción de radicales libres y defensas antioxidantes deterioradas[172]. Según Szendroedi, la reducción de la capacidad de fosforilación oxidativa podría acelerar su

progresión y la consiguiente disfunción orgánica a través del aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno[168].

La estimulación de la capacidad oxidativa, la biogénesis mitocondrial y la captación de lípidos mitocondriales se altera en el estado de resistencia a la insulina. Por lo tanto, la oxidación de lípidos de todo el cuerpo disminuye en humanos con obesidad y resistencia a la insulina como resultado de una plasticidad mitocondrial deteriorada[168]. En el estado de resistencia a la insulina, la disponibilidad de ácidos grasos libres (AGL) aumenta, lo que aumenta el almacenamiento de triglicéridos y las concentraciones intracelulares de metabolitos de lípidos tales como: diacilglicerol (DAG), ceramidas y acil de cadena larga-CoA (LCA-CoA). DAG y las ceramidas inducen el deterioro de la vía de señalización de la insulina a través de la activación de mensajeros inflamatorios. Asimismo, se debe tener presente que los AGL activan PPARγ y PPARδ[168]. Las cantidades de ceramida y TNFα presentan correlación positiva en personas obesas con resistencia a la insulina[173]. La ceramida se genera en respuesta a prácticamente a estímulos de estrés, incluidos los asociados con obesidad, como agonistas inflamatorios y ácidos grasos saturados[174]. La acumulación de ceramida en el músculo esquelético y el hígado es altamente dependiente de eventos inflamatorios controlados por TLR4[175]. Los AGL saturados (excepto los monoinsaturados) incrementan la cantidad de ceramida en el tejido muscular; la ceramida es imprescindible para acelerar la tasa de defosforilación de Akt/PKB por la proteína fosfatasa 2A (PP2A)[176]. La tasa de biosíntesis de ceramida depende de la disponibilidad de ácidos grasos saturados de cadena larga en el retículo endoplasmático (RE). La ceramida antagoniza la señalización de la insulina al inhibir la transmisión de señales a través de PI3K (fosfatidilinositol-3 cinasa) por activación de las citocinas proinflamatorias y la inactivación de la enzima anabólica Akt/PKB; generando disminución en la absorción de glucosa y deterioro en el almacenamiento del glucógeno[177]. En el músculo e hígado, el aumento de DAG da lugar a la activación de nuevas proteína cinasas C que desencadena a deficiencias posteriores en la señalización de insulina[178]. Además, la activación de la proteína cinasa C es responsable de varias patologías de complicaciones diabéticas[179].

2.3.5. La Cicatrización

La herida es una lesión o daño de la integridad de los tejidos blandos de piel causado por violencia, trauma o cirugía[180,181]; normalmente limitado a los causados por medios físicos con interrupción de la continuidad normal de las estructuras[182].

2.3.5.1 Fases de la cicatrización

El proceso de curación de la herida consiste en cuatro fases altamente integradas y superpuestas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación tisular[183].

- **Fase de Hemostasia**

El proceso de cicatrización de la herida se inicia con la hemostasia[184]. La mayoría de las heridas en la piel causan fugas de sangre de los vasos sanguíneos dañados[185]. Cuando la piel está lesionada, la respuesta inmediata es detener el sangrado mediante la vasoconstricción de las paredes de los vasos[186].

La prostaciclina y el tromboxano juegan un papel central en la regulación de la actividad vasomotora y plaquetaria después de la lesión[187]. La serotonina liberada por la plaqueta no sólo tiene efecto vasoconstrictor, sino que también interviene en la activación plaquetaria[188].

La hemostasia primaria implica agregación plaquetaria y formación del tapón plaquetario que se produce por la exposición de colágeno dentro de la matriz subendotelial[186]. La adhesión plaquetaria al colágeno depende de la interacción de varios receptores plaquetarios: glicoproteína (GPIb) en sinergia con las integrinas $\alpha_2\beta_1$ mediando la adhesión primaria, reforzado por la activación a través de glicoproteína VI (GPVI), que regula aún más la formación de trombos[189]. El factor von Willebrand (FvW) es una glucoproteína multimérica, producida por células endoteliales y megacariocitos, presente en la matriz subendotelial, plasma sanguíneo y plaquetas; media la adhesión y la agregación de plaquetas en sitios de la lesión vascular[190]. A diferencia del FvW, el colágeno fibrilar subendotelial es un sustrato altamente trombogénico ya que induce directamente la activación de las células y apoya su adhesión, agregación, y actividad coagulante por mecanismos directos e indirectos[191]. El colágeno y el FvW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del

trombo, en el que el FvW contribuye a la captura inicial de las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que se establezca una unión más estable con las plaquetas[191]. Esto desencadena el cambio de integrinas a un estado de alta afinidad y lanzamiento de ADP y tromboxano A2 (TXA2) y paralelamente el factor tisular (FT) o factor III desencadena localmente la formación de trombina que también contribuye a la activación de las plaquetas[191]. El ADP se libera desde los gránulos densos de las plaquetas, pero también por las células endoteliales y eritrocitos; contribuye también a la propagación de la activación de las plaquetas[188].

La hemostasia secundaria o coagulación, es un proceso dinámico y complejo en el que participan numerosas proteínas plasmáticas conocidas como factores y cofactores de la coagulación[192]. El proceso de coagulación es iniciado por la exposición del factor III y su interacción con el factor VII circulante[193]. El factor III forma un complejo con el factor VII generando un ciclo de autoactivación a factor VIIa (fisiológicamente su actividad es totalmente dependiente de la presencia del factor tisular (FT) o factor III, generándose el complejo FT-FVIIa que promueve la autoactivación del factor VII, la activación del factor X en factor Xa y del factor IX en factor IXa[193]. Los polifosfatos inorgánicas liberados por las plaquetas, actúan como elementos reguladores en la coagulación y activan el factor XII[194]. La activación del factor XII por polifosfatos no se asocia a una formación de trombina más rápida, pero sí incrementa la estabilidad del coágulo y afecta la estructura de la fibrina[193]. La activación del factor XII influye en la formación del coágulo, dado que acelera la formación del factor XIa[193]. La trombina en alta concentración provoca la transformación del fibrinógeno en monómeros de fibrina, la interacción de estos monómeros produce una estructura en red denominada fibrina polimerizada soluble que posteriormente es estabilizada por acción del factor XIIIa[193]. El coágulo formado sirve como escudo temporal de protección de tejidos lesionados y proporciona una matriz provisional a través de la cual las células pueden migrar durante el proceso de reparación[185].

- **Fase de inflamación**

La fase inflamatoria implica la activación del sistema inmune innato, neutrófilos y monocitos son las principales células que migran rápidamente en el sitio de la herida tras la lesión[195]. La inflamación ocurre dentro de las primeras 24 horas después de la lesión y puede

durar hasta 2 semanas en heridas normales y significativamente más largas en heridas crónicas[196]. La fase inflamatoria es una fase esencial en la curación de heridas, caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis de células de la circulación en el sitio de la herida, liberación local de citocinas y factores de crecimiento y activación de células migratorias[197]. La etapa inflamatoria está dirigida por células inflamatorias que liberan múltiples citocinas, incluida IL-1 (interleucina-1); las citocinas inducen la expresión de fibroblastos y células endoteliales que causan la expresión de macrófagos para la liberación de más citocinas[198].

Los neutrófilos fagocitan bacterias, alcanzan su número pico máximo dentro de las 24 a 48 horas en el sitio de la lesión, tienen una vida útil muy corta; después de 3 días sin infección su número se reduce rápidamente[199]. Los neutrófilos son atraídos al sitio de la lesión por un proceso llamado quimiotaxis y son atraídos por mediadores solubles (tales como, prostaglandinas, tromboxanos), C5a (componente activo del sistema de complemento), el tripéptido N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (productos de ciertas bacterias) y la citocina IL-8[200]. Los neutrófilos son leucocitos granulocitos que funcionan como células fagocíticas mediante la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) con participación del sistema NADPH oxidasa[201]. Los neutrófilos liberan citoquímio atrayentes para propagar aún más la respuesta inflamatoria celular[187].

Los macrófagos son células fagocíticas que se forman a partir de monocitos y llegan aproximadamente 2 a 3 días después de la lesión[199]. Los macrófagos tienen muchas funciones, incluida la defensa del huésped, la promoción y resolución de la inflamación, la eliminación de células apoptóticas y el apoyo de la proliferación celular y restauración de tejidos después de una lesión[202]. Los macrófagos se unen a proteínas específicas de la matriz extracelular (receptores de integrina); acción que estimula la fagocitosis de microorganismos [203]. La adherencia de los monocitos y macrófagos a la matriz extracelular estimula la transformación de los monocitos a macrófagos, dicha adherencia induce a la expresión del factor estimulante de colonias 1 (potente citocina inflamatoria) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que es un potente quimioatrayente y mitógeno para fibroblastos[204]. Los macrófagos influyen en las respuestas inmunes e inflamatorias, a lo largo de todo el proceso de la reparación de heridas, produciendo una variedad de sustancias tales como, factores de

crecimiento, prostaglandinas y factores de complemento[205]. Los macrófagos también liberan óxido nítrico (NO), que mata a los patógenos y a las proteasas, que descomponen la matriz dañada y necrótica[198]. A medida que la inflamación disminuye, se produce la reparación de las heridas[198].

- **Fase proliferativa**

La fase proliferativa comienza en el tercer día después de la herida y dura aproximadamente 2 semanas, se caracteriza por migración de fibroblastos y deposición de la matriz extracelular recién sintetizada[206]. En la etapa proliferativa, los queratinocitos, los fibroblastos, las células endoteliales y los macrófagos son importantes[207]. En la fase proliferativa se produce el reemplazo de la matriz provisional de fibrina con una nueva matriz de fibras de colágeno, proteoglicanos y fibronectina para restaurar la estructura y función del tejido[196]. Dos características claves de la fase de proliferación celular son la deposición de colágeno por fibroblastos y angiogénesis por células endoteliales[208]. Los pasos principales de la fase de proliferación son: la epitelización, angiogénesis, formación de tejido de granulación y la deposición de colágeno[184].

La epitelización se produce al principio de la reparación de la herida. Si la membrana basal permanece intacta las células epiteliales migran hacia arriba en el patrón normal. Las células progenitoras epiteliales permanecen intactas debajo de la herida (en los apéndices de la piel), y las capas normales de la epidermis se restauran en 2 a 3 días[184]. Si la membrana basal ha sido destruida las células epiteliales situadas en el borde de la piel comienzan a proliferar y a enviar proyecciones para restablecer una barrera protectora contra las pérdidas de líquidos y la invasión microbiana[184]. El prerrequisito para una epitelización eficaz es una matriz extracelular (MEC) adecuada que facilita la migración de queratinocitos[207]. El estímulo para la proliferación epitelial y quimiotaxis es el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-α) producido por las plaquetas y los macrófagos activados[209].

La angiogénesis, estimulada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) está marcada por la migración celular endotelial y la formación capilar[184]. Inmediatamente después de la lesión, la angiogénesis se inicia por múltiples señales moleculares, incluyendo factores

hemostáticos, inflamación, factores de crecimiento de citocinas e interacciones de las células endoteliales con la matriz extracelular[210]. La formación de nuevos vasos sanguíneos requiere de la hiperpermeabilidad vascular, descomposición proteolítica de la membrana basal y migración de células endoteliales a través de la matriz extracelular bajo la influencia de metaloproteinasas de la matriz e integrinas $a_v b_3$[211]. En la cicatrización de heridas, la angiogénesis sirve para restaurar la perfusión vascular a los tejidos dañados y para facilitar la entrada de leucocitos inflamatorios como neutrófilos y macrófagos, que son parte integral del proceso de curación[212]. Los macrófagos proporcionan una fuente continua de factores de crecimiento, especialmente PDGF, TGF-β1(factor de crecimiento transformante beta-1) y VEFG (factor de crecimiento endotelial vascular), necesarios para estimular la angiogénesis[204]. PDGF y VEGF se sinergizan en su capacidad de vascularizar tejidos[213]. La matriz extracelular es fundamental para el crecimiento de los vasos sanguíneos y mantenimiento actuando como soporte de andamiaje, a través del cual las células endoteliales pueden migrar, como reservorio y modulador de factores de crecimiento[210]. El tejido de granulación está constituido por macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos y un matriz suelta de colágeno tipo I, glucoproteína, fibronectina y ácido hialurónico[207].

La parte final de la fase proliferativa es la formación del tejido de granulación. El tejido de granulación consiste en una densa red de vasos sanguíneos y capilares, densidad celular elevada de fibroblastos y macrófagos y fibras de colágeno organizadas al azar[214]. La formación de tejido de granulación se ve reforzada por las actividades de los macrófagos, fibroblastos y por neovascularización[215]. La formación de la matriz extracelular (MEC) probablemente comienza con la degranulación de las plaquetas, ya que el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) es un conocido promotor de la formación de proteoglicanos y colágeno[216]. Los factores de crecimiento secretados por macrófagos estimulan la migración de fibroblastos al lugar de la herida desde el tejido circundante y en respuesta al PDGF sintetizan colágeno[215,216,217]. Además, los fibroblastos de la herida adquieren un fenotipo contráctil y se transforman en miofibroblastos, un tipo celular que juega un papel importante en la contracción de la herida[218].

- **Fase de maduración y remodelación**

La maduración del colágeno es el último y más largo evento de cicatrización de las heridas, que comienza en la primera semana después de la lesión y continua de 12 a 18 meses. Durante este período de tiempo, la matriz de colágeno sufre continuamente reabsorción y deposición para remodelar y fortalecer la herida[219]. La característica principal de la fase de maduración es la deposición de colágeno en la herida. Desde un punto de vista clínico, esta es la fase más importante de curación porque la tasa, la calidad y la cantidad total de deposición de matriz determina la fuerza de la cicatriz[197]. La remodelación de la matriz extracelular de la herida también es un proceso bien regulado; primero los fibroblastos reemplazan la provisional matriz de fibrina con monómeros de colágeno[220]. Un tejido intacto está compuesto de 80% a 90% de colágeno tipo I, en contraste, un tejido con herida temprana consiste de 70% de colágeno tipo III que contribuye a una matriz de colágeno más débil. Además, las fibrillas de colágeno dentro de la matriz son más fuertemente glicosiladas y más delgadas y están alineadas sin entrelazarse[219]. La reorganización de la nueva matriz es una importante característica de curación, los fibroblastos y leucocitos secretan colagenasas que aseguran el componente lítico[220].

Una característica importante de la cicatrización de heridas se refiere a la diferencia entre una herida clínicamente "curada" con una superficie epitelial regenerada y el restablecimiento de la resistencia mecánica del tejido reparado[217]. La resistencia a la tracción de la herida es alrededor del 10% de su valor normal a las 2 semanas, aproximadamente del 25% a las 3 a 4 semanas y del 70 al 80% de su fuerza es restaurado después de varios meses [217, 221]. Al final de un año, la resistencia a la tracción del tejido cicatricial es aproximadamente del 80% en comparación con la piel normal. Con el tiempo, la mayor resistencia es el resultado de una mayor reticulación y remodelación[221]. La formación continua de colágeno y la deposición de nuevo colágeno permiten un mayor refinamiento y un entrecruzamiento (cross-linking) más efectivo en áreas previamente más débiles[221]. Las fibras de colágeno se entrelazan por la enzima lisil oxidasa, que es secretada por los fibroblastos en la matriz extracelular[214]. El aumento de colágeno tipo I y otros aspectos del proceso de remodelación son responsables de la contracción de la herida y formación de cicatrices[217]. La remodelación del tejido cicatricial

es estimulada por los macrófagos y da como resultado la reorganización de las fibras de colágeno para maximizar la resistencia a la tracción[222].

El TGF-β (factor de crecimiento transformante beta) dirige la construcción de la matriz de colágeno. Los niveles de TGF-β alcanzan su punto máximo a los 7 a 14 días en una herida incisional. La matriz se vuelve más gruesa y más fuerte con el colágeno tipo I que reemplaza al proteoglicano y la fibronectina. El TGF-β también aumenta la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) que disminuyen la producción de metaloproteinasas (MMP) y aumentan la expresión de proteínas de adhesión a tejidos. La producción de TIMP es también regulada por IL-6. La TNF-α estimula la liberación de IL-6 en los fibroblastos, mejorando aún más la producción de TIMP. Para aumentar más la contractilidad, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos bajo la influencia de TGF-β[184].

En esta fase, las células fibroblásticas experimentan diferenciación a miofibroblastos. La actina aparece a los 6 días después de la herida, persiste a niveles altos durante 15 días y va desapareciendo a las 4 semanas, cuando los miofibroblastos sufren apoptosis[223]. Los fibroblastos estimulados desarrollan capacidad contráctil relacionada con la formación de complejos citoplasmáticos de actina-miosina. Cuando los miofibroblastos se colocan en el colágeno poblado de fibroblastos enrejados, la contracción ocurre aún más rápidamente[223].

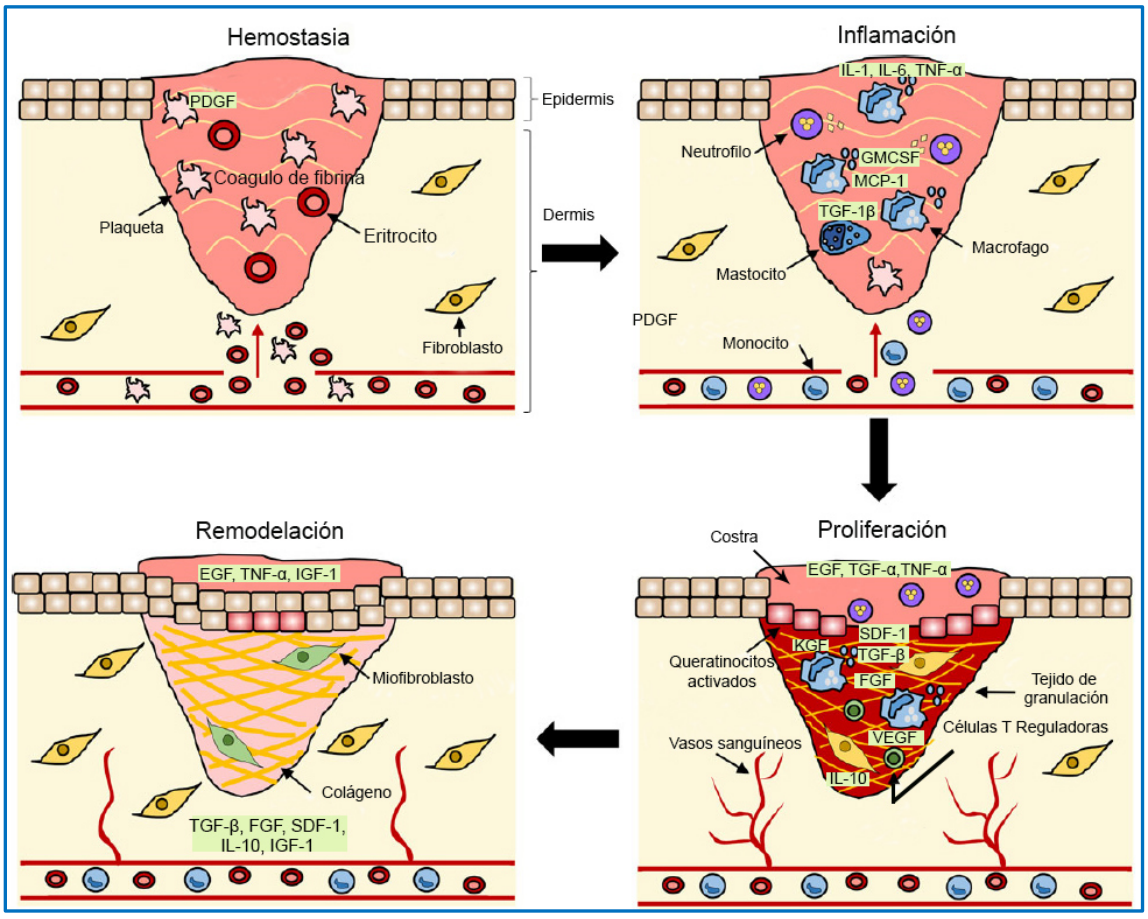


Figura 14. **Cicatrización: fases.** EGF (factor de crecimiento epidérmico), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), IGF-1 (factor 1 de crecimiento epidérmico), IL-1 (interleucina-1), IL-6 (interleucina-6), IL-10 (interleucina-10), KGF (factor de crecimiento de los queratinocitos), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales), TGF-β (factor de crecimiento transformante beta), TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) (Fuente: adaptado de Wilkinson & Hardman, 2020; Nethi et al., 2019[224,225]).

2.3.5.2. Heridas crónicas en diabetes mellitus

En diabetes mellitus, varias fases de la cicatrización pueden verse afectadas en cierta medida, lo que provoca un retraso en la cicatrización o un deterioro en el proceso de la cicatrización de la herida[226]; hay un retraso en la infiltración de leucocitos y la formación de tejido de granulación, problemas en la cantidad y organización del colágeno, disminución de la resistencia a la tensión y tiempo de epitelización prolongado, junto con aumento de complicaciones infecciosas[226,227]; la presencia de hiperglucemia conlleva a una inflamación prolongada y es el principal responsable de la alteración de la angiogénesis y cierre tardío de la herida en la piel[228].

En las heridas crónicas, la fase de inflamación no se resuelve, hay una gran cantidad de neutrófilos, macrófagos y liberación crónica de citocinas proinflamatorias[229]. Los neutrófilos migran al sitio de la herida con la ayuda de moléculas de adhesión celular (CAM); de lo contrario se retrasaría la respuesta inflamatoria de la cicatrización. Los macrófagos son las segundas células inflamatorias clave necesarias para la fagocitosis y la liberación de citocinas y factores de crecimiento[230]. La inflamación tiende a volverse crónica e incompetente y se caracteriza por la activación de macrófagos (así como la acumulación de neutrófilos) que resulta en niveles elevados de citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno, metaloproteinasas de matriz (MMP), y otras proteinasas neutras, tal como elastasa[231].

La DM1 y la DM2 se caracterizan por una liberación no secuencial de citocinas pro y antiinflamatorias, lo que ocasiona un desequilibrio que conduce a un deterioro de la reparación de heridas y a un debilitamiento de los mecanismos de defensa inmunitaria, celular y humoral[232]. La deficiencia de factores de crecimiento esenciales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) pueden disminuir la formación de tejido de granulación y mantener la cronicidad de la herida[232].

Los fibroblastos en las heridas crónicas no son receptivos a las citocinas ni a los factores de crecimiento; como resultado, su actividad se ve afectada y queda una matriz extracelular distorsionada[230]. En este contexto, los fibroblastos liberan TIMP en exceso, que regulan los efectos de las MMP, destruyen la ECM antigua y además las proteínas estructurales recientes[230].

La hiperglucemia se correlaciona con la disminución del flujo de los vasos sanguíneos y una menor oxigenación tisular, lo que dificulta la cicatrización[233]; puede inhibir la producción de óxido nítrico y crear un entorno más susceptible a las especies reactivas del oxígeno, como el superóxido y el peróxido de hidrógeno que favorece la formación de peroxinitrito y la inhibición de la acción del óxido nítrico en el endotelio vascular[230]. Esto puede interrumpir la función vasodilatadora en el endotelio y conducir a una cascada de agregación plaquetaria, inflamación, formación de trombosis y aterosclerosis de los pequeños vasos vecinos a los nervios periféricos, lo que eventualmente conduce a una neuropatía periférica[230]. Además, la neuropatía puede provocar el entumecimiento de la zona y reducir la capacidad de sentir dolor, contribuyendo en gran medida a la cronicidad de las heridas; el control de la glucemia puede prevenir complicaciones en la cicatrización[233].

La prostaglandina E2 (PGE-2) es una hormona que se produce en los vasos sanguíneos y promueve la vasodilatación (necesario para prevenir la hipoxia) y la angiogénesis mediante la inducción de VEGF; las personas con úlcera del pie diabético sufren de enfermedad vascular y enfermedad arterial periférica debido a los niveles más bajos de PGE-2[230].

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo, método y diseño de la investigación

3.1.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación es analítico y experimental.

3.1.2. Método y diseño de investigación

El método es cualitativo y cuantitativo.

El diseño de investigación es prospectivo y longitudinal.

3.2. Material de laboratorio, reactivos y equipos

- Cromatoplacas de aluminio de silica gel GF_{254} de 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor
- Cuba de desarrollo cromatográfico
- Pipetas de 1 mL y 5 mL
- Probetas de 10 mL y 100 mL
- Frascos de 5 L de color ámbar
- Frascos viales
- Embudos de vidrio
- Alcohol 70 % Q.P. Merck
- Beacker de 5 mL, 50 mL y 250 mL
- Papel filtro
- Jaulas metálicas para las ratas albinas
- Alimento para ratones y ratas
- Glucómetro digital Accu-Chek Active
- Tiras reactivas OneTouch® Ultra
- Dinamómetro (equipo de tensión con arena)
- Sonda intragástrica
- Bisturí
- Jeringas con agujas
- Tubos de ensayo
- Alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich)
- Resina Diaion® HP-20 (Mitsubishi Chemical)

- H_2O desionizada
- Planchas de tecnopor
- Recipientes de plástico con tapa
- Solventes Q.P. Merck para la cromatografía
- Reveladores cromatográficos
- Reactivos químicos Q.P. Merck para el screening fitoquímico
- Molino de cuchillas. Marca Willey Will St. Modelo N° 3
- Rotavapor. Marca Buchi, Modelo R-205
- Estufa con aire circulante. Marca Memmert, Modelo UF 75 PLUS
- Baño maría. Marca Memmert, Modelo WNE-10. Rango de temperatura: 0 –100 °C
- Refrigeradora. Marca MABE
- Balanza analítica. Marca Mettler Toledo, Modelo AB-204, escala 0.01 mg – 100 g
- Balanza analítica. Marca OHAUS, Modelo Pioner TM, escala 0.1 mg – 220 g
- Espectrofotómetro ultravioleta UV-Vis. Marca Genesys, Modelo 10S
- Lámpara UV 254 nm y 365 nm
- Microscopio de doble cabezal. Marca LEICA, Modelo DME

3.3. Muestra de animales de experimentación

3.3.1. Unidad de análisis

Ratas *Rattus norvegicus* cepa Sprague Dawley

3.3.2. Población y muestra animal

Población: Ratas *Rattus norvegicus* cepa Sprague Dawley del bioterio de la Universidad Particular Cayetano Heredia.

Muestra: 48 ratas *Rattus norvegicus* cepa Sprague Dawley

3.3.3. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión: Ratas *Rattus norvegicus* sanos cepa Sprague Dawley de 3 meses de edad y 240 ± 20 g de peso.

Criterios de exclusión

-Ratas de otras cepas, enfermas, hembras grávidas, con peso y edad fuera del rango establecido.

3.4. Muestra vegetal

3.4.1. Unidad de análisis

Hojas de *D. vargasianum* Schubert

3.4.2. Población y muestra vegetal

Población:

La planta *D. vargasianum* Schubert, del distrito de Callahuanca de la provincia de Huarochirí del departamento de Lima.

Muestra Vegetal:

6 kg de partes aéreas de *D. vargasianum* Schubert

3.4.3. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

Hojas verdes en buen estado de conservación sin la presencia de contaminantes como polvo, hongos, etc.

Criterios de exclusión:

Hojas en mal estado, deterioradas y con presencia de contaminantes.

3.5. Procesamiento de la muestra vegetal

3.5.1. Recolección y clasificación taxonómica de la especie

La especie vegetal *D. vargasianum* Schubert "pie de perro" fue recolectada en el distrito de Callahuanca de la provincia de Huarochirí del departamento de Lima a 1765 m de altitud, durante la etapa de floración. La clasificación taxonómica de la planta fue realizada en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el Blgo. Severo Baldeón Malpartida (anexo 1).

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Rosidae

ORDEN: Fabales

FAMILIA: Fabaceae

GÉNERO: *Desmodium*

ESPECIE: *Desmodium vargasianum* Schubert

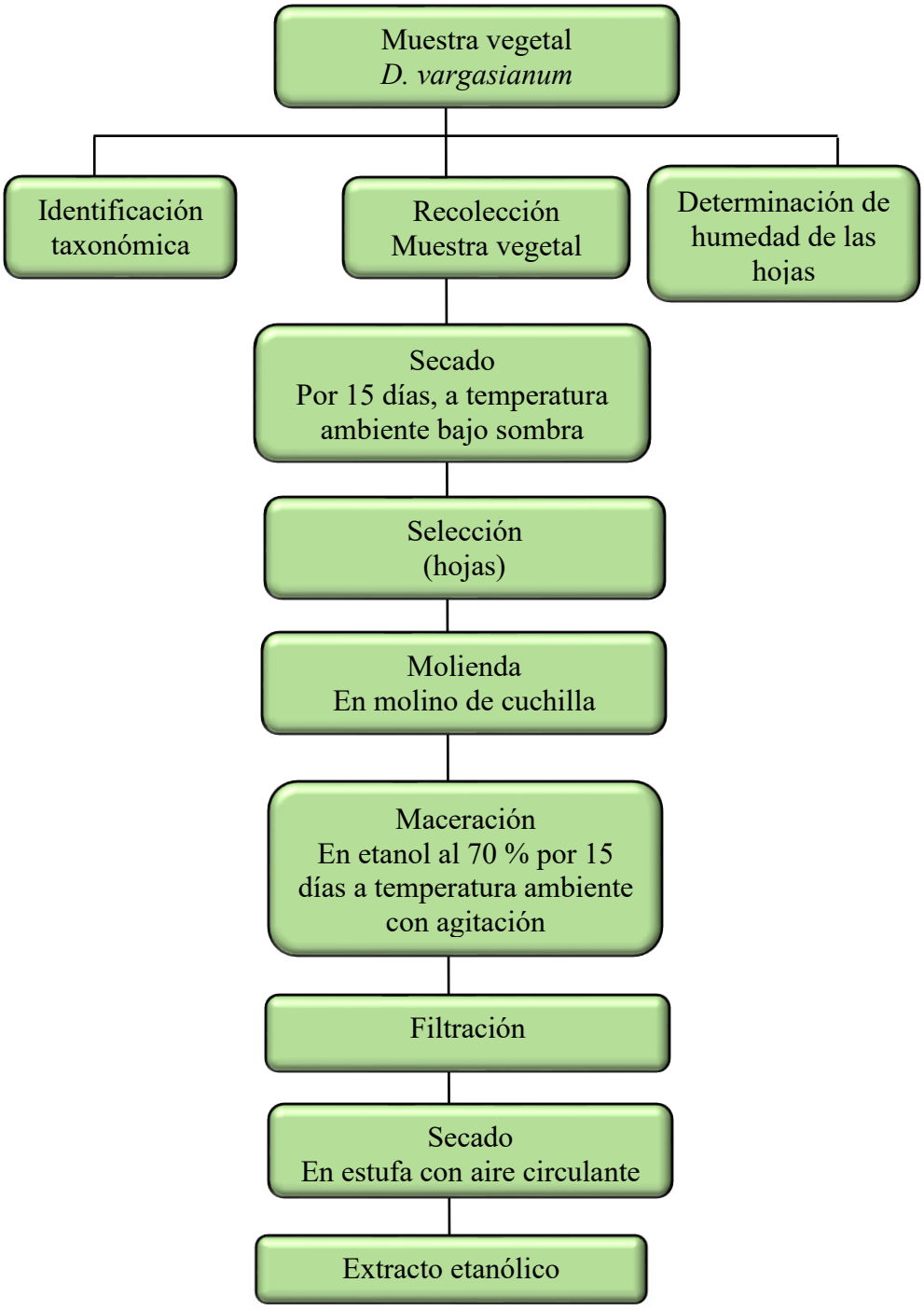
Nombre vulgar: “pie de perro”



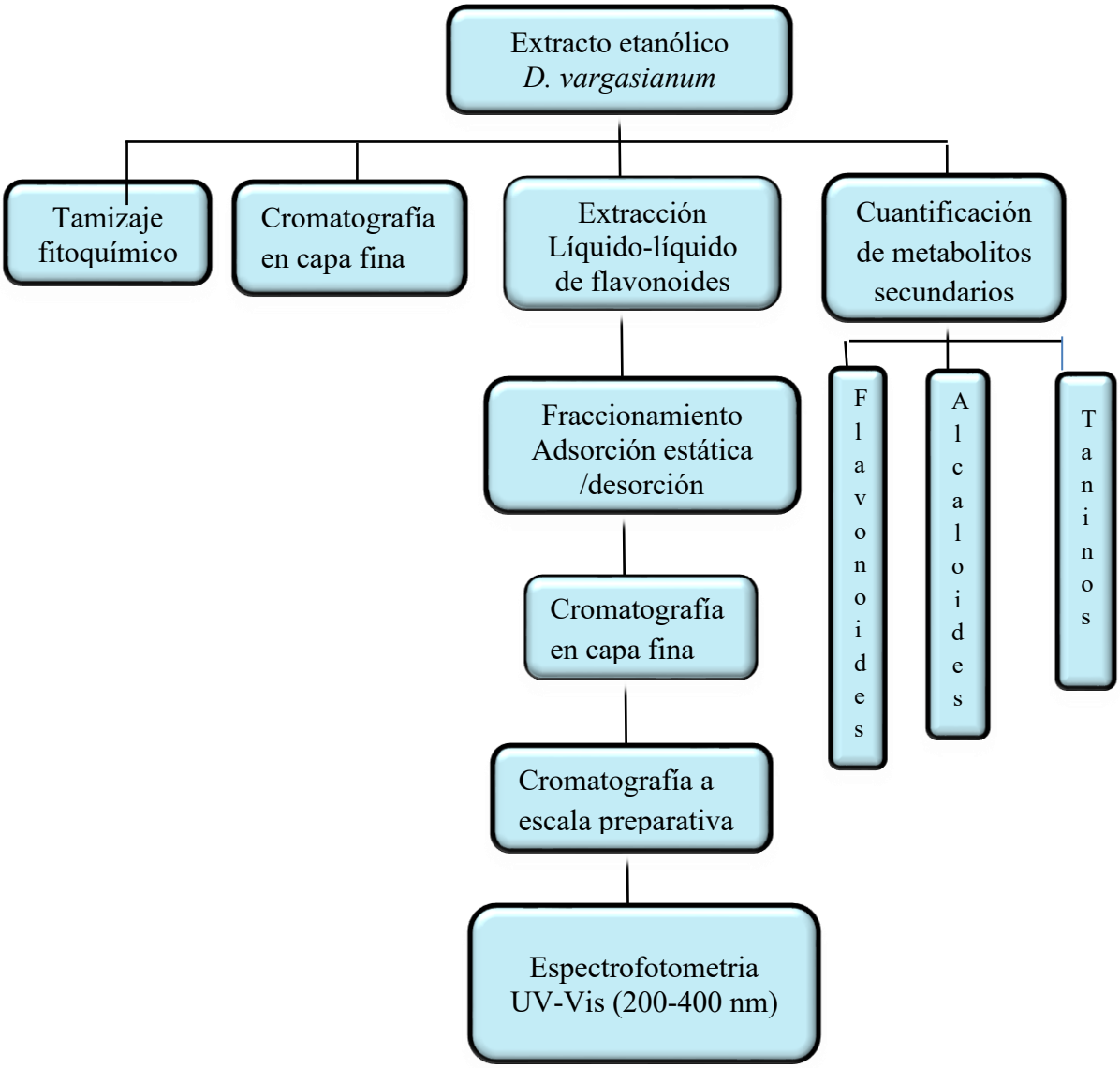
Figura 15. ***D. vargasianum*** **Schubert: partes aéreas de la especie recolectada en el distrito de Callahuanca, provincia de Huarochirí.** Elaboración propia.

Las hojas y tallos de la planta fueron secados a la sombra a temperatura ambiente por dos semanas, se utilizó papel kraft, cambiándose de papel cada 24 horas. Las hojas secas fueron seleccionadas y pulverizadas en un molino de cuchillas tipo Wiley. Se incorporó el polvo de hojas secas en frasco de vidrio color ámbar con tapa de polipropileno de color negro.

Se determinó la humedad de la planta mediante el método gravimétrico[234]. Se pesó 10 g de la muestra de hojas frescas en balanza analítica OHAUS, se secó en estufa MEMMERT a 105 °C durante 5 horas y se pesó la muestra. Se continuó con el secado y pesado a intervalos de 1 hora hasta que la diferencia entre los dos pesos sucesivos no sea mayor de 0.25 %. De igual forma se procedió con las hojas secas, usándose una muestra de 2 g.



Fígura 16. **Flujograma de la obtención del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* "pie de perro"**. Fuente: elaboración propia.



Fígura 17. Flujograma del estudio fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* "pie de perro". Fuente: elaboración propia.

3.5.2. Obtención del extracto etanólico

Se incorporó 726.4 g de polvo de hojas secas de *D. vargasianum* Schubert en tres frascos ámbar de 2.5 L en igual cantidad y se maceró con etanol 70° en proporción aproximada de 1:10 m/v, dentro del lapso de 24 horas de efectuada la molienda, protegido de la luz y el calor. Se agitó diariamente por 15 días. Luego, se filtró, se concentró en rotavapor y luego en estufa de aire circulante a 40 ºC en fuentes de vidrio de pirex. Se desecó en 4 días y se obtuvo un residuo de peso constante que se denominó extracto etanólico. Para el análisis fitoquímico se utilizó 100 g de polvo de hojas secas de *D. vargasianum* Schubert, se maceró en 1 L de alcohol de 70°, siguiendo el procedimiento anterior y el filtrado se llevó directamente a estufa de aire circulante a 40 ºC. Los extractos fueron conservados a 3-5 ºC. Se calculó el rendimiento del extracto etanólico (%).

3.6. Estudio fitoquímico

3.6.1. Ensayo de solubilidad

De manera secuencial, se ordenó y etiquetó los tubos de ensayo con los nombres de los solventes de diferente polaridad: agua destilada, metanol, etanol 96 %, etanol 70 %, diclorometano, cloroformo, n-hexano y éter dietílico[235]. Se introdujo a cada tubo de ensayo 20 mg de extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert y 1 mL de los solventes descritos. Se agitó cada tubo de ensayo y se procedió a observar los resultados de solubilidad por un tiempo máximo de 10 minutos.

3.6.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó de acuerdo a la metodología de Lock[235]. Se utilizaron porciones de 10 mg del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert para realizar las pruebas fisicoquímicas de caracterización, de cambios de coloración y formación de precipitados[235]. Porciones de 10 mg de extracto se disolvieron en 2 mL de agua y se realizaron los siguientes ensayos: prueba Molish, prueba de ninhidrina, prueba de antrona, prueba de tricloruro férrico, prueba de Shinoda, prueba de Dragendorff, prueba de Borntrager, prueba de Rosenheim, prueba de Mayer, prueba de la gelatina, prueba de Liebermann-Burchard, prueba de glucósidos y prueba de espuma.

Se realizó la cromatografía en capa fina, usando como fase estacionaria silica gel GF_{254} y como fase móvil los solventes n-butanol: ácido acético: agua (BAW) (4:1:5) para confirmar la presencia de los metabolitos secundarios[235]. Se aplicó la siembra del extracto etanólico seco, previamente reconstituido en etanol 70% usando capilares nuevos. Los reveladores usados fueron: tricloruro férrico al 1% para taninos, Dragendorff para alcaloides y tricloruro de aluminio para flavonoides.

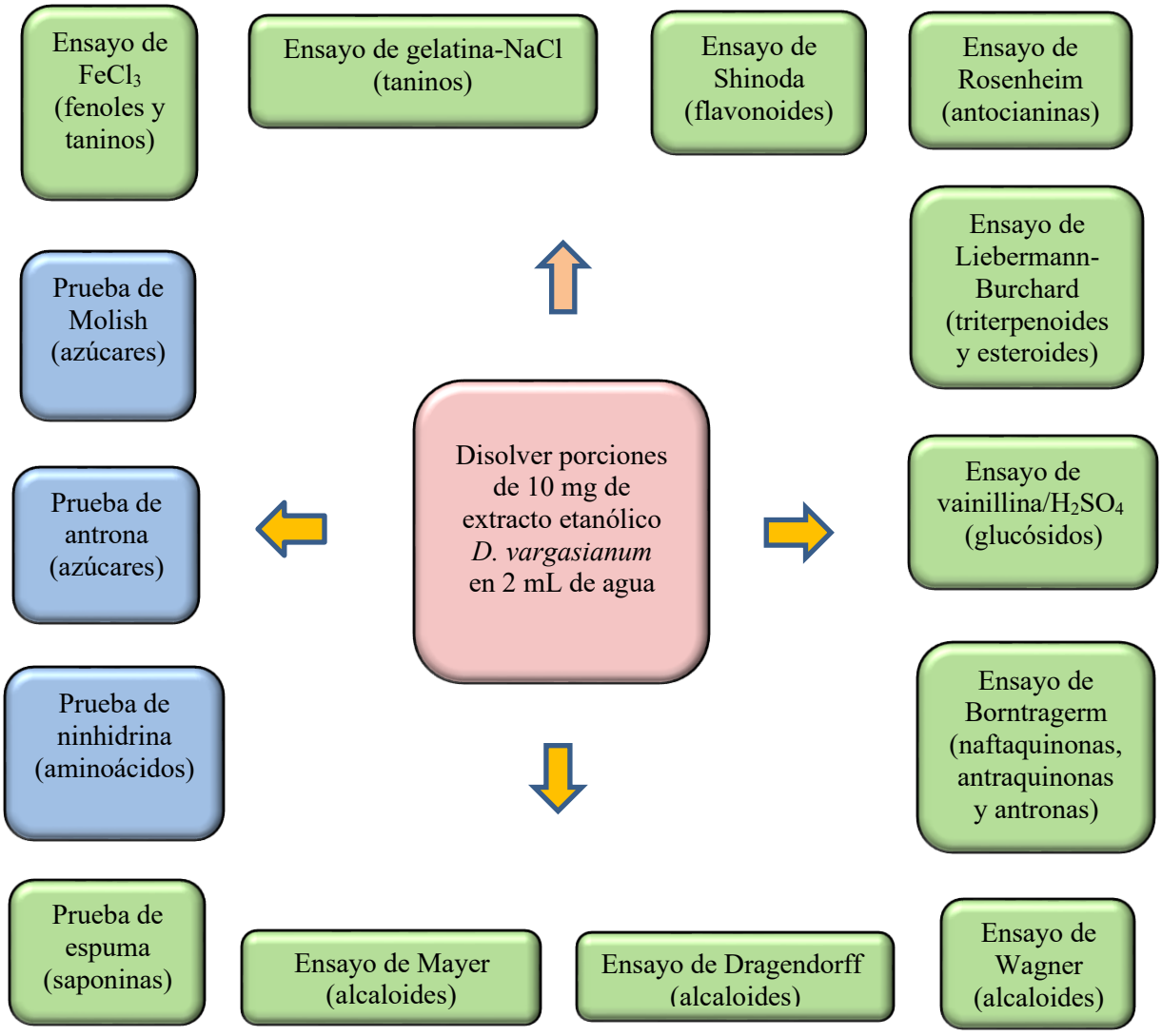


Figura 18. **Tamizaje fitoquímico.** Fuente: elaboración propia.

3.6.3. Estudio cromatográfico

3.6.3.1.Fraccionamiento de flavonoides

En base a los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico y de la cromatografía en capa fina preliminar, se procedió primero a realizar la extracción de flavonoides. Se trabajó con 3 g del extracto etanólico seco de *D. vargasianum*, se disolvió en 30 mL de agua destilada y se incorporó en embudo de decantación para realizar la partición por solventes (extracción líquida – líquido), utilizando tres series de 30 mL de solventes de polaridad creciente: n-hexano, acetato de etilo y n-butanol respectivamente[236,237]. Se trabajó con la fracción de acetato de etilo (fr. AcOEt) y la fracción de n-butanol (fr. n-BuOH) y se llevaron al rotavapor para su reducción de volumen al 50%.

Se prosiguió con la extracción en fase solida: adsorción estática y desorción[238, 239, 240, 241]. Se realizó la preparación de la resina en tres matraces esféricos de 50 mL fondo plano respectivamente. Para ello, en cada matraz, se incorporó 3 g de resina Diaion® HP-20 (Mitsubishi Chemical), se agregó 10 mL de metanol, se removió suavemente por diez minutos para asegurar una mezcla completa, se dejó en reposo durante 30 minutos y se filtró. Luego se enjuagó la resina con agua desionizada en proporción líquido: sólido (5: 1 mL/g).

Se procedió con la adsorción de la solución acuosa del extracto etanólico seco, fr. AcOEt y fr. n-BuOH. En un matraz esférico de 50 mL fondo plano con la resina preparada, se incorporó 10 mL de la solución acuosa del extracto etanólico seco. La adsorción se realizó a 20 °C y 150 rpm con agitador magnético durante 30 minutos, se dejó reposar, se filtró el sobrenadante y se enjuagó la resina con 10 mL de agua desionizada. Se realizó el mismo procedimiento con la fr. AcOEt y la fr. n-BuOH.

La desorción se realizó usando gradientes de MeOH: H_2O. La desorción del absorbato de la solución acuosa del extracto etanólico con MeOH: H_2O (100: 0 v/v) a 20 °C y 150 rpm con agitador magnético durante 30 minutos. El adsorbato de la fr. AcOEt presente en la resina fue desorbido con 10 mL de MeOH: H_2O (50: 50, 60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10, 100: 0 v/v) sucesivamente. La desorción se realizó a 20 °C y 150 rpm con agitador magnético durante 30 minutos. Se realizó el mismo procedimiento con la fr. n-BuOH, siendo desorbido con 10 mL de MeOH: H_2O (50: 50, 60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10 v/v) sucesivamente.

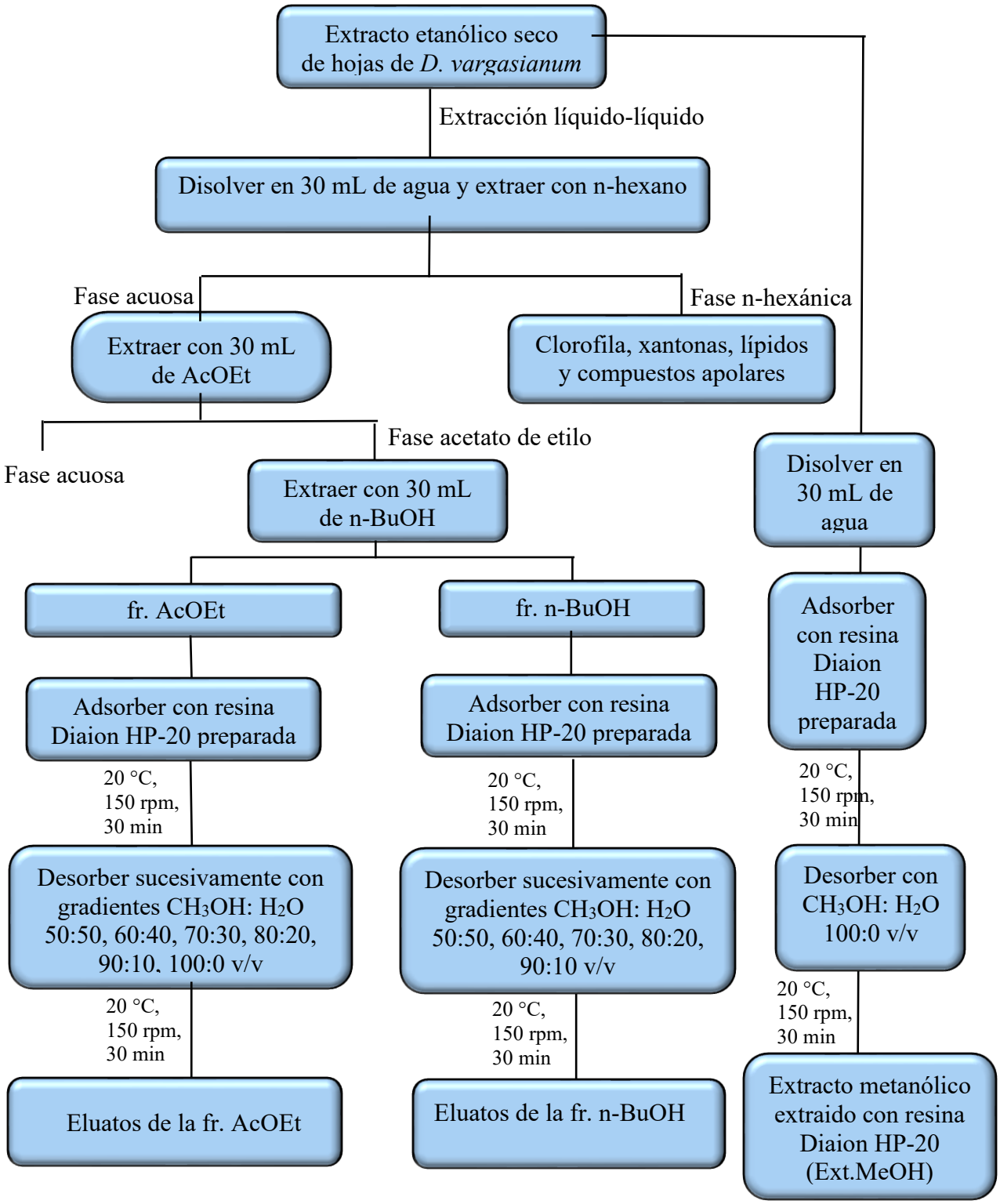


Figura 19. **Fraccionamiento de flavonoides con resina Diaion HP-20**. Elaboración propia.

3.6.3.2.Cromatografía en capa fina

Para investigar los tipos de flavonoides se realizó la cromatografía en capa fina (CCF) con la fr. AcOEt y la fr. n-BuOH adsorbidas con resina Diaion HP-20 y desorbidas con MeOH: H_2O (50: 50, 60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10, 100: 0 v/v) y las fracciones de AcOEt y n-BuOH. La codificación del orden de adición de las fracciones en la placa cromatográfica fue: Del (1 al 6): eluatos MeOH: H_2O (50: 50, 60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10, 100: 0 v/v) de la fr. AcOEt separado con resina Diaion HP-20, (7): fr. AcOEt, (8): extracto metanólico separado con resina Diaion HP-20, (9): fr. n-BuOH, del (10 al 14): eluatos MeOH: H_2O (50: 50, 60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10 v/v) de la fr. n-BuOH separado con resina Diaion HP-20. Se trabajó con cromatoplacas de aluminio de silica gel GF_{254} de 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor y como fase móvil se usó $CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O 100:11:11:26 v/v. Se observó la placa cromatográfica a la luz UV 365 nm sin/con vapores de amoniaco. Se procedió a realizar el revelado de la placa por aspersión del reactivo de Neu (difenilborinato etanolamina al 1% metanólico) + PEG-400 y se visualizó con luz UV 365 nm.

3.6.3.3.Cromatografía en capa fina a escala preparativa

En base a los resultados obtenidos en la cromatografía analítica, se seleccionó el eluato MeOH: H_2O 60 : 40 v/v de la fracción n-BuOH separada con resina Diaion HP-20. Para la cromatografía en capa fina preparativa, se utilizó una fase estacionaria de silica gel GF_{254} 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor y como fase móvil $CH_3COOCH_2CH_3$: HCOOH: CH_3COOH: H_2O 100 : 11: 11: 26 v/v.

3.6.4. Estudio de espectrofotometría UV-Vis

Se llevó a cabo con el propósito de investigar los tipos de flavonoides tales como, flavonoles y flavonas. Se trabajó con el raspado de las manchas de la cromatografía preparativa. El raspado de las diferentes manchas cromatográficas se disolvió en 10 mL de metanol, se filtraron dos veces y fueron incorporadas en viales individuales para realizar la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis de barrido 200 – 400 nm.

3.6.5. Cuantificación de flavonoides totales

Se cuantificaron los flavonoides totales presentes en el extracto etanólico seco por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm por triplicado, según Lock et al.[242]. Se preparó la curva de calibración, se pesaron 2.70 mg de quercetina de grado Q.P. y se disolvió con etanol 80 % en cantidad suficiente para 10 mL de solución. Luego se tomó sucesivamente 100, 175, 350 y 750 µL de la solución preparada previamente para diluirlo con etanol 80 % hasta su enrase respectivo en fiolas 10 mL x 4, siendo las concentraciones teóricas de las soluciones estándares de 2.70 µg/mL, 4.73 µg/mL, 9.45 µg/mL y 18.90 µg/mL respectivamente. A cada disolución preparada se añadió 200 µL de acetato de sodio 1 M y 200 µL de nitrato de aluminio al 10 %, se dejó reposar por 40 minutos y se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis a 415 nm. Por otro lado, para la preparación de la muestra por triplicado se pesaron 30.9 mg del extracto etanólico seco y se diluyeron en tres fiolas de 25 mL con etanol al 80 %. Se tomaron 0,5 mL de cada muestra y se diluyeron a 25 mL. Se tomó una alícuota de 1mL de cada fiola y se agregaron 200 µL de acetato de sodio 1 M y 200 µL de solución de nitrato de aluminio al 10 %. Se dejó reposar por 40 minutos. Finalmente se procedió a leer las absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro UV-Vis a 415 nm de longitud de onda. La cantidad de flavonoides totales se expresó en miligramos de equivalentes de quercetina (QE) por gramo de muestra.

3.6.6. Cuantificación de taninos totales

Se cuantificaron los taninos totales del extracto etanólico seco por espectrofotometría UV-Vis a 700 nm por triplicado, según Lastra et al.[243]. Se preparó previamente una curva de calibración a las concentraciones de 2, 4, 8, 10, 20 y 25 ppm del patrón ácido tánico. Se procedió a leer las absorbancias del patrón ácido tánico para elaborar la curva de calibración. De otro lado, se pesó 0.50 g de extracto etanólico seco y se disolvió en 50 mL de metanol – agua 25:25 v/v. El método consta de dos etapas. En la primera etapa se cuantifica los fenoles totales. Se realizó varias diluciones de la muestra, se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio al 20 % y se formó un complejo coloreado azul; asimismo se preparó el blanco, sin la incorporación de la muestra. En la segunda etapa se cuantifica los fenoles residuales. Se realizó la separación de taninos usándose gelatina al 25 %, caolín 2.5 % y solución ácida de cloruro de sodio. Se agitó y filtró al vacío, posteriormente se adicionó el

reactivo de Folin-Ciocalteu, solución de carbonato de sodio al 20 % y agua desionizada; asimismo se preparó el blanco, sin la incorporación de la muestra. Se tapó con papel de aluminio y tras una hora de reposo, se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis a 700 nm.

La cuantificación de los taninos totales se obtiene restando cantidad de fenoles residuales al contenido de fenoles totales. La cantidad de taninos totales se expresó en miligramos de equivalentes de ácido tánico (TAE) por gramo de muestra.

3.6.7. Cuantificación de alcaloides totales

Se cuantificó los alcaloides totales del extracto etanólico por triplicado mediante adaptación del método volumétrico en medio no acuoso, según Cabello et al.[244]. Se procedió a disolver la muestra con etanol 70%, se acidificó con HCl 1N, se llevó a baño maría por 30 minutos, luego se dejó en reposo por 3 días para separar su sal alcaloidea seguido de la alcalinización con amoniaco hasta pH 11 y se realizó la extracción con diclorometano, hasta reacción negativa con el reactivo de Dragendorff. Se concentró la fase orgánica separada a ¼ de su volumen inicial. Luego, se realizó la valoración en medio no acuoso, se agregó 10ml de ácido acético glacial y 3 gotas de cristal violeta como indicador. Se valoró con ácido perclórico 0.01N como agente titulante hasta el punto final que es el cambio de coloración de azul a verde. La cantidad de alcaloides totales se expresó en miligramos de trigonelina por gramo de muestra.

3.7. Ensayo de toxicidad aguda oral

Se realizó con la finalidad de estimar la dosis letal media (DL_{50}), según la directriz N° 425 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2008)[245] para prueba límite de sustancias con baja toxicidad. Se trabajó con 15 ratones albinos de la cepa BALB/c adultos hembras nulíparas y no gestantes de 25 a 27 g de peso distribuidos al azar en 3 grupos de 5 animales cada grupo, de los cuales 2 grupos recibieron tratamiento y un grupo control. Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes del experimento y bajo condiciones estándar. Posteriormente, se les administraron las dosis de 2000 y 5000 mg/kg de solución acuosa del extracto de *D. vargasianum*, mediante sonda intragástrica. Los ratones

fueron observados a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 24 horas posadministración para signos de toxicidad, mortalidad y tiempo de ocurrencia y/o duración, hasta las 2 semanas. Se prestó especial atención en el comportamiento, temblor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma. Así mismo, se realizó el pesado de los ratones al inicio, a los 7 y 14 días para detectar cambios en el peso corporal de los grupos tratados en comparación al grupo control. Al término del experimento, se sacrificó a los animales con sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg) por vía intraperitoneal, seguidamente se extirparon hígado, corazón, pulmones y riñones para su evaluación macroscópica. Por otro lado, la directriz N° 425 de la OECD establece que DL_{50} es mayor que la dosis de prueba, cuando la mitad más uno de los animales de un grupo sobrevive.

3.8. Efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de *Desmodium vargasianum*

3.8.1. Efecto hipoglucemiante

Se utilizó el modelo de inducción de diabetes por aloxano, según Kameswara Rao et al.[246] modificado. Se trabajó con cuarenta y ocho ratas *Rattus norvegicus* cepa Sprague Dawley de 3 meses de edad y 240 ± 20 g de peso que estuvieron aclimatados en el Laboratorio 7 días antes de la experimentación. Las ratas fueron dispuestas en jaulas metálicas, con alimento balanceado y cantidad suficiente de agua. El ambiente de experimentación se mantuvo a una temperatura de 25 ± 1 °C y humedad relativa de 65% en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se distribuyeron al azar en 6 grupos de 8 ratas cada uno. Posteriormente, se indujo diabetes con aloxano (130 mg/kg) a 5 grupos de 8 ratas cada uno, dejando transcurrir 48 horas para que se estabilice la hiperglicemia. Se generó dos heridas incisas de 1 cm de longitud en el tercio inferior del dorso, paralelo a la columna lumbar de cada animal. Se realizó las mediciones de los niveles de glucemia a los animales de experimentación para comprobar la hiperglucemia. Se aplicaron los tratamientos a los grupos de la siguiente manera:

Grupo I. Suero fisiológico 2mg/kg (control negativo)
Grupo II. Aloxano (control positivo)
Grupo III. Aloxano + EDV 50 mg/ kg (EDV 50)
Grupo IV. Aloxano + EDV 250 mg/ kg (EDV 250)

Grupo V. Aloxano + EDV 500 mg/ kg (EDV 500)
Grupo VI. Aloxano + GB 5 mg/ kg (GB 5)

Después de la administración de los tratamientos, se realizaron las mediciones de glucemia al cabo de 1, 2, 4 y 6 horas durante el primer día de tratamiento. Posteriormente, se realizaron las mediciones de glucemia cada 24 horas durante cuatro días postratamiento.

Indicador: Niveles de glucosa sanguínea
Unidad de medición: mg/dL

Eficacia hipoglucemiante (%):

$$\frac{(\text{glucemia final} - \text{glucemia inicial})}{\text{glucemia inicial}} \times 100$$

Eficacia relativa hipoglucemiante (%):

$$\frac{(\text{AUC control positivo} - \text{AUC grupo con tratamiento})}{\text{AUC control positivo}} \times 100$$

AUC: área bajo la curva

3.8.2. Efecto cicatrizante

Se utilizó el método de Vaisberg et al.[247] modificado para evaluar el efecto cicatrizante del extracto etanólico de *D. vargasianum*. Se trabajó con cinco grupos de ratas que recibieron la inducción con aloxano y un grupo de ratas normoglucémicas. Se realizó el depilado de la mitad inferior del dorso de las ratas y se controló por 24 horas para observar que no se produzca irritaciones en la piel. Luego, se generó dos heridas incisas de 1 cm de longitud en el tercio inferior del dorso, paralelo a la columna lumbar. Posteriormente, se efectuaron los tratamientos con las soluciones acuosas del extracto de *D. vargasianum* (50, 250 y 500 mg/kg p.c) y de glibenclamida 5 mg/kg p.c. Al cabo de 96 horas de efectuados los tratamientos en forma diaria, se sacrificaron los animales y se procedió con el método tensiométrico, para conocer la resistencia a la tensión en ratas diabéticas y determinar la eficacia de cicatrización. Por otro lado, se halló la resistencia a la tensión en piel sana en un grupo de ratas

normoglucémicas. Luego, se realizaron las mediciones de resistencia a la tensión a los grupos experimentales. Asimismo, se tomaron muestras para la evaluación del tejido histológico de las heridas incisas a todos los grupos.

Indicador: Resistencia a la tensión
Unidad de medición: gramos

$$\text{Eficacia de cicatrización (\%)} = \frac{\text{gramos requeridos para abrir piel cicatrizada}}{\text{gramos para abrir piel sana}} \times 100$$

3.9. Estudio histológico

3.9.1. Efecto hipoglucemiante

Después de la muerte de los animales con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg) por vía intraperitoneal, se les extirparon los páncreas y fueron conservados en solución de formol al 10 % para su posterior estudio histopatológico. Posteriormente, fueron laminados y procesados. Se realizó la deshidratación e impregnación en parafina sólida. Se cortaron con micrótomo de 5 a 6 micras de grosor. Se tiñeron con hematoxilina-eosina a fin de caracterizar las alteraciones microscópicas. Las muestras de páncreas fueron procesadas en el Instituto de Patología de la UNMSM - Hospital Arzobispo Loayza.

Indicador: Nivel histológico de lesión
Unidad de medición: Parénquima, islotes de Langerhans, células alfa, beta y gamma

3.9.2. Efecto cicatrizante

Las muestras de tejidos de las heridas incisas fueron obtenidas inmediatamente a la muerte de los animales. Se seccionó con ayuda de un bisturí, un área de 2 cm de ancho x 2.5 cm de largo. Estos tejidos fueron sujetados cuidadosamente en trozos de tecnopor, para evitar el enrollamiento natural del tejido separado y fueron depositados en una solución de formaldehido al 10% para lograr la fijación. Las muestras de tejidos de las heridas incisas fueron procesadas en el Instituto de Patología de la UNMSM - Hospital Arzobispo Loayza.

Indicador: Nivel histológico de cicatrización

Unidad de medición: Epidermis, dermis superficial, macrófagos, tejido de granulación, fibroblastos y fibras de colágeno.

3.10. Evaluación estadística

Los datos obtenidos en los ensayos para cada grupo de ratas fueron almacenados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel 2016, donde fue codificada. Luego se trasladaron dichos datos a los programas estadísticos Minitab 18.1 y Graphpad Prism 8.0 para su análisis estadístico descriptivo e inferencial. La estadística descriptiva se presentó con medidas de tendencia central (medias) y de dispersión (desviación estándar y error estándar), y con tablas porcentuales. Se verificó la normalidad de las mediciones con la prueba de Shapiro Wilk. Asimismo, se aplicó la prueba de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Posteriormente, se aplicaron las pruebas de ANOVA de un factor (tratamiento) y ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo) para determinar si hay diferencias entre las medias de las glucemias de los grupos experimentales en los periodos estudiados (6 y 96 horas), y si hay diferencias entre las medias de las resistencias a la tensión de los grupos experimentales a las 96 horas. Asimismo, se aplicaron las comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey. En las pruebas de inferencia se tomó un nivel de confianza del 95% ($p<0.05$) para el efecto higoglucemiante y de 99% ($p< 0.01$) para el efecto cicatrizante.

3.11. Consideraciones éticas

El cuidado y manejo de los animales de experimentación se realizó conforme a Ley 30407 (Ley de Protección y Bienestar Animal)[248], normas y procedimientos éticos descritos en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)*[249]. Se trabajó según lo indicado en normas de bioseguridad y protección personal, brindándose buenas condiciones de mantenimiento y salud a los animales de experimentación, y estuvieron expuestos al mínimo dolor necesario. Se realizaron los procedimientos de experimentación con respeto, afecto y gratitud, siendo plenamente conscientes que son seres vivos y que las ciencias biomédicas avanzan con los trabajos experimentales gracias a ellos. Los animales de experimentación fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico[249].

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación de resultados

4.1.1. Estudio fitoquímico

4.1.1.1. Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad encontrado en las hojas frescas es de 72.90 % y en las hojas secas es de 7.53 %, como se presenta en la tabla 1.

Tabla 4. **Porcentaje de humedad de hojas frescas y secas de *Desmodium vargasianum*.**

N	Peso del filtro vacío (g)	Muestra fresca (húmeda) (g)	Peso del filtro + muestra seca (g)	% Humedad
Muestra: hojas frescas				
1	24.7752	10.0215	32.0473	72.54 %
2	24.7752	10.0215	32.0157	73.25 %
				Media = 72.90 %
Muestra: hojas secas				
1	23.1054	2.0324	23.2597	7.59 %
2	23.1054	2.0324	23.2572	7.47 %
				Media = 7.53 %

Fuente: elaboración propia.

4.1.1.2. Rendimiento del extracto etanólico de *Desmodium vargasianum*

Tabla 5. **Rendimiento del extracto etanólico.**

Extracto	Muestra (g)	Extracto etanólico seco (g)	Rendimiento (%)
Extracto etanólico	726.37	73.16	10.07

Fuente: elaboración propia.

4.1.1.3. Ensayo de solubilidad

Con el ensayo de solubilidad se evidenció que el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert es soluble en solventes polares. Ver tabla 6.

Tabla 6**. Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*.**

SOLVENTE	RESULTADO
Agua destilada	++
Metanol	+++
Etanol 96%	+++
Etanol 70%	+++
Diclorometano	++
Cloroformo	-
n-hexano	-
Éter dietílico	-

Leyenda: (-) insoluble; (+) poco soluble; (++) soluble; (+++) muy soluble; elaboración propia.

4.1.1.4. Tamizaje fitoquímico

El método de tamizaje fitoquímico sugiere la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides en el extracto etanólico de las hojas de *D. vargasianum* (tabla 7).

Tabla 7**. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*.**

METABOLITO	REACCIÓN	RESULTADO
Carbohidratos	Molish	+
	antrona	+
Aminoácidos libres y grupos aminos	ninhidrina	-
Compuestos fenólicos	tricloruro férrico	+++
Taninos	gelatina-NaCl	++
Flavonoides	Shinoda	++
Triterpenoides y esteroides	Liebermann-Burchard	+
Naftaquinonas, antraquinonas y antronas	Borntragerm	-
Antocianinas	Rosenheim	-
Alcaloides	Mayer	++
	Dragendorff	++
	Wagner	++
Saponinas	espuma	-
Glucósidos	vainillina + $H_2SO_{4\ cc}$	+

Leyenda: (-) ausencia; (+) leve; (++) moderado; (+++) abundante; elaboración propia.

La cromatografía en capa fina confirmó la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides en el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert.

4.1.1.5. Estudio cromatográfico

En los resultados de la cromatografía en capa fina preparativa del extracto y fracciones de acetato de etilo se observaron manchas de color púrpura muy tenue bajo la luz UV 365 nm, mientras que con el extracto y fracciones de n-butanol las manchas fueron de color púrpura. Luego, al aplicarles vapores de amoniaco se intensificó ligeramente el color púrpura y finalmente al ser reveladas con aspersión del reactivo de Neu (difenilborinato etanolamina al 1% metanólico) + PEG-400 las manchas cambiaron a color amarillo, bajo luz UV 365 nm. El color de las manchas es indicativo del tipo de flavonoides, según Mabry et al.[250] y Markham[251], como se puede ver en la tabla 8.

Por los resultados obtenidos, se concluye que conforme aumenta la concentración de MeOH en el eluyente, los flavonoides color púrpura a la luz UV 365 nm con o sin vapores de amoniaco y amarillo con el reactivo de Neu + PEG-400, van disminuyendo su intensidad. Ver figuras 20 y 21.

Tabla 8**: Revelado de flavonoides en cromatografía en capa fina.**

Fracciones	Rf	Luz UV 365 nm	Luz UV 365 nm + NH_3	Luz UV 365 nm +Reactivo de Neu/ PEG-400	*Posible tipo de flavonoide
F1	0.29	Púrpura	Púrpura	Amarillo	5-OH flavona / flavonol (3-OR) con 4’ OH ausente o sustituido.
F2	0.33	Púrpura	Púrpura	Amarillo	5-OH flavona / flavonol (3-OR) con 4’ OH ausente o sustituido.
F3	0.49	Púrpura	Púrpura	Amarillo	5-OH flavona / flavonol (3-OR) con 4’ OH ausente o sustituido.

*Fuente: Mabry et al.[250;] Markham[251]

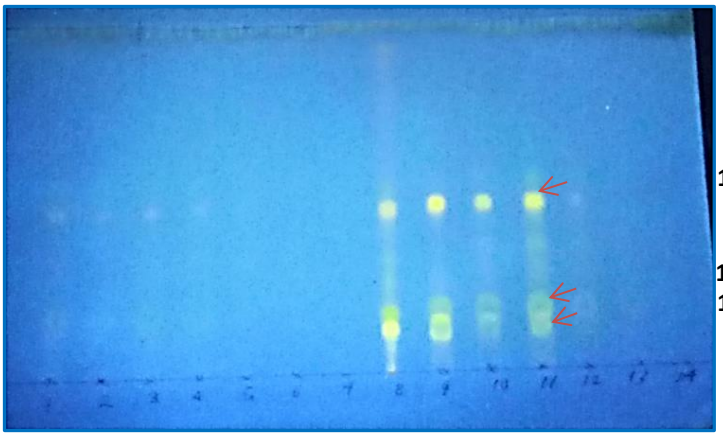


Figura 20. **Cromatografía de flavonoides revelada con reactivo de Neu (difenilborinato etanolamina al 1% metanólico) + PEG-400 y visualizada con luz UV 365 nm:** se observan en el carril derecho manchas color amarillo correspondientes a (**8**): extracto metanólico extraído con Diaion HP-20, (**9**): extracto n-butanol, (**10**) y (**11**)**:** eluatos MeOH: H_2O (50: 50) y (60: 40) de la fracción n-butanol separado con resina adsorbente Diaion HP-20. Fase fija: silica gel GF_{254} y fase móvil $CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O (100: 11: 11: 26). Fuente: elaboración propia.

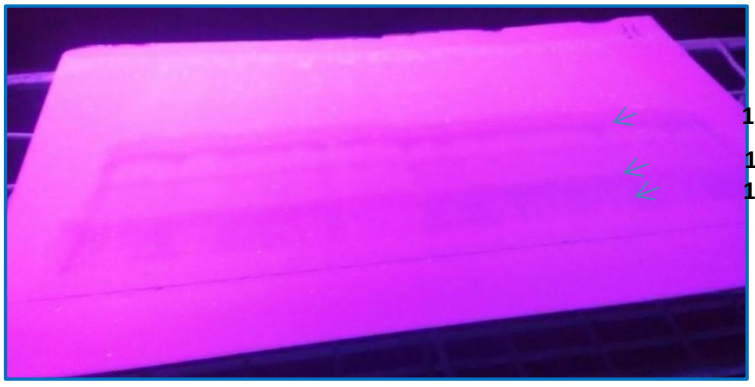


Figura 21. **Cromatografía preparativa del eluato MeOH: H2O (60: 40) de la fracción n-BuOH separada con resina adsorbente Diaion HP-20**, **visualizada con luz UV 365 nm**: se observan manchas color púrpura. Fase fija: silica gel GF_{254} y fase móvil: $CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O (100: 11: 11: 26). Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, se realizó la cromatografía en capa fina de los eluatos de resina Diaion HP-20 de la fracción n-BuOH frente a los estándares: rutina (flavonol monoglucósido con 2 OH en posición orto, 3' y 4'), quercetina (flavonol con 2 OH en posición orto, 3' y 4') y vitexina (flavona monoglucósido, 4' hidroxilado), seleccionados por su presencia en varias especies del género *Desmodium*. El sistema solvente empleado fue $CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O (100: 11: 11: 26 v/v) con constante dieléctrica aproximada ε= 24.8, que fue calculado utilizando la ecuación de Moore[252]. La constante dieléctrica nos permite caracterizar la polaridad del disolvente, de tal manera que a mayor valor de la constante dieléctrica mayor es la polaridad del disolvente. En el sistema solvente utilizado las bandas de los flavonoides con menor polaridad se desplazaron a mayor distancia en dirección a la parte superior de la placa cromatográfica, ver figura 22. La presencia del glúcido en la estructura de la rutina (Rf: 0.48) proporciona una mayor polaridad en comparación a la quercetina con Rf: 0.97. La vitexina (flavona glucósido) con Rf: 0.77 tiene mayor polaridad que la quercetina (flavonol). Por tanto, los resultados de la cromatografía en capa fina (CCF) en nuestro estudio es indicativo que, el extracto etanólico de *D. vargasianum* contiene flavonoides C-glicósidos porque los eluatos con hidrólisis ácida (HCl 2N: EtOH (1:1 v/v), 75 °C x 45 minutos) y sin hidrólisis presentaron iguales Rf en la CCF, descartándose la presencia de flavonoides O-glicósidos.

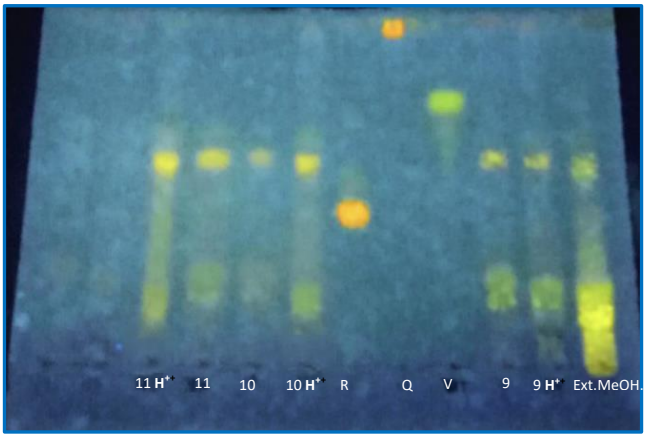


Figura 22. **Cromatografia de los eluatos de resina Diaion HP-20 de la fracción n-BuOH frente a estándares**: donde (11 H^+) y (11): eluatos MeOH: H_2O (60:40) de la fracción n-BuOH, (R): estándar de rutina, (Q): estándar de quercetina y (V): estándar de vitexina. Los otros carriles son eluatos de la fracción n-BuOH. Revelador Neu/ PEG-400, fase móvil $CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O (100:11:11:26 v/v). Fuente: elaboración propia.

4.1.1.6. Estudio de espectrofotometría UV-Vis

En base a los resultados de la cromatografía en capa fina se seleccionó el eluato MeOH 60:40 de la fracción n-BuOH del extracto etanólico de *D. vargasianum*, obteniéndose por cromatografía preparativa tres fracciones (11,1; 11,2 y 11,3) para el ensayo con el espectrofotómetro UV-Vis en el rango de radiación ultravioleta cercano de 200 a 400 nm. Los resultados evidencian la presencia de tres flavonoides de tipo flavona en las fracciones 11.1 (F1), 11.2 (F2) y 11.3 (F3). Ver anexos 4-6, tablas 9-11.

Tabla 9. **Señales con reactivos de desplazamiento del espectro UV de la fracción F1.**

Solvente/Solvente + Reactivo	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Desplazamiento	Asignación
MeOH	270.35	345.18	-	Flavona.
MeOH + MeONa	271.76	400.24	Desplazamiento batocrómico en la banda I (55.06 nm) con disminución en la intensidad	4'-OH ausente 2'-OH ausente 3', 5' OH
MeOH + $AlCl_3$				Formación de quelato. Ausencia de hidroxilos en posición orto
MeOH + $AlCl_3$ + HCl	268.94	398.35	Desplazamiento batocrómico en la banda I (53.17 nm).	Presencia de 5-OH (se mantiene el complejo en presencia de HCl).

Fuente: elaboración propia.

Tabla 10. **Señales con reactivos de desplazamiento del espectro UV de la fracción F2.**

Solvente/Solvente + Reactivo	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Desplazamiento	Asignación
MeOH	271.29	330.12	-	Flavona
MeOH + MeONa	272.71	388.47	Desplazamiento batocrómico en la banda I (58,35 nm) con disminución en la intensidad.	4'-OH ausente 2'-OH ausente 3' OH
MeOH + $AlCl_3$	271.29	330.59	No presenta cambios.	No hay formación de quelato Ausencia de hidroxilos en posición orto Presencia de 5-OH sustituido

Fuente: elaboración propia

Tabla 11**. Señales con reactivos de desplazamiento del espectro UV de la fracción F3.**

Solvente/Solvente + Reactivo	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Desplazamiento	Asignación
MeOH	271.63	330.24	-	Flavona.
MeOH + MeONa	275.06	375.76	Desplazamiento batocrómico en la banda I (45.52 nm) con disminución en la intensidad.	4'-OH sustituido.
MeOH + $AlCl_3$				
MeOH + $AlCl_3$ + HCl	271.76	334.35	Desplazamiento batocrómico en la banda I (4.11 nm). No presenta cambios la banda II.	Ausencia de hidroxilos en posición orto Posible presencia de 5-OH.

Fuente: elaboración propia.

El espectro UV de la mayoría de los flavonoides consta de dos principales máximos de absorción, uno de los cuales ocurre en el rango 240-285 nm (banda II) y el otro en el rango 300-400 nm (banda I)[253]. Según Mabry et al.[250], en general, las flavonas exhiben banda I entre 304 y 350 nm, mientras que los flavonoles entre 352 y 385 nm. Sin embargo, los flavonoles 3-OR con 3 –hidroxilo sustituido (metilado o glicosilado) se pueden encontrar entre 328 - 357 nm en la banda I, en este caso la banda I de esta clase de flavonoles se superpone con la región de la banda I de las flavonas[250]. Además, las flavonas y los flavonoles altamente oxigenados tienden a absorberse en longitudes de onda más largas que aquellos con menos sustituyentes de oxígeno[253].

La adición de MeONa a flavonas y flavonoles en metanol suele producir desplazamientos batocrómicos en todas las bandas de absorción. Sin embargo, un gran desplazamiento batocrómico en la banda I de unos 40 - 65 nm al añadir MeONa sin una disminución de la intensidad, es un diagnóstico de la presencia del grupo 4'-hidroxilo libre en flavonas y flavonoles 3-O sustituidos[250, 254]. Los flavonoles con 3-OH libre que carecen de un grupo 4'-hidroxilo libre también dan un desplazamiento batocrómico de 50-60 nm en la banda I, con disminución de la intensidad[250]. Los flavonoles con grupos hidroxilos 3, 4’ o 3,3’,4’, orto hidroxilados, di-orto hidroxilados dan espectros cuyas bandas disminuyen en intensidad en pocos minutos luego de añadir MeONa [253, 254].

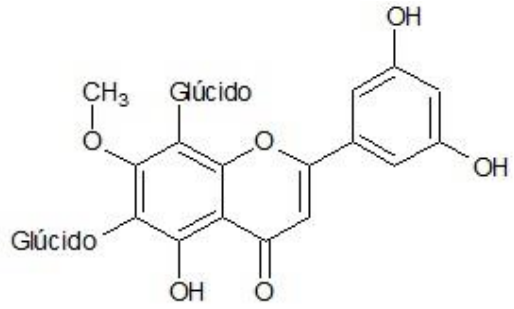
Con $AlCl_3$, flavonoles que contienen grupos hidroxilos en C-3 o C-5 o en flavonas con hidroxilo en C-5 forman complejos (quelatos) [250]. En flavonas (ausencia de 3-OH), un desplazamiento batocrómico de 35-55 nm en la banda I con la adición de $AlCl_3$ que se mantiene al adicionar HCl, es evidencia de la presencia de 5-OH [253], los cuales forman un complejo estable con el grupo carbonilo de C- 4, que se mantiene después de la adición de HCl [250, 253]. Los flavonoles (con o sin 5-OH) con 3-OH presentan desplazamiento batocrómico de 50-60 nm [253]. La presencia de hidroxilos en posición *orto* en el anillo B también forman complejos que producen efectos batocrómicos (30-40 nm), pero estos son inestables en medio ácido [250, 253]. En el caso de flavonas y flavonoles (sin 3-OH ni 5-OH) con hidroxilos en posición orto en el anillo B al añadir tricloruro de aluminio se produce un desplazamiento batocrómico de la banda I de 30-40 nm el cual se pierde al añadir HCl[254]. En el caso de flavonas y flavonoles (sin 3-OH ni 5-OH) con hidroxilos en posición orto en el anillo A al añadir tricloruro de

aluminio se produce un desplazamiento batocrómico de la banda I de 20-25 nm el cual se pierde al añadir HCl [254]. Las flavanonas, isoflavonas y flavonoles producen desplazamiento batocrómico en la banda II [254].

Según la literatura reportada, los flavonoles y flavonas a menudo se hidroxilan en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5', y algunos de estos grupos hidroxilos están frecuentemente metilados, acetilados o sulfatados[255]. Asimismo, en el estudio realizado por, Iinuma & Mizuno[256] sustentan que los posibles patrones de oxigenación en caso de monosustitución en el anillo B en la mayoría de flavonoides son en las posiciones 2', 3', 4' y para el caso de disustituciones son: 2' y 3', 2' y 4', 2' y 5', 2'y 6', 3' y 4', 3' y 5'. Por otro lado, Tanaka et al.[257], reportan que las flavonas con 2' OH en el anillo B producen desplazamiento batocrómico sin disminución de la intensidad similar a 4'OH al añadirse MeONa, el desplazamiento batocrómico (80 nm) sin disminución en la intensidad es mayor en caso de 2' OH y 3' OMe en posición orto y para 2' OH y 4' OMe el desplazamiento batocrómico es de 65 nm sin disminución en la intensidad. Además, cuando los flavonoles forman glicósidos, el enlace glicosídico está ubicado en la posición 3 o 7, para flavonas en la posición 7 y los carbohidratos son comúnmente L-ramnosa, D-glucosa, galactosa y arabinosa[255]. Según Iwashina[258] reporta que la mayoría de los flavonoles están presentes como O-glucósidos y muy raramente como C-glucósidos. Finalmente, se han encontrado flavonas C-glicosiladas en las posiciones 6 y 8 en varias especies de *Desmodium*[78,96,259,260].

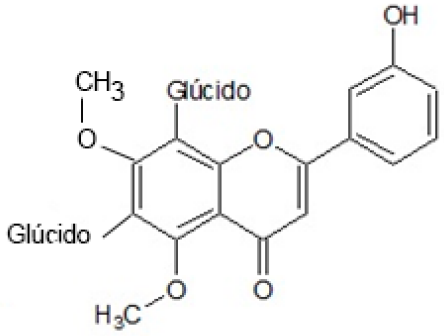
Se propone las estructuras parciales:

Fracción F1:



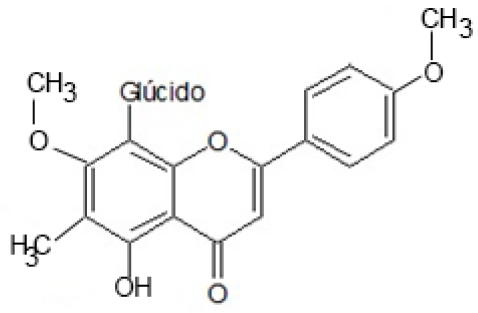
6-C-glicósido-8-C-glicósido-3′,5′,5-trihidroxi-7-metoxiflavona

Fracción F2:



6-C-glicósido-8-C-glicósido-3'-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona

Fracción F3:



8-C-glicósido-5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-metilflavona

Figura 23. **Propuesta de las posibles estructuras parciales de los flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum***. Fuente: elaboración propia.

4.1.1.7. Cuantificación de flavonoides totales

La cantidad de flavonoides totales se determinó mediante la fórmula:

$$FT = \frac{(A_m - b)\ V.\ Fd}{m.w}$$

FT : flavonoides totales expresados en µg QE/mg (mg QE/g) de extracto
A_m : absorbancia de la disolución final de la muestra
m y b : pendiente e intercepto de la ecuación de regresión lineal (curva de calibración)
V : volumen de la disolución final utilizada para la lectura en el espectrofotómetro
Fd : factor de dilución
w : peso (mg) del extracto (muestra)

Se obtuvieron de FT = 202.1 ± 1.1 mg QE/g de extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*, la ecuación de la curva de calibración de quercetina patrón fue:
$y= 0.0399x + 0.0574$, $r^2= 0.9998$ con $p < 0.05$.

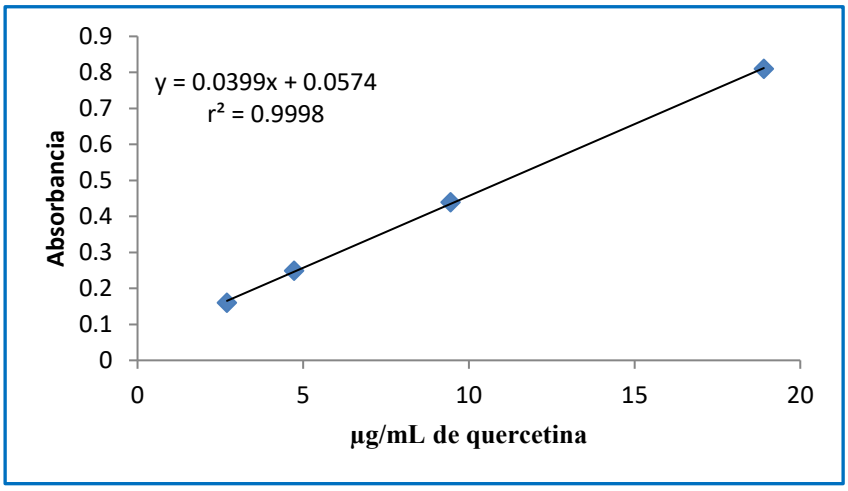


Figura 24. **Curva de calibración utilizando quercetina como estándar a 415 nm.**
Elaboración propia.

4.1.1.8. Cuantificación de taninos totales

La cantidad de taninos totales (TT) se obtuvieron mediante la diferencia entre la cantidad de fenoles totales (FT) y la cantidad de fenoles residuales (FR), expresados en mg de ácido tánico/g de extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*.

La cantidad de flavonoides totales se determinó mediante la fórmula: TT= FT – FR

Se obtuvo de TT = 178.5 ± 0.8 mg ATE/g de extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*, esto representa a 1.80 ± 0.01g ATE/100g de hojas secas. La ecuación de la curva de calibración del ácido tánico obtenida fue:

$y= 0.0952x + 0.0493$, $r^2=0.9991$ con $p < 0.05$.

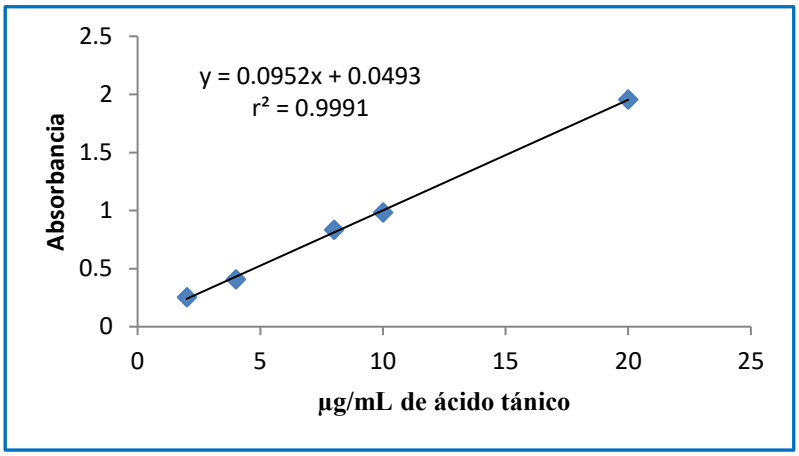


Figura 25. **Curva de calibración utilizando ácido tánico como estándar a 700 nm**. Elaboración propia.

4.1.1.9. Cuantificación de alcaloides totales

La cantidad de alcaloides totales determinado por el método volumétrico fue de 0.363 ± 0.01 mg equivalentes de trigonelina por cada 100 mg de extracto etanólico seco de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert.

$$\% \text{ de alcaloides totales (expresado en trigonelina)} = \frac{(G_m - G_b) \times N \times F \times PE \times 100}{W} \%$$

Donde:

G_m : gasto volumétrico de la muestra problema (mL)

G_b : gasto volumétrico del blanco (mL)

N : normalidad del $HClO_4$

F : factor de corrección

PE : peso equivalente de la base (trigonelina) en mg/mEq

W : peso de la muestra (mg)

Tabla 12. Resultados de la cuantificación de alcaloides totales.

Ensayos	G_m (mL)	G_b (mL)	N	F	PE (mg/mEq)	W (mg)	Alcaloides en extracto seco (%)	Alcaloides en extracto seco (mg/g)
1	2.6	0.1	0.01	1.0475	137.138	1001.7	0.3585	3.585
2	2.6	0.1	0.01	1.0475	137.138	1002.7	0.3582	3.582
3	2.7	0.1	0.01	1.0475	137.138	1000.7	0.3732	3.732

Fuente: elaboración propia.

Promedio de alcaloides en extracto seco (%) = 0.363 ± 0.01

Cantidad promedio de alcaloides = 3.633 ± 0.09 mg de equivalentes de trigonelina/g de extracto seco.

4.1.2. Evaluación de toxicidad aguda oral

El extracto etanólico seco de *D. vargasianum* administrado en solución acuosa por vía oral en ratones, permitió observar que los animales mostraron buen estado general. No se evidenciaron signos de toxicidad ni mortalidad durante las primeras 24 horas ni en el lapso de 2 semanas posadministración a dosis límite de 2 000 y 5 000 mg/kg p.c. La DL_{50} para el extracto etanólico de *D. vargasianum* se encuentra por encima de 5 000 mg/kg p.c, puesto que, al administrarse dicha dosis, no se produjo la muerte de los animales. En la tabla 13 se observa que no existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los pesos del grupo control y los grupos tratados con el extracto de *D. vargasianum*. En el examen macroscópico de los principales órganos no se observó alteraciones en comparación al grupo control.

Tabla 13. **Variación del peso corporal en la prueba de toxicidad aguda. Prueba de Tukey.**

Tiempo (días)	Peso corporal (g ± SD)		
	Control	2000 mg/kg	5000 mg/kg
0	26.2 ± 0.7	26.5 ± 0.6	26.1 ± 0.7
7	26.6 ± 0.6	27.0 ± 0.7	26.6 ± 0.8
14	27.2 ± 0.7	27.5 ± 0.6	27.3 ± 0.7

Leyenda: SD: desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

No existen diferencias significativas ($p>0.05$) entre los pesos de los grupos control y los que recibieron tratamiento (2000 y 5000 mg/kg).

4.1.3. Efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Desmodium vargasianum* en ratas diabéticas

Se aplicaron previamente pruebas estadísticas para verificar si los datos de los grupos experimentales cumplen con los requisitos para pruebas paramétricas. En este contexto, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar si los datos ($n<50$) de cada población (grupo experimental) presentan distribución normal. Se comprobó la distribución normal (anexo 8) y la homogeneidad de varianzas (anexo 9) de las mediciones en los grupos experimentales. Luego se aplicó la prueba paramétrica de análisis de varianzas (ANOVA) para comparar las medias de glucemias de los grupos experimentales (anexo 10). Posteriormente, se realizó las comparaciones múltiples entre las medias de glucemias de los grupos experimentales mediante la prueba post hoc de Tukey (anexo 11); sí ANOVA resultase con valor del estadístico F calculado> F crítico y nivel de significancia $p<0.05$.

4.1.3.1. Evaluación de la glucemia basal

La prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias basales de los grupos experimentales no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$). En la tabla 14 se muestra las medias de las glucemias basales de los grupos, con intervalo de confianza del 95%. Así mismo, utilizando el software estadístico Minitab se realizó las comparaciones múltiples entre las medias de los grupos (prueba de Tukey) resultando que todos los grupos experimentales comparten la letra A en la columna de agrupación (tabla 14) lo cual indica que no existe diferencia significativa entre sus medias. Se comprobó que el experimento se inició con igualdad de condiciones entre los grupos experimentales.

Tabla 14. **Comparación de las glucemias basales entre los grupos experimentales.**

Grupo	N	Glucemia basal media ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación
Control -	8	80.9 ± 3.9	1.4	77.6 - 84.1	A
Control +	8	79.4 ± 5.1	1.8	75.1 - 83.7	A
EDV 50 mg/kg	8	77.3 ± 5.0	1.8	73.1 – 81.4	A
EDV 250 mg/kg	8	80 ± 3.7	1.3	76.9 – 83.1	A
EDV 500 mg/kg	8	75.1 ± 7.0	2.5	69.3 - 81.0	A
GB 5 mg/kg	8	81.5 ± 4.2	1.5	78.0 - 85.0	A

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

4.1.3.2. Evaluación de la glucemia a las 0 horas postratamiento

Los niveles de glucemia de los grupos experimentales se monitorearon a las 48 horas posadministración de aloxano.

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) de los grupos presentan diferencia significativa ($p<0.05$). En la tabla 15 se muestran los niveles de glucosa (mg/dL) de los grupos, posteriores a la inducción de diabetes.

Al aplicar la prueba de Tukey, se observó que la media de glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales. En la columna de agrupación de la tabla 15 se observa que el grupo control negativo está representado exclusivamente por la letra B, lo cual indica que existe diferencia significativa ($p<0.05$) de la media de glucemia de este grupo en comparación a las medias de las glucemias de los demás grupos. Asimismo, en la tabla 15 observamos que los grupos experimentales a excepción del grupo control negativo comparten la letra A, lo cual indica que no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre las medias de las glucemias de los grupos control +, EDV 50, 250, 500 y GB 5.

Tabla 15. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a la hora 0 postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación
Control -	8	84.8 ± 5.8	2.0	79.9 - 89.6	B
Control +	8	439.4 ± 24.2	8.5	419.2 - 459.6	A
EDV 50 mg/kg	8	434.4 ± 16.3	5.8	420.7 - 448.0	A
EDV 250 mg/kg	8	424.3 ± 44.2	15.6	387.3 - 461.2	A
EDV 500 mg/kg	8	411.9 ± 18.8	6.7	396.2 - 427.6	A
GB 5 mg/kg	8	434.6 ± 42.4	15.0	399.2 - 470.1	A

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

La hiperglucemia (mg/dL) de los grupos experimentales superó los 250 mg/dL de glucosa, por tanto, la inducción de diabetes se realizó con éxito a una dosis de 130 mg/kg p.c. de aloxano.

4.1.3.3. Evaluación de la glucemia a la 1 hora postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) de los grupos experimentales a 1 hora postratamiento presentan diferencias significativas ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, se observó que la media de glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 16 en donde el grupo control negativo en la columna de agrupación es representada por la letra C y no es compartida dicha letra por los demás grupos. Se observó diferencia significativa ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los grupos EDV 250 y 500 en comparación al grupo control positivo, ver anexo 11. Así mismo, en la tabla 16 también observamos en la columna de agrupación que los grupos EDV 250 y 500 están representados por la letra B, lo cual indica diferencia significativa de sus medias de glucemia en comparación a la media de glucemia del grupo control positivo representada por la letra A. Así mismo, EDV 50 y GB 5 están representados por la letra A, lo cual indica que no existe diferencia significativa de sus medias de glucemia en comparación a la media de glucemia del grupo control positivo. El grupo tratado con EDV 500 mostró la media más baja de glucemia con 388.6 mg/dL (IC 95%: 340.2 - 437.1) y el grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 457.0 mg/dL (IC 95: 445.1 - 468.9), ver tabla 16.

Tabla 16. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a 1 hora postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación		
Control -	8	87.8 ± 5.1	1.8	83.5 - 92.0			C
Control +	8	457.0 ± 14.3	5.0	445.1 - 468.9	A		
EDV 50 mg/kg	8	429.3 ± 19.3	6.8	413.2 - 445.4	A	B	
EDV 250 mg/kg	8	400.0 ± 51.6	18.2	356.9 - 443.1		B	
EDV 500 mg/kg	8	388.6 ± 58.0	20.5	340.2 - 437.1		B	
GB 5 mg/kg	8	416.1 ± 39.3	13.9	383.3 - 449.0	A	B	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se realizó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo) (anexo 12), luego se realizó las comparaciones múltiples de glucemia de cada grupo experimental con respecto a su glucemia posaloxano (hora 0) mediante la prueba de Tukey. Al comparar las medias de las glucemias (mg/dL) de cada grupo experimental con respecto a su glucemia posaloxano, se

hizo evidente que ningún grupo mostró reducción significativa ($p>0.05$) de glucemia a la hora 1 con respecto a su glucemia posaloxano. En el anexo 13 se muestra las comparaciones múltiples de las medias de glucemias (mg/dL) de cada grupo con respecto a su glucemia posaloxano (hora 1 vs hora 0).

4.1.3.4. Evaluación de la glucemia a las 2 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) entre los grupos de experimentación a las 2 horas postratamiento presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, mostró que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 17 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. También mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 con respecto al grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No se observó diferencia significativa de las medias de las glucemias entre el grupo EDV 50 y el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Así mismo, no hubo diferencia significativa de las medias de las glucemias entre el grupo EDV 250 y el grupo EDV 500, ambos grupos tienen la letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de glucemia con 332.4 mg/dL (IC 95%: 304.0 - 360.7) y 330.6 mg/dL (IC 95%: 295.6 - 365.6) respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 465.5 mg/dL (IC 95: 445.6 - 485.4). Ver tabla 17.

Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo) (anexo 12), luego se realizó las comparaciones múltiples con la prueba de Tukey. Al comparar las medias de las glucemias (mg/dL) de cada grupo experimental con respecto a su glucemia posaloxano, los grupos EDV 50, 250 y 500 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a partir de las 2 horas postratamiento. Ver anexo 13.

Tabla 17. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 2 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación		
Control -	8	87.5 ± 5.0	1.8	83.3 - 91.7			D
Control +	8	465.5 ± 23.8	8.4	445.6 - 485.4	A		
EDV 50 mg/kg	8	398.4 ± 9.3	3.3	390.6 - 406.2		B	
EDV 250 mg/kg	8	332.4 ± 33.9	12.0	304.0 - 360.7			C
EDV 500 mg/kg	8	330.6 ± 41.9	14.8	295.6 - 365.6			C
GB 5 mg/kg	8	393.4 ± 32.6	11.5	366.1 - 420.6		B	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

4.1.3.5. Evaluación de la glucemia a las 4 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) entre los grupos de experimentación a la cuarta hora postratamiento presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, se observa que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 18 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. También se observa diferencia significativa ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 en comparación con las ratas diabéticas del grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No mostró diferencia significativa ($p>0.05$) la media de glucemia del grupo EDV 50 mg/kg p.c. en comparación con el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Asimismo, no mostraron diferencia significativa entre el grupo EDV 250 y el grupo EDV 500, ambos grupos tienen la letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de glucemia con 310.3 mg/dL (IC 95%: 288.7 - 331.8) y 318.0 mg/dL (IC 95%: 288.4 - 347.6) respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 472.9 mg/dL (IC 95: 445.0 - 500.7). Ver tabla 18.

Tabla 18. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 4 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación		
Control -	8	87.4 ± 4.0	1.4	84.1 - 90.7			D
Control +	8	472.9 ± 33.3	11.8	445.0 - 500.7	A		
EDV 50 mg/kg	8	379.0 ±10.5	3.7	370.2 - 387.8		B	
EDV 250 mg/kg	8	310.3 ± 25.8	9.1	288.7 - 331.8			C
EDV 500 mg/kg	8	318.0 ± 35.4	12.5	288.4 - 347.6			C
GB 5 mg/kg	8	371.1 ± 26.5	9.4	348.9 - 393.3		B	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12; asimismo se aplicaron las comparaciones múltiples de las medias de glucemia de cada grupo experimental con respecto a su glucemia posaloxano aplicando la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 4 horas postratamiento. Ver anexo 13.

4.1.3.6. Evaluación de la glucemia a las 6 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) entre los grupos de experimentación a la hora 6 postratamiento presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, mostró que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 19 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. También mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 en comparación con las ratas diabéticas del grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No mostraron diferencia significativa ($p>0.05$) entre el grupo EDV 50 y el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Asimismo, no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre el grupo EDV 250 y el grupo EDV 500, ambos grupos tienen la

letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de glucemia con 293.8 mg/dL (IC 95%: 264.4 - 323.1) y 308.9 mg/dL (IC 95%: 289.0 - 328.7) respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 471.6 mg/dL (IC 95: 435.7 - 507.5). Ver tabla 19.

Tabla 19. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 6 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación			
Control -	8	86.1 ± 4.4	1.6	82.5 - 89.8				D
Control +	8	471.6 ± 42.9	15.2	435.7 - 507.5	A			
EDV 50 mg/kg	8	369.0 ±13.3	4.7	357.9 - 380.1		B		
EDV 250 mg/kg	8	293.8 ± 35.1	12.4	264.4 - 323.1			C	
EDV 500 mg/kg	8	308.9 ± 23.7	8.4	289.0 - 328.7			C	
GB 5 mg/kg	8	355.8 ±27.9	9.9	332.5 - 379.0		B		

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12; asimismo se aplicaron las comparaciones múltiples de las medias de glucemia de cada grupo experimental con respecto a su glucemia posaloxano mediante la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 6 horas postratamiento. Ver anexos 13 y 15.

4.1.3.7. Evaluación de la glucemia a las 24 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) a las 24 horas entre los grupos de experimentación presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, mostró que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 20 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. A las 24 horas mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 en comparación con

las ratas diabéticas del grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No mostró diferencia significativa ($p>0.05$) la media de glucemia del grupo EDV 50 en comparación con el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Asimismo, no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre el grupo EDV 250 y el grupo EDV 500, ambos grupos tienen la letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de glucemia con 341.1 mg/dL (IC 95%: 326.6 - 355.6) y 345.6 mg/dL (IC 95%: 327.7 - 363.5) respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 497.3 mg/dL (IC 95: 475.5 - 519.0). Ver tabla 20.

Tabla 20. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 24 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación			
Control -	8	84.9 ± 2.5	0.9	82.8 - 87.0				D
Control +	8	497.3 ± 26.0	9.2	475.5 - 519.0	A			
EDV 50 mg/kg	8	393.5 ±11.2	3.9	384.2 - 402.8		B		
EDV 250 mg/kg	8	341.1 ± 17.3	6.1	326.6 - 355.6			C	
EDV 500 mg/kg	8	345.6 ± 21.4	7.6	327.7 - 363.5			C	
GB 5 mg/kg	8	397.1 ±23.4	8.3	371.6 – 410.7		B		

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12; asimismo se aplicaron comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 24 horas de tratamiento con respecto a su glucemia posaloxano. Las ratas diabéticas del grupo control positivo mostraron aumento significativo ($p<0.05$) de glucemia a las 24 horas. Ver anexo 14.

4.1.3.8. Evaluación de la glucemia a las 48 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) a las 48 horas entre los grupos de experimentación presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, mostró que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 21 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. A las 48 horas mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 en comparación con las ratas diabéticas del grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No mostraron diferencia significativa ($p>0.05$) el grupo EDV 50 en comparación con el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Así mismo, no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre el grupo EDV 250 y el grupo EDV 500, ambos grupos tienen la letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de glucemia con 292.6 mg/dL (IC 95%: 274.6 - 310.6) y 308.8 mg/dL (IC 95%: 284.3 - 333.2) respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 504.1 mg/dL (IC 95: 484.6 - 523.7). Ver tabla 21.

Tabla 21. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 48 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación		
Control -	8	86.5 ± 5.3	1.9	82.1 - 91.0			D
Control +	8	504.1 ± 20.9	8.3	484.6 - 523.7	A		
EDV 50 mg/kg	8	355.4 ±15.0	5.3	342.9 - 367.9		B	
EDV 250 mg/kg	8	292.6 ± 21.5	7.6	274.6 - 310.6			C
EDV 500 mg/kg	8	308.8 ± 29.2	10.3	284.3 - 333.2			C
GB 5 mg/kg	8	365.8 ±22.4	7.9	347.1 - 384.5		B	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12. Asimismo, se aplicaron comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 48 horas con respecto a la hora 0. Las ratas diabéticas del grupo control positivo mostraron aumento significativo ($p<0.05$) de glucemia las 48 horas con respecto a la hora 0. Ver anexo 14.

4.1.3.9. Evaluación de la glucemia a las 72 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) a las 72 horas entre los grupos de experimentación presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, mostró que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 22 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. A las 72 horas las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) en comparación con las ratas diabéticas del grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No mostró diferencia significativa ($p>0.05$) la media de glucemia del grupo EDV 50 y el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Asimismo, no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre el grupo grupos EDV 250 y el grupo EDV 500, ambos grupos tienen la letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de glucemia con 270.6 mg/dL (IC 95%: 257.0 - 284.3) y 291.4 mg/dL (IC 95%: 270.0 - 312.7 respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 503.9 mg/dL (IC 95: 488.1 - 519.7). Ver tabla 22.

Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12; asimismo se aplicaron comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 72 horas de tratamiento con respecto a la hora 0. Las ratas diabéticas del grupo control

positivo mostraron aumento significativo ($p<0.05$) de glucemia a las 72 horas con respecto a su glucemia posaloxano. Ver anexo 14.

Tabla 22. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 72 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación			
Control -	8	86.8 ± 5.5	1.9	82.2 - 91.3				D
Control +	8	503.9 ± 18.9	6.7	488.1 - 519.7	A			
EDV 50 mg/kg	8	334.6 ±12.4	4.4	324.3 - 345.0		B		
EDV 250 mg/kg	8	270.6 ± 16.4	5.8	257.0 - 284.3			C	
EDV 500 mg/kg	8	291.4 ± 25.6	9.0	270.0 - 312.7			C	
GB 5 mg/kg	8	341.9 ±19.5	6.9	325.6 - 358.2		B		

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

4.1.3.10. Evaluación de la glucemia a las 96 horas postratamiento

El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA (anexo 10), mostró que las medias de las glucemias (mg/dL) a las 96 horas entre los grupos de experimentación presentan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al aplicar la prueba de Tukey, mostró que la media de la glucemia del grupo control negativo difiere significativamente ($p<0.05$) de las medias de glucemia de los demás grupos experimentales, lo cual se muestra en la tabla 23 en donde solo el grupo control negativo en la columna de agrupación tiene la letra D. A las 96 horas mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) las medias de glucemia de los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mg/kg en comparación con las ratas diabéticas del grupo control positivo representada en la columna de agrupación con la letra A. No mostró diferencia significativa ($p>0.05$) la media de glucemia del grupo EDV 50 en comparación con el grupo GB 5, ambos grupos tienen la letra B en la columna de agrupación. Asimismo, hubo diferencia significativa ($p<0.05$) entre el grupo EDV 250 y el grupo EDV 500 ($p<0.05$), ambos grupos tienen la letra C en la columna de agrupación. Ver anexo 11. Siendo los grupos EDV 250 y 500 los que mostraron las medias más bajas de

glucemia con 245.1 mg/dL (IC 95%: 221.3 - 268.9) y 268.3 mg/dL (IC 95%: 251.1 - 285.4) respectivamente. El grupo control positivo mostró la media más alta de glucemia con 499.0 mg/dL (IC 95: 486.6 - 511.4). Ver tabla 23.

Tabla 23. **Comparación de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales a las 96 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación			
Control -	8	88.0 ± 3.1	1.1	85.4 - 90.6				D
Control +	8	499.0 ± 14.9	5.3	486.6 - 511.4	A			
EDV 50 mg/kg	8	306.5 ± 15.3	5.4	293.8 - 319.3		B		
EDV 250 mg/kg	8	245.1 ± 28.5	10.1	221.3 - 268.9			C	
EDV 500 mg/kg	8	268.3 ± 20.5	7.3	251.1 - 285.4			C	
GB 5 mg/kg	8	316.1 ±17.2	6.1	301.8 - 330.5		B		

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó ANOVA de dos factores (tiempo y tratamiento), ver anexo 12; asimismo se aplicaron comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 96 horas de tratamiento con respecto a su glucemia posaloxano. Las ratas diabéticas del grupo control positivo mostraron aumento significativo ($p<0.05$) de glucemia a las 96 horas. Ver anexo 14 y 15.

4.1.3.11. Evaluación de la glucemia durante las 6 horas postratamiento

En la tabla 24 se hallaron los promedios de glucemia con sus respectivas desviaciones estándar de cada uno de los grupos experimentales obtenidos durante las 6 horas postratamiento. Los niveles de glucemia promedio para los grupos controles negativo y positivo fueron de 86.1 mg/dL y 471.6 mg/dL respectivamente, manteniendo los valores de glucemia estables ($p>0.05$) durante este periodo de estudio. Los grupos experimentales tratados con EDV 50, 250, 500 y GB 5 presentaron menores niveles de glucemia en comparación al grupo de ratas diabéticas del control positivo. Así mismo, los grupos que presentaron menores niveles de glucemia fueron los grupos EDV 250 y 500. Ver tabla 24.

Tabla 24. **Niveles de glucemias de los grupos experimentales durante las 6 horas postratamiento.**

Grupo	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	% Red.
Control -	84.8 ± 5.8	87.8 ± 5.1	87.5 ± 5.0	87.4 ± 4.0	86.1 ± 4.4	-1.6
Control +	439.4 ± 24.2	457.0 ± 14.3	465.5 ± 23.8	472.9 ± 33.3	471.6 ± 42.9	-7.3
E.D.V. 50 mg/kg	434.4 ± 16.3	429.3 ± 19.3	398.4 ± 9.3	379.0 ± 10.5	369.0 ± 13.3	15.1
E.D.V. 250 mg/kg	424.3 ± 44.2	400.0 ± 51.6	332.4 ± 33.9	310.3 ± 25.8	293.8 ± 35.1	30.8
E.D.V. 500 mg/kg	411.9 ± 18.8	388.6 ± 58.0	330.6 ± 41.9	318.0 ± 35.4	308.9 ± 23.7	25.0
GB 5 mg/kg	434.6 ± 42.4	416.1 ± 39.3	393.4 ± 32.6	371.1 ± 26.5	355.8 ± 27.9	18.2

Leyenda: EDV: extracto *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12; asimismo se aplicaron comparaciones múltiples de las medias de glucemias (mg/dL) entre los grupos experimentales con respecto al tiempo mediante la prueba de Tukey (anexo 13). Los grupos EDV 50, 250 y 500 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a partir de las 2 horas postratamiento. Las reducciones de glucemia a las 4 y 6 horas postratamiento fueron significativas para todos los grupos con tratamiento.

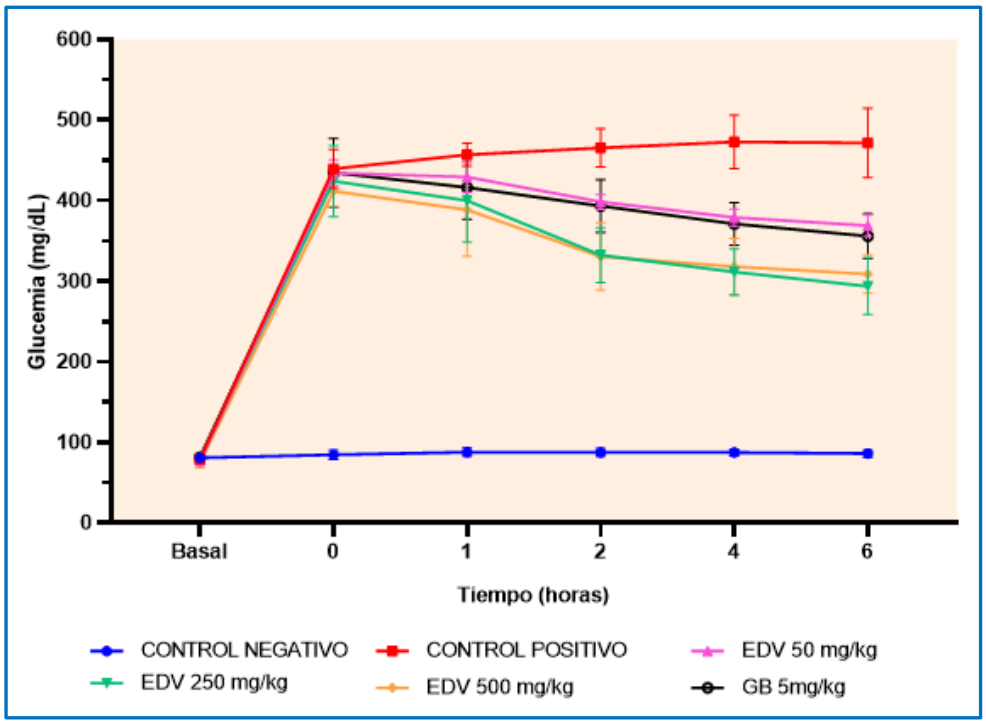


Figura 26. **Evaluación de la glucemia durante las 6 horas postratamiento**
Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; Fuente: elaboración propia.

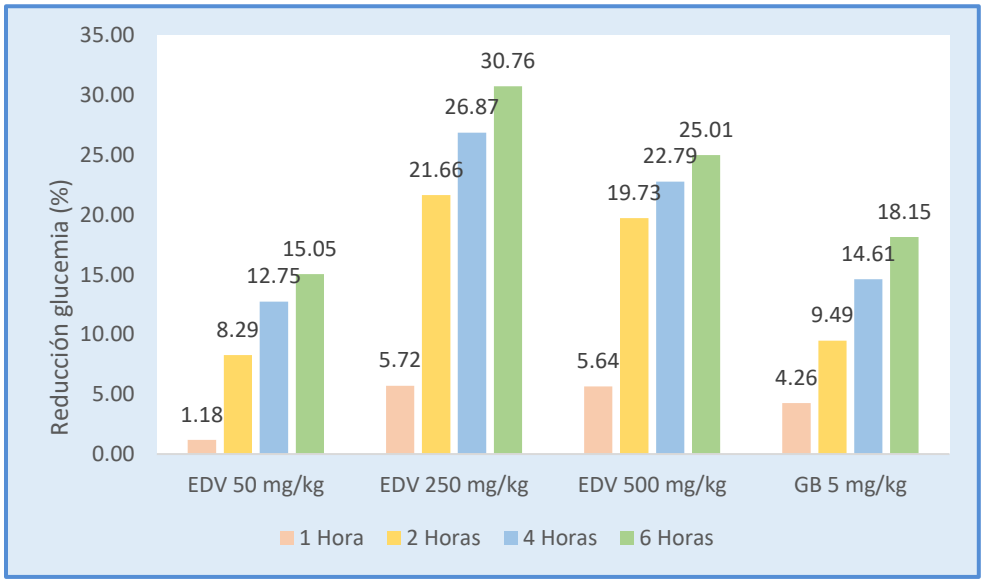


Figura 27. **Reducción de las glucemias (%) durante las 6 horas postratamiento**
Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; Fuente: elaboración propia.

El mayor efecto hipoglucemiante a las 6 horas postratamiento se les confieren a los grupos tratados con EDV 250 y 500 con 30.8 % y 25.0 % respectivamente. El grupo GB 5 presentó un 18.2 % de disminución de glucemia, resultado ligeramente mayor al 15.1 % del grupo tratado con EDV 50. Ver figuras 26 y 27. Cabe resaltar que los resultados de las comparaciones múltiples entre los grupos experimentales con la prueba de Tukey mostraron que no existen diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 250 y 500 durante las 6 horas postratamiento (anexo 13). Asimismo, dicha prueba también mostró que no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre el grupo GB 5 y EDV 50 durante este periodo postratamiento.

4.1.3.12. Evaluación de la glucemia durante las 96 horas postratamiento

Se trabajó con ratas machos Sprague Dawley con peso 240 ± 20 g. Después de las 96 horas postratamiento, los resultados obtenidos indican reducción del peso corporal en las ratas diabéticas sin tratamiento (6.2 %), reducción de peso en las ratas diabéticas tratadas con EDV 50 y GB 5 (0.2 y 1.0 % respectivamente), mientras que las ratas diabéticas tratadas con EDV 250 y 500 se obtuvieron ganancia en el peso corporal (1.3 y 1.1 % respectivamente). Los pesos corporales de los grupos con tratamiento presentaron diferencias significativas ($p<0.05$) a las 96 horas postratamiento en comparación al grupo control positivo (anexo 16).

En la tabla 25 se hallaron los promedios de glucemia con sus respectivas desviaciones estándar de cada uno de los grupos experimentales obtenidos durante las 96 horas postratamiento. Los niveles de glucemia promedio para el grupo control negativo y control positivo fueron de 88.0 y 499.0 mg/dL respectivamente a las 96 horas postratamiento. El nivel de glucemia se mantuvo estable para el grupo control negativo durante todo el periodo de estudio ($p> 0.05$), mientras que el nivel de glucemia para el grupo control positivo fue estable a partir de las 24 horas ($p> 0.05$) hasta el final del periodo de estudio. Los grupos experimentales tratados con EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron menores niveles de glucemia en comparación a las ratas diabéticas del grupo control positivo. Así mismo, los grupos que presentaron menores niveles de glucemia fueron los grupos EDV 250 y 500. Ver tabla 25 y figura 28.

Tabla 25. **Niveles de glucemias de los grupos experimentales durante las 96 horas postratamiento.**

Grupo	0h	24 h	48 h	72 h	96 h	% Red.
Control-	84.8 ± 5.8	84.9 ± 2.5	86.5 ± 5.3	86.8 ± 5.5	88.0 ± 3.1	-3.8
Control +	439.4 ± 24.2	497.3 ± 26.0	504.1 ± 23.4	503.9 ± 18.9	499.0 ± 14.9	-13.6
E.D.V. 50 mg/kg	434.4 ± 16.3	393.5 ± 11.2	355.4 ± 15.0	334.6 ± 12.4	306.5 ± 15.3	29.4
E.D.V. 250 mg/kg	424.3 ± 44.2	341.1 ± 17.3	292.6 ± 21.5	270.6 ± 16.4	245.1 ± 28.5	42.2
E.D.V. 500 mg/kg	411.9 ± 18.8	345.6 ± 21.4	308.8 ± 29.2	291.4 ± 25.6	268.3 ± 20.5	34.9
GB. 5 mg/kg	434.6 ± 42.4	391.1 ± 23.4	365.8 ± 22.4	341.9 ± 19.5	316.1 ± 17.2	27.3

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; Fuente: elaboración propia.

Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), ver anexo 12; asimismo se aplicaron comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Los grupos EDV 50, 250, 500 y GB 5 mostraron reducción significativa ($p<0.05$) de glucemia a las 24 horas y fue continua hasta las 96 horas postratamiento. Ver anexo 14.

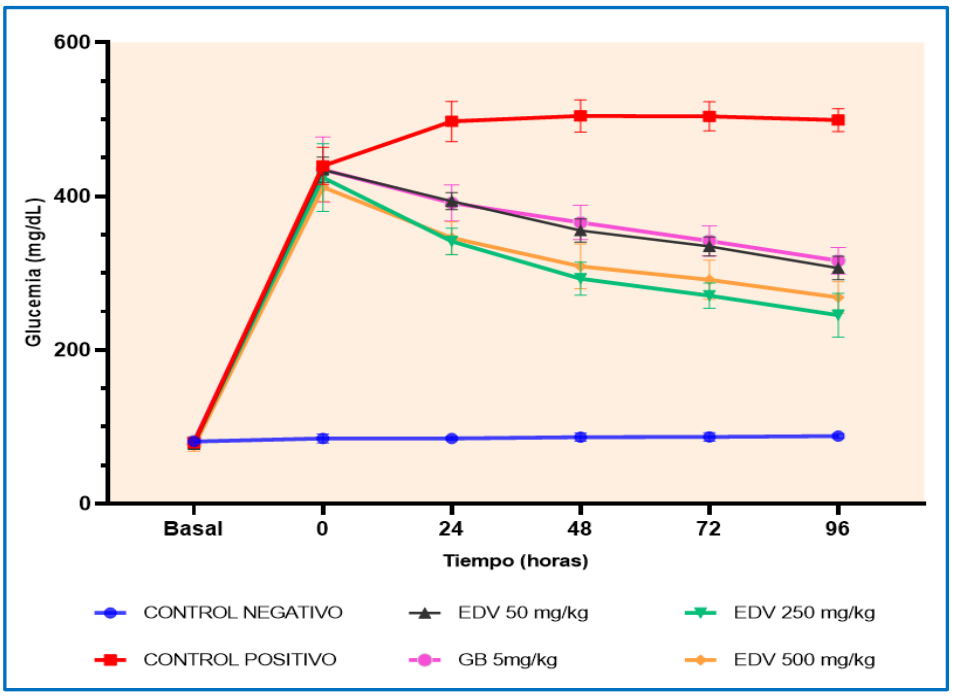


Figura 28. **Evaluación de la glucemia durante las 96 horas postratamiento**
Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida.
Fuente: elaboración propia.

El mayor efecto hipoglucemiante a las 96 horas postratamiento se les confieren a los grupos tratados con EDV 250 y 500 con 42.2 y 34.9 % respectivamente. Los grupos EDV 50 y GB 5 obtuvieron 29.4 y 27.3 % de reducción de glucemia respectivamente. Ver tabla 25 y figura 29.

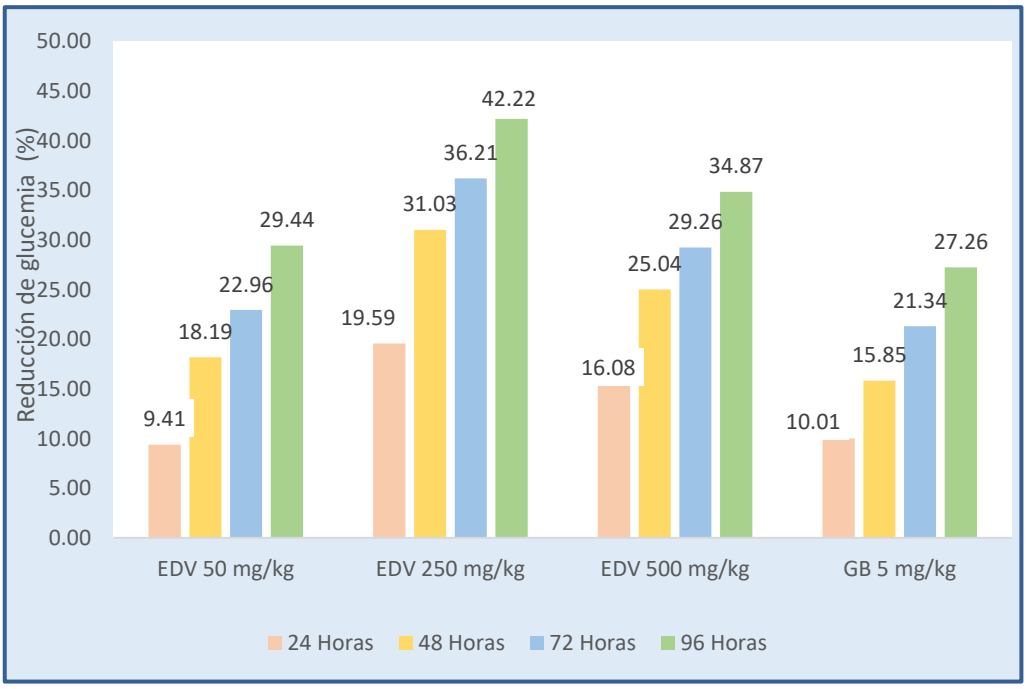


Figura 29. **Reducción de las glucemias (%) durante las 96 horas postratamiento**
Leyenda: EDV: extracto *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; Fuente: elaboración propia.

Al realizar ANOVA de dos factores y comparaciones múltiples (prueba de Tukey), mostraron que no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 250 y 500 durante las 96 horas postratamiento. Así mismo, no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 50 y GB 5 durante las 96 horas postratamiento.

4.1.3.13. Evaluación del área bajo la curva (AUC) de la glucemia durante las 6 horas postratamiento

Se calculó el área bajo la curva (AUC) de glucemia en h.mg/dL mediante la regla de Simpson 1/3 [261] de los grupos experimentales desde el inicio de la administración del tratamiento hasta el final de este periodo de estudio (figura 30), habiéndose controlado la glucemia a la 0, 1, 2, 4 y 6 horas postratamiento. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de normalidad (Shapiro Wilk), homogeneidad de varianza (Levene), ANOVA y la prueba de Tukey. Ver anexos 17, 18, 19 y tabla 26. Se consideró diferencia significativa entre los grupos experimentales, si $p<0.05$.

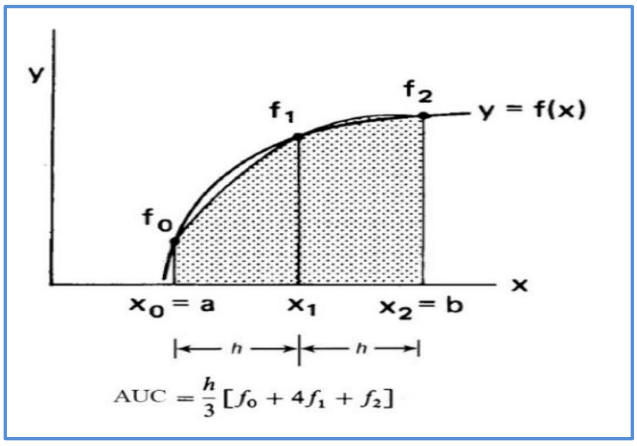


Figura 30**. Gráfica de la regla de Simpson 1/3**: La regla de Simpson es de mayor exactitud y precisión que la regla del trapecio. El número de subintervalos es 2 y de igual magnitud (h). Fuente: adaptado de Nakamura [261]

Tabla 26**. Comparación del área bajo la curva (AUC) de las glucemias entre los grupos experimentales durante las 6 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de glucemia ± SD (mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación		
Control -	8	523.2 ± 14.7	5.2	510.9 - 535.5			D
Control +	8	2796.7 ± 149.8	53.0	2671.5 - 2921.9	A		
EDV 50 mg/kg	8	2372.2 ± 69.3	24.5	2314.2 - 2430.1		B	
EDV 250 mg/kg	8	2030.3 ± 140.4	49.6	1912.9 - 2147.7			C
EDV 500 mg/kg	8	2040.0 ± 211.4	74.8	1863.2 - 2216.8			C
GB 5 mg/kg	8	2319.9 ±180.0	63.7	2169.4 - 2470.4		B	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; Fuente: elaboración propia.

Con la prueba de ANOVA del AUC de glucemia se obtuvo que existe diferencia significativa entre los grupos experimentales de estudio durante las 6 horas postratamiento, ver anexo19.

El grupo que presentó menor AUC de glucemia fue el grupo control negativo con 523.2 ± 14.7 h.mg/dL. El grupo que presentó mayor AUC de glucemia fue el grupo control positivo con 2796.7 ± 149.8 h.mg/dL. Evidenciándose que existe una relación inversamente proporcional entre AUC de glucemia y el efecto hipoglucemiante. Los grupos con tratamiento que presentaron menor AUC son los grupos EDV 250 y EDV 500 con 2030.3 ± 140.4 y 2040.0 ± 211.4 h.mg/dL respectivamente. La prueba de Tukey corroboró que no existe diferencia significa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 250 y EDV 500 durante las 6 horas postratamiento. Asimismo, no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 50 y GB 5 con AUC 2372.2 ± 69.3 y 2319.9 ± 180.0 h.mg/dL respectivamente. Ver tabla 26.

Tabla 27. **Área bajo la curva de las glucemias y los porcentajes de eficacia relativa hipoglucemiante durante las 6 horas postratamiento.**

Tratamientos	Área bajo la curva de glucemia (h.mg/dL)	% Área bajo la curva de glucemia	% Eficacia relativa hipoglucemiante
Control positivo	2796.7	100.0	0
EDV 50 mg/kg	2372.2	84.8	15.2
EDV 250 mg/kg	2030.3	72.6	27.4
EDV 500 mg/kg	2040.0	72.9	27.1
GB 5 mg/kg	2319.9	83.0	17.0

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida.
Fuente: elaboración propia.

Se calculó el área bajo la curva (AUC) de glucemia para cada grupo experimental durante las 6 horas postratamiento. Se expresó en 100 % el AUC de glucemia del grupo control positivo, que fue tomado como referencia para calcular el AUC de glucemia porcentual de los demás grupos con tratamiento. En la tabla 27, se observa que la eficacia relativa hipoglucemiante de EDV 250 y 500 son similares ($p>0.05$) durante las 6 horas postratamiento.

Asimismo, la eficacia relativa hipoglucemiante de EDV 50 y GB 5 son similares (p>0.05) en dicho periodo de estudio.

Eficacia relativa hipoglucemiante (%):

$$\frac{\text{(AUC de glucemia del Control positivo – AUC de glucemia Grupo con tratamiento)}}{\text{AUC de glucemia del Control positivo}} \times 100$$

4.1.3.14. Evaluación del área bajo la curva de la glucemia durante las 96 horas

Se calculó el área bajo la curva (AUC) de glucemia expresado en día.mg/dL durante las 96 horas para cada uno de los grupos experimentales, mediante la regla de Simpson 1/3 compuesto [262, 263] desde el inicio de la administración del tratamiento (tiempo 0) hasta el final del periodo de estudio (figura 31). Los tiempos de control de glucemia fueron cada 24 horas: 0, 24, 48, 72 y 96 horas postratamiento. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de Shapiro Wilk, Levene, ANOVA y la prueba de Tukey. Ver anexos 17, 18, 19 y tabla 28. Se consideró diferencia significativa entre los grupos experimentales, si p<0.05.

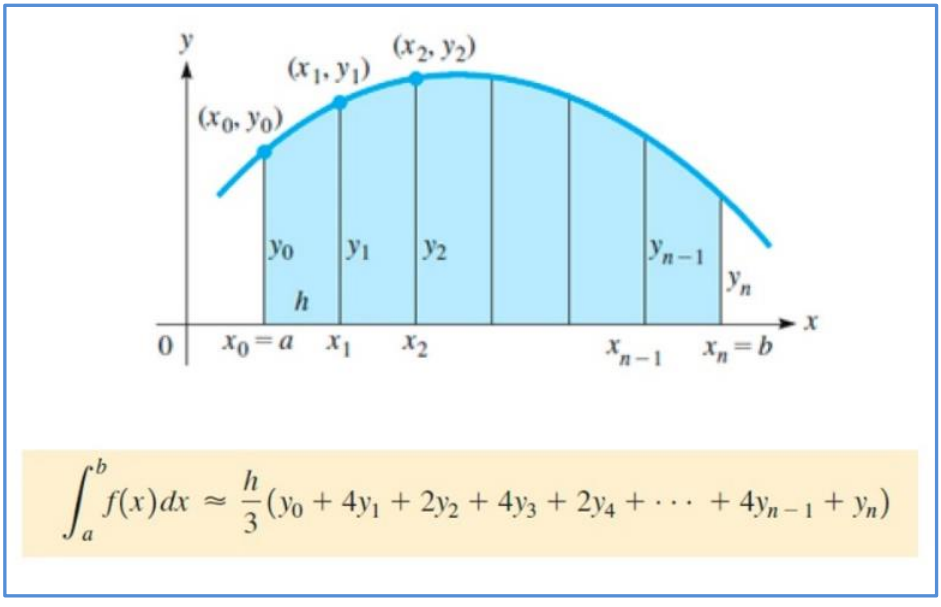


Figura 31. **Gráfica de la regla de Simpson 1/3 compuesto**: El número de subintervalos debe ser par y de igual magnitud (h). De y_0 a y_4, AUC=h/3($y_0 + 4y_1 + 2y_2 + 4y_3 + y_4$).
Fuente: adaptado de Washington & Evan[264]

Tabla 28. **Comparación de AUC de las glucemias entre los grupos experimentales durante las 96 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de AUC de glucemia ± SD (día.mg/dL)	SEM	IC de 95 %	Agrupación		
Control -	8	344.1 ± 11.3	4.0	334.7 – 353.5			D
Control +	8	1984.0 ± 66.8	23.6	1928.1 – 2039.8	A		
EDV 50 mg/kg	8	1454.7 ± 41.1	14.5	1420.4 – 1489.1		B	
EDV 250 mg/kg	8	1233.9 ± 54.4	19.2	1188.4 – 1279.3			C
EDV 500 mg/kg	8	1281.9 ± 84.1	27.4	1211.6 – 1352.1			C
GB 5 mg/kg	8	1471.4 ± 78.9	27.9	1405.4 – 1537.4		B	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Con la prueba de ANOVA del AUC de glucemia se obtuvo que existe diferencia significativa entre los grupos experimentales de estudio durante las 96 horas postratamiento, ver anexo 19.

El grupo que presentó menor AUC de glucemia fue el grupo control negativo con 344.1 ± 11.3 día.mg/dL. El grupo que presentó mayor AUC de glucemia fue el grupo control positivo con 1984.0 ± 66.8 día.mg/dL. Evidenciándose que existe una relación inversamente proporcional entre AUC de glucemia y el efecto hipoglucemiante. Los grupos con tratamiento que presentaron menor AUC son los grupos EDV 250 y EDV 500 con 1233.9 ± 54.4 y 1281.9 ± 84.1 día. mg/dL respectivamente. La prueba de Tukey corroboró que no existe diferencia significa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 250 y EDV 500 durante las 96 horas postratamiento. Asimismo, no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos EDV 50 y GB 5 con AUC 1454.7 ± 41.1 y 1471.4 ± 78.9 día.mg/dL respectivamente. Ver tabla 28.

Tabla 29. **Área bajo la curva de las glucemias y los porcentajes de eficacia relativa hipoglucemiante durante las 96 horas postratamiento.**

Tratamientos	Área bajo la curva de glucemia (día.mg/dL)	% Área bajo la curva de glucemia	% Eficacia relativa hipoglucemiante
Control positivo	1984.0	100.0	0.0
EDV 50 mg/kg	1454.7	73.3	26.7
EDV 250 mg/kg	1233.9	62.2	37.8
EDV 500 mg/kg	1281.9	64.6	35.4
GB 5 mg/kg	1471.4	74.2	25.8

Leyenda: EDV: Extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida.
Fuente: elaboración propia.

Se calculó para cada grupo experimental el área bajo la curva (AUC) de glucemia durante las 96 horas postratamiento. Se expresó en 100 % el AUC de glucemia del grupo control positivo, que fue tomado como referencia para calcular el AUC de glucemia porcentual de los demás grupos con tratamiento. En la tabla 29 se observó que, durante las 96 horas postratamiento, la eficacia relativa hipoglucemiante de los tratamientos con EDV 250 y 500 son similares ($p>0.05$). Asimismo, la eficacia relativa hipoglucemiante de los tratamientos con EDV 50 y GB 5 también son similares ($p>0.05$) en el periodo de estudio.

4.1.4. Estudio histológico del páncreas en ratas diabéticas

En los cortes histológicos de páncreas del grupo de ratas normoglucémicas (control negativo), se observó un tejido pancreático conservado con los acinos glandulares bien formados. Las células de los islotes de Langerhans, alfa, beta y gamma no presentan ninguna alteración en su estructura morfológica. Lesión: (-). Ver anexo 24, figura a.

En los cortes histológicos de páncreas del grupo de ratas con diabetes (inducida con aloxano 130 mg/kg) sin tratamiento (control positivo), se observó el parénquima del páncreas con alteraciones. Ausencia de islotes de Langerhans. Presencia de necrosis. Lesión: (+++). Ver anexo 24, figura b.

En los cortes histológicos de páncreas del grupo de ratas con diabetes (inducida con aloxano 130 mg/kg) que recibieron tratamiento GB 5 mg/kg, se observó el parénquima del páncreas conservado, presencia de islotes de Langerhans con bordes irregulares. Lesión: (++). Ver anexo 24, figura c.

En los cortes histológicos de páncreas del grupo de ratas con diabetes (inducida con aloxano 130 mg/kg) que recibieron tratamiento EDV 50 mg/kg, se observó el parénquima del páncreas conservado, presencia de islotes de Langerhans con bordes irregulares. Lesión: (++). Ver anexo 24, figura d.

En los cortes histológicos de páncreas del grupo de ratas con diabetes (inducida con aloxano 130 mg/kg) que recibieron tratamiento EDV 250 mg/kg, se observó el parénquima conservado del páncreas, presencia de islotes de Langerhans con bordes irregulares. Lesión: (++). Ver anexo 24, figura e.

En los cortes histológicos de páncreas del grupo de ratas con diabetes (inducida con aloxano 130 mg/kg) que recibieron tratamiento EDV 500 mg/kg. Se observa parénquima conservado del páncreas, presencia de islotes de Langerhans con bordes irregulares. Lesión: (++). Ver anexo 24, figura f.

Leyenda:
Lesión: (-) ausente; (+) leve; (++) moderada; (+++) severa; elaboración propia.

4.1.5. Evaluación de la cicatrización

4.1.5.1. Resistencia a la tensión postratamiento en ratas diabéticas

Los resultados de los datos de la resistencia a la tensión mostraron que los grupos EDV 250 y 500 mg/kg p.c. (EDV 250 y 500) obtuvieron mayor resistencia a la tensión en heridas por incisión con 26.3 % y 24.7 % de eficacia respectivamente. Así mismo, los grupos EDV 50 mg/kg p.c. (EDV 50) y GB 5 mg/kg p.c. (GB 5) tuvieron 21.7 % y 21.5 % de eficacia respectivamente. El grupo de ratas normoglucémicas (control negativo) presentó mayor resistencia y se estableció como referencia para calcular la eficacia de cicatrización (%). El grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (control positivo) presentaron menor eficacia relativa que los demás grupos experimentales, ver tabla 30.

Tabla 30. **Resistencias a la tensión a las 96 horas postratamiento en los grupos experimentales.**

Grupo	n	Resistencia (g)	SD	IC95%	Mín.	Máx.	Eficacia Cicatrización (%)
Control negativo	8	985.8	23.7	965.9 – 1005.6	948	1022	100
Control positivo	8	96.1	8.2	89.3 –103.0	86	112	9.7
EDV 50 mg/kg	8	213.9	20.4	196.8 – 230.9	190	252	21.7
EDV 250 mg/kg	8	259.5	17.8	244.6 – 274.4	235	284	26.3
EDV 500 mg/kg	8	243.3	19.8	226.7 – 259.8	208	274	24.7
GB 5 mg/kg	8	212.4	15.2	199.7 – 225.0	196	237	21.5

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; IC: intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Se corroboraron la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos de resistencia a la tensión de los grupos experimentales (anexos 20 y 21). Luego se aplicó la prueba ANOVA y se determinó que hay diferencias significativas ($p<0.05$) entre las medias de las resistencias a la tensión, ver anexo 22. Asimismo, se aplicaron comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey (tabla 31, anexo 23). El grupo control negativo tuvo la mayor resistencia a la tensión ($p<0.05$) en comparación a los demás grupos con tratamiento. El grupo control positivo tuvo la menor resistencia a la tensión ($p<0.05$) que los demás grupos con tratamiento. No hubo diferencia significativa ($p>0.05$) en la resistencia a la tensión entre los

grupos EDV 250 y 500. Así mismo, se mostró que no existe diferencia significativa ($p>0.05$) en la resistencia a la tensión entre los grupos EDV 50 y GB 5.

Tabla 31. **Comparación de las resistencias a la tensión entre los grupos experimentales a las 96 horas postratamiento.**

Grupo	N	Media de resistencia a la tensión ± SD (g)	SEM	Agrupación		
Control -	8	985.8 ± 23.7	8.4	A		
Control +	8	96.1. ± 8.2	2.9			D
EDV 50 mg/kg	8	213.9 ± 20.4	7.2		C	
EDV 250 mg/kg	8	259.5 ± 17.8	6.3	B		
EDV 500 mg/kg	8	243.3 ± 19.8	7.0	B		
GB 5 mg/kg	8	212.4 ± 15.2	5.4		C	

Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; SD: desviación estándar; SEM: error estándar de la media; Fuente: elaboración propia.

4.1.5.2. Correlación de las variables glucemia y resistencia a la tensión

Se verificó la correlación entre resistencia a la tensión y glucemia en el total de ratas de los 6 grupos experimentales. Previamente se utilizó la prueba de Shapiro Wilk ($n<50$) para corroborar la normalidad de los datos bivariados de glucemia y resistencia a la tensión ($n=48$). Se corroboró que los datos bivariados no son normales, por ende, se aplicó la prueba de correlación de Spearman.

Tabla 32. **Correlación de Spearman entre la resistencia a la tensión y la glucemia a las 96 horas postratamiento en los grupos experimentales.**

Tensión	Glucemia			
	n	Rho de Spearman	IC 95 %	p
	48	- 0.955	(-0.978 a -0.912)	0.000

Leyenda: IC: Intervalo de confianza; p: valor de probabilidad; Fuente: elaboración propia.

El coeficiente de correlación rho de Spearman entre la resistencia a la tensión y la glucemia es - 0,955 indica que existe una relación inversa entre estas 2 variables (Tabla 32).

4.1.6. Estudio histológico de heridas incisas en ratas diabéticas

En los cortes histológicos del grupo de ratas normoglucémicas (control negativo), mostraron reepitelización completa, presencia de tejido fibroso, tejido de granulación en escasa cantidad y macrófagos abundantes; lo cual evidencian una cicatrización completa, (++++). Ver anexo 25, figura a.

En los cortes histológicos del grupo de ratas diabéticas (control positivo), mostraron ausencia de los tejidos epitelial y fibroso, presencia de tejido conjuntivo y tejido de granulación en regular cantidad; lo cual evidecian ausencia de la cicatrización, Ver anexo 25, figura b.

En los cortes histológicos del grupo de ratas diabéticas tratado por vía oral con solución de glibenclamida 5 mg/kg, se observó reepitelización incipiente, tejidos conjuntivo y de granulación en regular cantidad, presencia de macrófagos y fibroblastos; encontrándose en vías de cicatrización (fase proliferativa), (++). Ver anexo 25, figura c.

En los cortes histológicos del grupo de ratas diabéticas tratado por vía oral con solución acuosa de EDV 50 mg/kg, se observó reepitelización incipiente, tejido conjuntivo y de granulación abundante, macrófagos abundantes; encontrándose en vías de cicatrización (fase proliferativa), (++). Ver anexo 25, figura d.

En los cortes histológicos del grupo de ratas diabéticas tratado por vía oral con solución acuosa de EDV 250 mg/kg, se observó reepitelización inicial, presencia de tejido conjuntivo en abundante cantidad, tejido de granulación en regular cantidad, fibroblastos abundantes y macrófagos 20; encontrándose en vías de cicatrización (fase proliferativa), (++). Ver anexo 25, figura e.

En los cortes histológicos del grupo de ratas diabéticas tratado por vía oral con solución acuosa de EDV 500 mg/kg, se observó reepitelización inicial, presencia de tejidos conjuntivo y de granulación en regular cantidad, presencia de fibroblastos y macrófagos; encontrándose en vías de cicatrización (fase proliferativa), (++). Ver anexo 25, figura f.

Leyenda: Cicatrización: (-) ausente, (+) inicial, (++) en vías, (+++) moderada, (++++) completa; elaboración propia.

4.2. Discusión de resultados

Las especies del género *Desmodium* como *D. triflorum*, *D. velutinum*, *D. gangeticum*, *D. pulchelum* contienen metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides que ejercen efecto hipoglucemiante en modelos in vitro y en animales de experimentación con diabetes inducida[37,39,41,42,43]; asimismo, se demostró el efecto cicatrizante en las especies *D. triflorum* y *D. molliculum* en modelos in vivo[41,46,47]. Por ello en el presente trabajo, se realizó un modelo in vivo en ratas a las que se indujo diabetes con aloxano y se experimentaron los efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* "pie de perro".

En la literatura se ha reportado, que los efectos biológicos de los extractos de plantas, se deben a la presencia de metabolitos secundarios. En nuestro estudio, hemos realizado el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico seco de *Desmodium vargasianum*, cuyos resultados se muestran en la tabla 7, que concuerdan con otras investigaciones realizadas en plantas de este género, en las que se reportan la caracterización química de flavonoides[23,24,25,26,27,28,29,30,31], taninos[29,58] y alcaloides[28,31,32,56]. Asimismo, en nuestro estudio realizamos el estudio cromatográfico del fraccionamiento de flavonoides; nos centramos en la búsqueda de flavonoides mediante la cromatografía preparativa del eluato MeOH:H2O (60:40) de la fracción n-BuOH separado con resina adsorbente Diaion HP-20, que se muestra en la figura 21; identificamos su presencia basándonos en la relación entre los colores de las manchas y la estructura de los flavonoides según lo reportado por Mabry[250] y como prueba complementaria usamos el reactivo de Neu (2-aminoetil-difenilborinato al 1% en etanol + polietilenglicol 400 al 5 % en etanol), que por los resultados obtenidos mostrados en la figura 20 nos permiten apreciar manchas de color amarillo, lo cual es indicio de presencia de flavonas y flavonoles. Además, con el estudio espectroscópico UV determinamos el número y posición de los sustituyentes en los anillos A y B de los flavonoides. A continuación, discutiremos nuestros resultados con el fin de determinar los flavonoides, que podrían estar presentes en las fracciones obtenidas del extracto de *Desmodium vargasianum*.

La **fracción F1** obtenida mediante cromatografía en capa fina preparativa, Rf: 0.29 ($CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O; 100:11:11:26 v/v), bajo luz UV 365 nm color púrpura, sugiere flavona con 5-OH o flavonol 3OR con 5-OH, a la exposición de vapores

de NH_3 se mantiene el color (4'-OH sustituido o ausente) y al agregar el reactivo de Neu- PEG-400 (UV 365 nm) se obtuvo color amarillo que nos sugiere flavonoide con 4'-OH sustituido o ausente. Estos resultados preliminares nos sugieren 5-OH flavona/ flavonol 3-O-sustituido, con ausencia de 4'-OH libre. Asimismo, el espectro UV presentó dos bandas de absorción máxima, UV^{MeOH} $\lambda_{max\ (nm)}$: 270.35, 345.18, que corresponden a flavonas y flavonoles 3-O-sustituidos mostrados en el anexo 4. Estos resultados indican probable 5-OH flavona/flavonol (3-OR)[250]. Al adicionarse MeONa se produjo desplazamiento batocrómico en la banda I de 55.06 nm, con disminución de la intensidad (anexo 4); este resultado indica ausencia de 2' OH y de 4' OH, se descartó flavonol (3-OR) y presencia de flavona (anexo 4). Basándonos en lo publicado por Mabry et al.[250] y la observación de Markham & Bloor[265], descartamos la presencia de 7-OH ya que al adicionarse MeONa no observamos la aparición de un pico u hombro adicional (banda III) de baja intensidad en el rango de 320-335 nm. Asimismo, al adicionarse $AlCl_3$ se produjo un desplazamiento batocrómico en la banda I de 53.17 nm y luego al adicionarse HCl no hubo cambio (anexo 4), se evidenció la presencia de 5-OH libre y ausencia de hidroxilos en posición orto. La literatura reporta la elucidación de la flavona apigenina-7,4′-dimetiléter-6-C-β-L-ramnopiranosil-(1→2)-xilopiranósido[266], en el cual el máximo de absorción fue de 273 nm en la banda II. Asimismo, Mateska[267] halló que las flavonas luteína-6,8-di-C-glucósido, luteína-6-glucósido y apigenina-6-C-glucósido-8-C-arabinósido presentan máximos de absorción a 270, 269 y 271 nm respectivamente en la banda II. En nuestro estudio, la banda II de la fracción F1 presentó un máximo de absorción a 270.35 nm. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en *D. styracifolium*[59], en el que se elucidaron varias flavonas C-glicosiladas: 6-C-glicopiranosil-8-C-arabinosil apigenina, 6-C-glicopiranosil luteolina, 6-C-glicopiranosil-8-C-xilosil apigenina, 6-C-glicopiranosil-8-C-glicopiranosil apigenina. Por otro lado, Chelin et al.[268] determinaron mediante cromatografía en capa fina, que la flavona shaftósido (apigenina-6-glucósido-8-C-arabinósido) presenta Rf= 0.23 empleando el mismo sistema solvente utilizado por nosotros. Además, en nuestro estudio, se calculó la constante dieléctrica aproximada del sistema solvente empleado, ε= 24.8; la cual es similar a la constante dieléctrica aproximada calculada para el sistema solvente TBA: terbutanol : ácido acético : agua (3 : 1 : 1), ε=23.8, usado por Mabry et al.[250] en la identificación de flavonoides; lo que nos indica similar grado de moderada polaridad, y nos permitió corroborar la presencia de flavonoides C-glicosilados que son de movilidad baja-media que es

concordante con la observación de Markham & Bloor[265] que señalan movilidad baja-media para flavonas glicosiladas; siendo movilidad baja para un rango de Rf = 0 - 0.33 y movilidad media de Rf= 0.33 - 0.66. Por tanto, teniendo en consideración el Rf de la cromatografía en capa fina preparativa, los espectros publicados por Mabry et al.[250] y lo reportado por Markham[253, 265], se propone para la fracción F1 la estructura parcial 6-C-glicósido-8-C-glicósido-3',5',5-trihidroxi-7-metoxi-flavona, mostrado en la figura 36. Por otro lado, en nuestro estudio, la **fracción F2** obtenida mediante cromatografía en capa fina preparativa, Rf: 0.33 ($CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O; 100: 11: 11: 26 v/v), bajo luz UV 365 nm color púrpura, sugiere flavona con 5-OH o flavonol 3OR con 5-OH, a la exposición de vapores de NH_3 se mantiene el color (4'-OH sustituido o ausente) y al agregar el reactivo de Neu- PEG-400 (UV 365 nm) se obtuvo color amarillo que nos sugiere flavonoide con 4'-OH sustituido o ausente. Estos resultados preliminares nos sugieren 5-OH flavona/ flavonol 3-O-sustituido, con ausencia de 4'-OH libre. Asimismo, el espectro UV presentó dos bandas de absorción maxima, UV^{MeOH} $\lambda_{max\ (nm)}$: 271.29, 330.12, que corresponden a flavonas y flavonoles 3-O-sustituidos, mostrados en el anexo 5. Estos resultados indican probable 5-OH flavona/flavonol (3-OR) [250], con ausencia de 4'-OH libre[251]. Al adicionarse MeONa se produjo desplazamiento batocrómico en la banda I (58.35 nm) con disminución de la intensidad, este resultado indica ausencia de 2' OH y de 4' OH, se descartó flavonol (3-OR) y presencia de flavona (anexo 5). Según Markham y Bloor[265] la banda I de flavonas están en el rango λ_{max} 320-355 nm; flavonoles λ_{max} 340-385 nm. Asimismo, al adicionarse $AlCl_3$ no se observaron desplazamientos batocrómicos en las bandas II y I, lo que nos indicaría la ausencia de hidroxilos en posición orto y de 5-OH libre (anexo 5). Mabry et al.[250,] y Markham et al.[253] reportan que la ausencia de desplazamiento batocrómico en la banda I, sugiere la ausencia de 5-OH libre, 5-OH sustituido o posiblemente por presencia del grupo 6-prenil en posición orto a 5-OH libre. Barrón & Ibrahim[269], reportan que las flavonas preniladas son comunes en fabáceas y moráceas, resaltando la frecuencia del sustituyente prenilo en las posiciones 6 y 8; entre ellas destacan las 6 y 8 prenil-apigeninas. Dentro de la Fabáceas, en el género *Desmodium* han sido hallados en: *D. caudatum, D. congestum, D. podocarpum* y *D, renifolium*[270]. Se descartó la presencia del grupo prenilo en el sistema aromático A al consultar los trabajos realizados por Hu et al.[271] y Hossain & Ismail[272] corroborándose que su presencia influye aumentando notoriamente el λ_{max} (nm) del máximo de absorción de la banda I de la flavona en

comparación a flavonas sin el grupo prenilo. De otro lado, Xie et al.[273] elucidaron varias flavonas C-glicósidos como apigenina 6-C-a -L-arabinopiranosil-8-C-b-D-glucopiranósido (iso-shaftósido) y apigenina 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranósido (shaftósido); ambos con máximo de absorción de UV^{MeOH} $\lambda_{max\ (nm)}$ 271 nm en la banda II. Por tanto, se propone para la fracción F2 la estructura parcial 6-C-glicósido-8-C-glicósido-3'-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona, mostrado en la figura 36. Finalmente, en nuestro estudio, la **fracción F3** obtenida mediante cromatografía en capa fina preparativa, Rf: 0.49 ($CH_3COOCH_2CH_3$: H-COOH: CH_3COOH: H_2O; 100: 11: 11: 26 v/v), bajo luz UV 365 nm color púrpura, sugiere flavona con 5-OH libre o flavonol 3OR con 5-OH, a la exposición de vapores de NH_3 se mantiene el color (4'-OH sustituido o ausente) y al agregar el reactivo de Neu- PEG-400 (UV 365 nm) se obtuvo color amarillo, que nos sugiere flavonoide con 4'-OH sustituido o ausente. Estos resultados preliminares nos sugieren 5-OH flavona/ flavonol 3-O-sustituido, con ausencia de 4'-OH libre. Asimismo, el espectro UV presentó dos bandas de absorción máxima, UV^{MeOH} $\lambda_{max\ (nm)}$: 271.63, 330.24, que corresponden a flavonas y flavonoles 3-O-sustituidos, mostrados en el anexo 6. Estos resultados indican probable 5-OH flavona/flavonol (3-OR) [250], con ausencia de 4'-OH libre[253]. Al adicionarse MeONa se produjo desplazamiento batocrómico en la banda I (45.52 nm) con disminución de la intensidad, este resultado nos indica ausencia de 4' OH y de 2' OH (anexo 6); así también se descartó flavonol-3-OR porque hubo disminución en la intensidad. Asimismo, al adicionarse $AlCl_3$ se produjo un pequeño desplazamiento batocrómico en la banda I de 4.11 nm, evidenciándose la ausencia de hidroxilos en posición orto y probable 5-OH libre (anexo 6). En el estudio realizado por Li et al.[274] hallaron en *D. caudatum* tres flavonas C-glicosiladas: swertisina, espinosina, 7-metil-apigenina-6-C-β-glucopiranosil-2"-O-β-*D*-xilopiranosido, con $UV^{MeOH}\lambda_{max\ (nm)}$: 274, 329 nm; 270, 334 nm y 270, 334 nm respectivamente. Además, Wollenweber et al.[275], reportaron que la C-metilación en C-6 puede causar una reacción débil de $AlCl_3$ con 5-0H y carbonilo en C-4, debido al impedimento estérico. Voirin[276] reporta la influencia de C-6 metil del anillo A en flavonas 5-OH con C-7 oxigenadas en el λ_{max} (nm) del máximo de absorción de la banda I correspondiendo el máximo de absorción alrededor de 330 nm con C-4′-OMe. En el estudio de Li et al.[25] aislaron y caracterizaron en *D. oblongum*, 2 flavonoides C-metilados en la posición 6 de las flavonas: 4′-hidroxi-8-isobutiril-7-metoxi-6-metil-flavona y 4′,7-dimetoxi-8-

isobutiril-6-metil-flavona. Por tanto, se propone para la fracción F3 la estructura parcial 8-C-glicósido-5-hidroxi,4′,7-dimetoxi-6-metilflavona, mostrado en la figura 36.

Los compuestos polifenólicos, especialmente los flavonoides, se encuentran entre las clases de compuestos que han recibido la mayor atención con respecto a sus propiedades antidiabéticas[277]. La presencia de la estructura cromona, columna vertebral de muchos flavonoides, es una característica importante relacionado con diversas actividades biológicas[278]. El número total de grupos hidroxilos, la configuración del hidroxilo, el doble enlace en C2-C3 y el grupo funcional cetónico en C-4 son las características esenciales en la manifestación de la bioactividad de los flavonoides, especialmente para el efecto antidiabético[279]. Los flavonoides: 3',5'-dihidroxiflavona; 5,7,8-trihidroxiflavona; 7,3',4'-trihidroxiflavona, 5,6,7,4'-tetrahidroxiflavona, 7,8,3',4'-tetrahidroxiflavona y 7,8,3'-trihidroxiflavona presentaron una actividad antioxidante de 62, 59, 85, 70, 87 y 87 % respectivamente, en relación a la eliminación de radicales libres[280]. Asimismo, apigenina-7-O-metil y ciertas flavonas polimetoxiladas, como 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (sinensetina) tienen actividad antioxidante[281]. La presencia de C-glúcidos en flavonas aumenta su actividad antioxidante[282]. Además, los flavonoides, con presencia de glúcidos en su estructura, mejora la absorción en el intestino delgado[283] y la presencia de grupos metoxilos en el anillo A, en las posiciones C-5 y C-7 favorecen el efecto antiinflamatorio mediante la atenuación de la vía PGE-2-COX-2 por la inhibición de la cascada de activación de la vía NF-kB[284]. Asimismo, los flavonoides, entre los cuales las flavonas con uno o más hidroxilos (como en C-4′ y C-3′,4′) del sistema aromático B tienen actividad inhibidora del cotransportador de sodio y glucosa tipo 1 (SGLT1) y del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT2), con la presencia adicional de C-glúcidos en C-6 y C-8 que incrementa la actividad inhibidora de SGLT2[285,286,287], y por la presencia del doble enlace en C2-C3 y el grupo ceto en C-4 son factores importantes para la actividad inhibidora de la enzima glucógeno fosforilasa[288]. La presencia del grupo metoxilo en C-5 en flavonoides mejora la actividad inhibidora de SGLT2[289]. Finalmente, la presencia de grupos metoxilos en la estructura del flavonoide favorece la biodisponibilidad debido a su menor polaridad[290] y el grupo metoxilo en C-7 en flavonas mejora la actividad antiinflamatoria[291].

En nuestro estudio, la estructura parcial propuesta para la **fracción F1**: 6C-glicósido-8-C-glicósido-3′,5′,5-trihidroxi-7-metoxiflavona (figura 36) presenta el núcleo 2-fenil-cromona y los grupos hidroxilos en las posiciones C-3′ y C-5′que le confiere actividad antioxidante, actividad inhibidora de la enzima glucógeno fosforilasa y actividad inhibidora de SGLT1/SGLT2, con presencia de C-glúcidos en C-6 y C-8 que incrementa la actividad inhibidora de SGLT2, el metoxilo en C-7 mejora la actividad antiinflamatoria. En cuanto a la estructura parcial propuesta para la **fracción F2**: 6-C-glicósido-8-C-glicósido-3′-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona (figura 36) presenta el núcleo 2-fenil-cromona y el grupo hidroxilo en C-3′ que le confiere actividad antioxidante, actividad inhibidora de la enzima glucógeno fosforilasa; la presencia de C-glúcidos en C-6 y C-8 mejoran la actividad antioxidante, el grupo metoxilo en C-5 y los C-glúcidos en C-6 y C-8 mejoran la actividad inhibidora del SGLT2 y los grupos metoxilos en C-5 y C-7 incrementan la actividad antiinflamatoria. Finalmente, la estructura parcial propuesta de la **fracción F3**: 8-C-glicósido-5-hidroxi-4′,7-dimetoxi-6-metilflavona (figura 36) presenta el núcleo 2-fenil-cromona que le confiere actividad inhibidora de la enzima glucógeno fosforilasa y los metoxilos en C4' y C-7 aumentan la actividad antiinflamatoria, la presencia de 8-C-glicósido incrementa dicha actividad.

En la cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría UV-Vis, mostrado en la figura 24, se obtuvo 202.05 ± 1.10 mg QE/g de extracto etanólico de *D. vargasianum*. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, evidenciándose diferentes cantidades de flavonoides totales en especies del género *Desmodium* utilizando el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio, así tenemos que *D. ramosissimum* contienen 193.33 ± 5.77 y 273.33 ± 15.28 mg QE/g de extracto metanólico de planta entera para extractos a concentraciones de 50 y 100 µg/mL respectivamente[292] y *D. gyrans* contiene 70.50 ± 2.00 mg QE/g de extracto metanólico de hojas[293]. Asimismo, en el estudio realizado por Tsai et al., reporta que el contenido de flavonoides en plantas enteras maduras de varias especies de *Desmodium* es variable, hallando mayores concentraciones en *D. microphyllum, D. uncinatum* y *D. sequax* respectivamente con valores de 387.73 ± 11.58 mg RE/g, 203.93 ± 2.93 mg RE/g y 153.32 ± 1.50 mg RE/g de extracto seco respectivamente, y determinaron que existen relaciones significativas entre la cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de dichas especies[294]. Por otro lado, en otras especies de la familia Fabácea, tales como *Bahinea*

variegate contiene 209.23 ± 1.26 mg QE/g de extracto metanólico de corteza[295] y en *Clitoria ternatea* se determinó mayor contenido de flavonoides totales en los extractos metanólicos de hojas, mediante el método de extracción asistida por microondas por 3 minutos con 191.64 ± 1.45 mg QE/g de extracto, seguido del método de Soxhlet por 6 horas con 180.08 ± 0.73 mg QE/g de extracto y maceración por 72 horas con 126.1 ± 0,56 mg QE/g de extracto[296]. En nuestro caso, usamos el método de extracción por maceración por 15 días, lo cual explica la obtención de mayor contenido de flavonoides.

Por lo reportado en la literatura, el contenido de taninos totales en especies vegetales de la familia Fabácea oscilan entre 1.57% - 9.16 % en planta seca[297,298]. El contenido de 2 a 5% de taninos expresado como equivalente en ácido tánico se considera de moderada concentración y a partir de 6% se considera de alta concentración[299]. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en nuestro estudio que fue de 178.50 ± 0,75 mg ATE/g de extracto etanólico seco de hojas de *D. vargasianum,* estimado en 1.80 ± 0,01g ATE/100g de hojas secas; mediante el método por espectrofotometría UV-Vis, mostrado en la figura 25. En otro estudio, de la especie *Desmodium molliculum* se halló también un contenido moderado de taninos totales que fue de 5.17 ± 0,10 g ATE/100g de planta seca[299].

En la cuantificación de alcaloides totales por el método volumétrico, mostrado en la tabla 12, se obtuvo 3.63 ± 0.09 mg de alcaloides totales / g de extracto etanólico, lo cual representa a 0.037% de alcaloides totales expresado en trigonelina en hojas secas. Nuestros resultados fueron similares con la de otras investigaciones, en las que se reportan que en *D. velutinum* se obtuvo 3.61 ± 0.04 mg de alcaloides totales /g de extracto obtenido de la fracción metanólica acuosa de tallos secos[300] y en *D. triflorum* se obtuvo un contenido de 0.01 - 0.015% de alcaloides totales en hojas secas, mediante el método gravimétrico[301].

Con respecto al ensayo de toxicidad aguda oral, el extracto de *D. vargasianum* no evidenció mortalidad ni signos de toxicidad en ratones a dosis límite de 2000 y 5000 mg/kg p.c, lo cual sugiere la seguridad del uso de esta planta medicinal; cuyos valores concuerdan con lo reportado en la literatura, que la dosis letal media en ratones es superior a 2000 mg/kg p.c en el extracto acuoso de hojas de *Desmodium molliculum*[49] y en el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *D. gangeticum*[40]; la dosis letal media en ratones es superior a 5000 mg/kg p.c

en el extracto metanólico de hojas *D. velutinum*[302], inclusive en otro estudio se determinó que la dosis letal media en ratones es superior a 10000 mg/kg p.c. en el extracto de planta entera de *D. triflorum*[303] y con el estudio realizado en el extracto de raíces de *Phyllodium pulchelum* (*Desmodium pulchelum)*[304] se determinó una dosis letal media de 11300 mg/kg p.c, encontrándose una mortalidad de 0, 20, 50, 70 y 100 % respectivamente con dosis de 6000, 8000, 11000, 15000 y 20000 mg/kg respectivamente en grupos de 10 ratones cada uno.

En el estudio del efecto hipoglucemiante, se utilizó aloxano como agente inductor de diabetes, a dosis de 130 mg/kg p.c, que ha sido empleado en varias investigaciones en dosis que varían de 100 a 150 mg/kg p.c. en animales de experimentación aplicando tratamientos que cursan hasta los 15 días [41,43,246], la dosis necesaria de aloxano para inducir diabetes depende de la especie animal, vía de administración y estado nutricional[305]; siendo la dosis de 150 mg/kg, i.p., la que podría inducir rápidamente la diabetes y ser lo suficientemente tóxica para producir mortalidad en las ratas[306]; lo cual ha sido reportado en la literatura, que el aloxano produce lesión pancreática, que es proporcional a la dosis administrada y al tamaño de la lesión[307,308]; debido a la acción tóxica sobre las células beta del páncreas, que implica la oxidación de los grupos sulfhidrilos (-SH), la inhibición de la enzima glucoquinasa, la generación de radicales libres y alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular[307,308]. En nuestro estudio, obtuvimos que las ratas que recibieron tratamiento con los extractos de *D. vargasianum* y glibenclamida, protegieron a los islotes pancreáticos del daño producido por el aloxano, en los cuales se observaron lesiones moderadas en comparación con el grupo control de ratas diabéticas que hay ausencia de islotes y presencia de necrosis, ver anexo 24. Según Kameswara Rao et al., alude la posibilidad de supervivencia de células β en los islotes pancreáticos de ratas con diabetes inducida con aloxano a dosis de 150 mg/kg p.e., que responden al tratamiento con glibenclamida[309], y que ha sido probado la actividad hipoglucemiante de la glibenclamida por varios investigadores en modelos experimentales con inducción de diabetes.

El efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* fue significativo ($p<0.05$) respecto al grupo control de ratas diabéticas, a partir de la segunda hora postratamiento, los grupos de EDV 50, 250 y 500 presentaron reducciones de glucemia de 8.29, 21.66 y 19.73 % respectivamente, ver anexo 13 y figura 27. Nuestros resultados fueron

similares con los obtenidos en el efecto hipoglucemiante con el extracto etanólico de *D. pulchellum*[43] en ratas diabéticas con dosis de aloxano de 120 mg/kg, los grupos que recibieron los extractos de 500 y 1000 mg/kg, a las 3 horas postratamiento, presentaron reducciones de glucemia de 23.5 y 34.0 %.

En la literatura se han reportado estudios, en los que extractos de plantas e incluso con medicamentos como glibenclamida han mostrado que, a mayor tiempo de tratamiento se obtuvieron mayores reducciones de los niveles de glucemia[310,311,312,313], llegando a valores normales después de una semana[313]. La glibenclamida es un hipoglucemiante oral, perteneciente al grupo de las sulfonilúreas, cuyo mecanismo de acción pancreático es aumentar la sensibilidad a la insulina de las células β del páncreas e incrementar la secreción de insulina; asimismo, a nivel extrapancreático reduce la producción hepática de glucosa y aumenta la sensibilidad periférica a la insulina[314]. En nuestro estudio, a las 96 horas de tratamiento con los extractos EDV 50, 250 y 500 se obtuvieron reducciones de glucemia de 29.4, 42.2 y 34.9 % respectivamente; observándose una mejor respuesta a dosis de 250 mg/kg p.c, no habiendo diferencia significativa ($p>0.05$) a dosis de 500 mg/kg p.c., fenómeno de mejor respuesta hipoglucemiante a menor dosis observado en diversas especies de plantas de diferentes familias y géneros[315,316,317]. En la especie *D. gangeticum* se han realizado estudios del efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas con mayor tiempo de tratamiento, que el empleado en nuestro estudio, obteniéndose reducciones de glucemia similares a las que encontramos con menores dosis, tales como el estudio realizado por Bisht et al.[42], con el extracto etanólico de *D. gangeticum* en dosis de 100 mg/kg p.c a los 7 días postratamiento se obtuvo una reducción de glucemia del 21 % y que a las 3 semanas de tratamiento, los valores de glucemia fueron normales; y en el estudio de Govindarajan et al.[40], con el extracto etanólico de *D. gangeticum* en dosis de 200 mg/kg p.c a los 15 días postratamiento se obtuvo una reducción de glucemia del 35 %. Estos resultados nos sugieren que, si se hubiese continuado el experimento con los extractos de *D. vargasianum* por un mayor tiempo, probablemente se hubiese alcanzado valores normales de glucemia, especialmente con los grupos de tratamientos de extracto a dosis de 250 y 500 mg/kg p.c. A pesar de que las glucemias no alcanzaron los niveles basales normales durante las 96 horas de tratamiento, el extracto de hojas de *D. vargasianum* mantuvo en buen estado de salud a las ratas diabéticas durante el tratamiento. Estos animales, al final del experimento, de forma similar que las ratas normales tuvieron tonos y reflejos conservados,

crecimiento de pelaje y buen estado aparente de salud, discreta alteración en el olor de la orina y sin disminución significativa de peso, ver anexo 16; en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento, se observó un compromiso acentuado y progresivo del estado general, caracterizado por apatía, alteraciones en el pelaje, olor fuerte de la orina y disminución significativa de peso, ver anexo 16; atribuido a que la glucosa no es utilizada como fuente de energía, por lo que las reservas de triglicéridos son utilizadas y por tanto hay disminución de peso[318,319].

En la literatura se ha reportado que, los metabolitos secundarios, tales como flavonoides, taninos y alcaloides son recurrentes en las especies del género *Desmodium*, que han demostrado efecto hipoglucemiante, y que actuarían mediante varios mecanismos moleculares: a) **A nivel de la vía metabólica**, las flavonas (apigenina, baicaleína, luteolina, vitexina); flavonoles (kaempferol y rutina), taninos (ácido tánico) mejoran la sensibilidad a la insulina por la vía de señalización IRS/PI3K/AKT al promover la translocación de GLUT4 a la membrana celular y por ende mayor captación de glucosa en los tejidos musculoesquelético, adiposo y hepático[91,106,320,321,322,323,324,325,326,327]. En otro estudio, se encontró que acacetina, luteolina y quercetina inducen la translocación del GLUT4 a través de la activación de la vía AMPK[328,329,330]. Además, otro estudio reporta que flavonas (apigenina y luteolina); flavonoles (kaempferol, quercetina y rutina) y el alcaloide trigonelina regulan la expresión del PPARγ mejorando la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los lipidos[331,332,333,334,335]. Asimismo, en otro estudio se encontró que, las procianidinas triméricas/tetraméricas miembros de la clase de taninos condensados o proantocianidinas, tienen la capacidad de inducir la translocación de GLUT4 mediante la activación de las vías de señalización de sensibilidad a la insulina y de la AMPK[336,337,338,339]. Además, las flavonas (vitexina, isovitexina y apigenina) y el alcaloide estiracifolina actuarían inhibiendo a la proteína fosfatasa tirosina 1B (PTP1B), mejorando la sensibilidad a la insulina[340,341]. Por otro lado, los flavonoides (apigenina, baicaleína, luteolina, kaempferol, quercetina y rutina) regularían el metabolismo de glúcidos mediante el incremento de la actividad de la glucoquinasa, la fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa 3β (GS3Kβ) causando su inactividad catalítica y síntesis de glucógeno a partir de la glucosa 6 fosfato y disminución de la gluconeogénesis en el hígado mediante la inhibición de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (G-6Pasa)[91,325,342,343,344,345,346,347]; los

flavonoides[348,349], taninos[350] y alcaloides[351,352] inhiben las enzimas α-glucosidasa y α-amilasa; los flavonoides inhiben a los cotransportadores de sodio-glucosa (SGLT2/ SGLT1)[285,286], mientras que los taninos inhiben a SGLT1[353]. Además, los flavonoides baicaleína, quercetina y vitexina mejoran la oxidación de ácidos grasos mediante la activación de la vía AMPK, promoviendo la expresión de PPAR-α y la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACC)[354,355,356]. Asimismo, el alcaloide matrina aumenta la oxidación de los ácidos grasos y disminuye los triglicéridos en el hígado, mediante la activación de la proteína hepática HSP72[357]. Así también, los flavonoides como la apigenina, activan la expresión de AMPK/PGC-1α, mejoran la función y biogénesis mitocondrial en el hígado que conlleva al aumento de la oxidación de ácidos grasos y reducción de la gluconeogénesis y lipogénesis y a nivel del músculo esquelético aumentan la captación de glucosa, síntesis de glucógeno y oxidación de ácidos grasos y reducen la glucólisis y la glucogenólisis[358,359]. En otros estudios, se reportaron que los flavonoides (baicaleína, vitexina, luteolina, orientina, quercetina y apigenina), el alcaloide trigonelina y el ácido tánico inhibían la adipogénesis mediante la reducción de la expresión de los factores de transcripción (PPARγ y C/EBPβ)[106,356,360,361,362,363,364,365,366,367]. Además, flavonoides como la luteolina regula la expresión de adiponectina, estimulando la oxidación de ácidos grasos a nivel del hígado y el músculo esquelético mediante la activación de la vía de señalización AMPK; la luteolina y el ácido tánico regulan la expresión de la leptina y actúan como anorexigénico a nivel del hipotálamo[322,367,368,369,370]. b) **A nivel de la vía inflamatoria,** los flavonoides como apigenina inhiben la expresión del factor de transcripción nuclear NF-κB, reducen la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6) y la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bax y caspasa-3)[371,372,373]. Asimismo, la flavona baicaleína inhibe las expresiones de las proteínas TLR4, NF-κB e IκB, reduce la producción de citocinas proinflamatorias (IL1β, IL-6 y TNF-α)[374], mediante el bloqueo de la cinasa IKKβ[368]. Por otro lado, los alcaloides pirrolidínico (estaquidrina)[375] e indólico (hipaforina)[376] disminuyen las citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β y IL-6) mediante la activación de la vía AMPK/SIRT1[375] y por la inhibición de la vía NF-κB[376]. c) **A nivel de la vía antioxidante**, los flavonoides y otros polifenoles tienen la capacidad de eliminar los radicales libres, que se forman durante el estrés oxidativo, inducido por la hiperglucemia y, por lo tanto, retrasan la lipoperoxidación lipídica[377,378]. Además, las flavonas C-glicosiladas (vitexina e isovitexina) y baicaleína activan

la vía de señalización de Nrf2, que conlleva al aumento de la expresión de la respuesta antioxidante[97,379,380]. Por otro lado, los alcaloides por la presencia del anillo fenólico en su estructura le confieren propiedades antioxidantes[381,382,383,384], el alcaloide estaquidrina disminuye el estrés oxidativo mediante la activación de la vía SIRT1/Nrf2[385].

En nuestra investigación, el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *D. vargasianum* en ratas diabéticas estaría dado por sus componentes bioactivos, tales como flavonoides, taninos y alcaloides que podrían estar involucrados en la activación de la sirtuina 1 (SIRT1) e inhibir la vía JAK/STAT3, regulando los niveles de citocinas proinflamatorias tales como TNF-α e IL-6 y reduciendo la apoptosis. Otro mecanismo molecular seria la participación en la activación de la vía de señalización Nrf2, mejorando la expresión de genes antioxidantes. Además, podrían actuar en la vía de señalización IKKβ/NF-kB reduciendo la expresión de genes proinflamatorios y prooxidantes. Por otro lado, las flavonas C-glicosiladas podrían participar en la regulación de la vía AMPK y aumentarían la actividad de la glucoquinasa para aumentar la glucogénesis; reducirían la gluconeogénesis por la inhibición de las enzimas glucosa 6 fosfatasa (G-6Pasa) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK); tienen actividad inhibidora de SGLT2, por ende, disminución en la reabsorción de glucosa a nivel del tubulo proximal del riñón. Además, los flavonoides, taninos y alcaloides del extracto de *D. vargasianum* inhibirían la actividad de las enzimas α-glucosidasa y α-amilasa, por ende, menor absorción de glucosa a nivel intestinal. Asimismo**,** la presencia de taninos en el extracto tendría la capacidad de inhibir las enzimas α-glucosidasa y α-amilasa, así como también actividad inhibidora de SGLT1, por ende, reducción en la absorción de la glucosa a nivel intestinal.

En relación al efecto cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* fue significativo ($p<0.05$) respecto al grupo control de ratas diabéticas, a las 96 horas postratamiento, en la prueba de resistencia a la tensión, se obtuvo que EDV 50, 250, 500 y el fármaco glibenclamida, presentaron eficacias en la cicatrización de 21.7, 26.3, 24.7 y 21.5 % respectivamente (ver tabla 30) y en la evaluación histológica evidenció mayor avance en el proceso de cicatrización en los grupos que recibieron tratamiento (aumento en el número de macrófagos y fibroblastos), en comparación al grupo control de ratas diabéticas sin tratamiento que mostraron ausencia en la cicatrización (ver anexo 25), lo cual demuestra que el extracto

etanólico estimuló el proceso de cicatrización durante la fase proliferativa en ratas diabéticas, ocurriendo en el marco de tiempo adecuado; que concuerda con el estudio realizado por Vidinsky et al.[386] sobre la evaluación histológica del efecto cicatrizante en heridas cutáneas incisas en ratas Sprague Dawley, realizado durante los primeros siete días después de la cirugía, reveló que la regeneración de la epidermis lesionada (reepitelización) se completó cinco días posherida, que la fase inflamatoria culmina entre el día uno y el día dos, el comienzo de la fase proliferativa desde el primer día con pico durante los días cinco y seis, el inicio de la fase de maduración y de remodelación a los seis días posherida. En nuestro estudio, obtuvimos que el extracto de *D. vargasianum* estimuló la infiltración de macrófagos en el entorno de la herida, redujo el período inflamatorio, estimuló la migración de fibroblastos y redujo el período de reepitelización en la etapa proliferativa. Nuestros resultados concuerdan con la de otras investigaciones realizadas en otras especies del género *Desmodium* en las que determinaron el efecto cicatrizante del extracto etanólico a dosis de 200 a 250 mg/kg p.c por vía oral, en modelos de heridas por incisión en ratas diabéticas inducidas con aloxano de 120 mg/kg p.c y ratas normoglucémicas, tales como en las especies *Desmodium triflorum*[41] y *Desmodium triquetrum*[45] obtuvieron que el efecto cicatrizante de los extractos etanólicos fue significativo respecto al control después de 10 días de tratamiento, en la prueba de resistencia a la tensión y una disminución significativa en el período de epitelización; y en el efecto cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*[18] fue significativo respecto al control después de 3 días de tratamiento, en la prueba de resistencia a la tensión, obteniendo eficacias en la cicatrización de 28 % (vía oral) y del 32 % (vía tópica).

Se ha reportado en la literatura, que el efecto cicatrizante de especies del género *Desmodium* es debido a la presencia de metabolitos secundarios entre los cuales flavonoides, taninos y alcaloides que actúan mediante varios mecanismos moleculares: **a) A nivel de la vía inflamatoria**, los flavonoides inhiben la vía de activación del NF-κB, a través de la inhibición de la fosforilación de la proteína inhibidora IκBα[387,388]; regulan el estrés oxidativo en el proceso de cicatrización de heridas en diabéticos[389]. Asimismo, los flavonoides inhiben las enzimas COX-2 y 5-LOX, generadoras de eicosanoides, implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico[390]. Además, flavonoides como baicaleína y quercetina reducen los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1β/TNF-α)[387,389,391], aceleran la cicatrización al aumentar los niveles de VEGF/TGF-β1[387,392]; la quercetina reduce los niveles de PGE-2 y LTB-4[389]. Por

otro lado, los taninos hidrolizables tales como el ácido tánico, inhibe las vías de activación de NF-κB y de p38 MAPK inducidas por la IL-1β, inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β) e inhibe la expresión de enzimas (iNOS, COX-2)[393,394]; acelera la cicatrización de heridas cutáneas mediante la activación de la vía de señalización de ERK ½ [395]. Además, los alcaloides (matrina, bufotenina, estaquidrina e hipaforina) regulan la vía NF-kB y reducen los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β e IL-6)[376,396,397,398,399,400], inhiben la expresión de las enzimas INOs[396,397,400] y COX-2[399,400]. **b) A nivel de la vía antioxidante**, los flavonoides actúan sobre los radicales libres y disminuyen el daño de las células y tejidos[401], el Kaempferol, apigenina y baicaleína aumentaron los niveles de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa[402,403,404]. Asimismo, los flavonoides tales como apigenina, baicaleína, quercetina y vitexina activan la vía Nrf2[403,405,406,407,408]. Así también, la apigenina, baicaleína, rutina y genisteína activan la vía Nrf2 / HO-1[91,408,409,410]. Además, los flavonoides son moduladores de SIRT1 y SIRT3 que son protectores celulares del estrés oxidativo, debido que la falta de sirtuina 3 (SIRT3) reduce el suministro de sangre, inhibe la expresión del VEGF, promueve la producción de superóxido, deteriora la capacidad antioxidante total [411,412]. Por otro lado, el ácido tánico incrementa los niveles de Nrf2, mejorando el proceso de cicatrización[413], y alcaloides tales como matrina y trigonelina reducen el estrés oxidativo mediante el aumento de los niveles de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y disminución de la malondialdehido[414,415].

En nuestra investigación el efecto cicatrizante de los metabolitos presentes en el extracto de *D. vargasianum* tales como flavonoides, taninos y alcaloides, podrían actuar mediante la inhibición de factores de transcripción proinflamatorios sensibles a redox tales como NF-κB y STAT3. Asimismo, los flavonoides actuarían sobre el metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas; por lo cual disminuiría la respuesta inflamatoria y mejoraría la cicatrización. Otro mecanismo sería la activación de la vía Nrf2 y aumentaría la expresión de la respuesta antioxidante. Además, la presencia de flavonas C-glicosiladas en el extracto, contribuirían en la captación de radicales libres, evitando daños oxidativos a nivel celular.

4.3. Pruebas de hipótesis

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar los efectos hipoglucemiante y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro" en ratas diabéticas, para ello previamente se indujo diabetes con aloxano a dosis de 130 mg/kg p.c y en un período de 48 horas se estabilizara la hiperglucemia; por tanto teníamos que probar la hipótesis de que el extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro" tendrá los efectos hipoglucemiante y cicatrizante en ratas diabéticas. En base a estudios anteriores, reportados en la bibliografía del género *Desmodium* para el efecto hipoglucemiante[40,41,42,43], efecto cicatrizante[41,45] y por los resultados obtenidos en la evaluación de toxicidad aguda oral del presente estudio se probaron los tratamientos a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg p.c del extracto etanólico.

Para probar la hipótesis específica, que el extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro" tendrá efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas, se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad (ver anexo 8) y la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianzas de los datos de los grupos experimentales (ver anexo 9). Posteriormente, se aplicó ANOVA de un factor para determinar si hay diferencias entre las medias de las glucemias de los grupos experimentales en los períodos estudiados (6 y 96 horas), ver anexo 10. También se aplicó ANOVA de dos factores para determinar si hay diferencia entre las medias de las glucemias a diferentes tiempos en los periodos estudiados. Ver anexo 12. Luego, se aplicó comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey, ver anexos 11, 13 y 14. Finalmente se realizó la prueba del AUC de glucemia aplicando el análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey, ver tablas 26-29. Se obtuvo que, los grupos EDV 50, 250 y 500 presentaron reducciones significativas de glucemia ($p < 0.05$) con respecto al control positivo y al tiempo basal hiperglucemiante; mientras que en la prueba del AUC de glucemia se obtuvo que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre EDV 250 y EDV 500; así también no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre EDV 50 y GB 5. Por tanto, el extracto etanólico de *D. vargasianum* a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg p.c. tiene efecto hipoglucemiante en ratas machos cepa Sprague Dawley con diabetes inducida con aloxano, cuando fue comparado con el grupo de ratas diabéticas no tratadas, obteniéndose reducciones

de glucemia de 29.4, 42.2 y 34.9% respectivamente a las 96 horas postratamiento, ver figura 29.

Para probar la hipótesis específica, que el extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro" tendrá efecto cicatrizante en ratas diabéticas, se aplicaron las pruebas de Shapiro Wilk y de Levene a los datos obtenidos en la prueba del efecto cicatrizante del extracto etanólico de los grupos experimentales (ver anexo 20). Posteriormente, se aplicó ANOVA de un factor para determinar si hay diferencias entre las medias de las resistencias a la tensión (g) de los grupos experimentales de ratas diabéticas a las 96 horas postratamiento, ver anexo 22. Asimismo, se aplicó comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey, ver anexo 23. Se obtuvo que, al comparar las resistencias a la tensión entre los grupos, se halló que el grupo control de ratas hiperglucémicas, mostró menor resistencia a la tensión que los grupos con tratamiento, siendo estos resultados significativos ($p<0.01$), no hubo diferencia significativa ($p>0.01$) en la resistencia a la tensión entre los grupos EDV 250 y 500, ni tampoco entre los grupos EDV 50 y GB 5. Por tanto, el extracto etanólico de *D. vargasianum* a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg p.c. tiene efecto cicatrizante en ratas machos cepa Sprague Dawley con diabetes inducida con aloxano, cuando fue comparado con el grupo de ratas diabéticas no tratadas.

CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *D. vargasianum* contiene principalmente flavonoides, taninos y alcaloides.

2. En el extracto etanólico se determinó la presencia de flavonas C-glicosiladas.

3. El extracto etanólico tiene un contenido de flavonoides de 202.1 ± 1.1 mg QE/g y de taninos de 178.5 ± 0.8 mg ATE/g.

4. La dosis límite del extracto etanólico fue superior a 5000 mg/kg, sin evidenciarse toxicidad en ratones, los cuales no presentaron signos clínicos de toxicidad ni alteraciones en el examen macroscópico.

5. Bajo las condiciones experimentales del estudio, se demostró que el extracto etanólico de *D. vargasianum,* administrado por vía oral, presenta efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas, siendo más efectivas las dosis de 250 y 500 mg/kg.

6. Bajo las condiciones experimentales del estudio, se demostró que el extracto etanólico de *D. vargasianum,* administrado por vía oral, presenta efecto cicatrizante en ratas diabéticas con lesiones incisionales cutáneas, confirmado mediante el estudio histopatológico, siendo más efectivas las dosis de 250 y 500 mg/kg.

RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización estructural de fitoquímicos mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución.

- Realizar el estudio del efecto hipoglucemiante con variedades de *Desmodium vargasianum* del norte, centro y sur del Perú.

- Realizar estudios para el desarrollo de una formulación farmacéutica con proyección a estudios clínicos en personas con diabetes mellitus tipo II.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. “Las 10 principales causas de defunción” [Internet], consultado el [15-04-2023]. Publicado el 9 de diciembre del 2020. Disponible en https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.

2. Klein R, Klein S. Relation of glycemic control to diabetic complications and health outcomes. Diabetes Care. 1998; 21(3): C39-C43.

3. Organización Mundial de la Salud. “Diabetes. Datos y cifras” [Internet], consultado el [15-04-2024]. Publicado el 5 de abril del 2023. Disponible en https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes.

4. Organización Mundial de la Salud. “Obesidad y diabetes. Datos y cifras” [Internet], consultado el [15-04-2024]. Publicado el 1 de marzo del 2024. Disponible en https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.

5. Gould LJ, Fulton AT. Wound Healing in Older Adults. *Rhode Island Medical Journal*. 2016; 99(2): 34-6.

6. Natarajan S, Williamson D, Stiltz AJ, Harding K. Advances in wound care and healing technology. Am J Clin Dermatol. 2000; 1: 269- 75.

7. Edwards H, Finlayson K, Courtney M, Graves N, Gibb M, Parker C. Health service pathways for patients with chronic leg ulcers: identifying effective pathways for facilitation of evidence based wound care. BMC Health Serv Res. 2013; 13(1): 86. https://doi.org/10.1186/1472-6963-13-86.

8. Hopman WM, Harrison MB, Coo H, Friedberg E, Buchanan M, VanDenKerkhof EG. Associations between chronic disease, age and physical and mental health status. Chronic Dis Can. 2009; 29(3):108–16.

9. Narayan S, Sasmal D, Mazumder PM. Evaluation of the wound healing effect of herbal ointment formulated with salvia splendens (scarlet sage). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2011; 3(3): 195-9.

10. Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles, 2017. Lima-Perú. INEI; 2018.

11. American Diabetes Association (2018). Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. 2018;41(1): S73–S85. DOI: 10.2337/dc18-S008.

12. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics by Brunton L., Hilal-Dandan R., Knollmann B., editors. 13th Edition. McGraw-Hill Education; 2018.

13. Organización Mundial de la Salud. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional y complementaria (2014-2023). OMS; 2013.

14. Mostacero J. Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004. [Tesis de Doctorado], Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 2005.

15. De la Torre L, Navarrete H, Muriel M, Macía M, Balslev. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador; 2008.

16. Pastor G. Estudio morfo-histológico y microhistoquímico de *Desmodium vargasianum* Schubert. [Tesis de Bachiller]. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 1987.

17. Miranda M (1991). Estudio fitoquímico de la especie *Desmodium vargasianum* Schubert "pie de perro". [Tesis de Bachiller]. Trujillo. -Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 1991.

18. Lozano N, Bonilla P, Arroyo J, Arias G, Córdova A, Baldoceda F. Evaluación fitoquímica y actividad biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. (Manayupa). Ciencia e investigación. 2001; 4(2): 37-44.

19. Álvarez OM, Carpio M. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. (manayupa) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. [Tesis de Título Profesional]. Lima-Perú. Universidad María Auxiliadora; 2020.

20. Del Águila AA & Cadenillas M. Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Aloysia citriodora* Palau, *Annona muricata* L. y *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis de Título Profesional]. Lambayeque-Perú. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2019.

21. Olivera NC, Príncipe P. Extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (kunth) D.C. y su efecto antibacteriano sobre cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro. [Tesis de Título Profesional]. Lima-Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018.

22. Acero-Carrión B, Millones-Sánchez E, Ticona-Rebagliati DI, Torres-Bravo L. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* en el modelo murino de asma. Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana. 2012; 17(2): 62-7.

23. Ha LM, Phuong NT, Hung LN, Ha VTH, Anh BK, Long PQ. Some glycosides isolated from *Desmodium gangeticum* (L) DC. of Vietnam. Vietnam Journal of Science and Technology. 2018; 56 (2A): 99-103.

24. Tsafack BT, Ponou BK, Teponno RB, Nono RN, Jenett-Siems K, Melzig MF, et al. Integracide K: A New Tetracyclic Triterpenoid from *Desmodium uncinatum* (Jacq.) DC. (Fabaceae). Natural Product Sciences. 2017; 23(2): 113-8.

25. Li YP, Hu QF, Rao GX (2017). Three new C-alkylated flavonoids from *Desmodium oblongum*. Journal of Asian Natural Products Research. 2017; 19(10): 954-9. DOI: 10.1080/10286020.2017.1285910.

26. Dat NT, Luyen NT, Dang NH. Phenolic glucosides from the leaves of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. Vietnam. Journal of Chemistry. 2015; 53(2e): 69-72. *DOI: 10.15625/0866-7144.2015-2e-016.*

27. Wu JN, Ma GX, Li HL, Wu CM, Tan YF, Zhang TT, et al. Chemical Constituents with Antihyperlipidemic Activities from *Desmodium triquetrum*. Chinese Herbal Medicines. 2014; 6(4): 324-7.

28. Lu WJ, Lu GS, Tan X, Chen JY, Huang ZF. Chemical constituents of *Desmodium caudatum* In Cai ZY. Journal of Chinese Medicinal Materials. 2013; 36(12): 1953-6.

29. Muanda F, Soulimani R, Dicko A. Study on biological activities and chemical composition of extracts from *Desmodium adscendens* leaves. Journal of Natural Products. 2011; 4: 100-7.

30. Nirajan A & Tewari SK. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Desmodium gangeticum* (Linn.) DC. Natural Product Radiance. 2008; 7(1): 35-9.

31. Yang JS, Su YL, Wang YL. Studies on the chemical constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. In Bao YX. Acta Pharmaceutica Sinica. 1993; 28(3): 197-201.

32. Gopalakrishnan S, Rajameena R. GC-MS Analysis of some bioactive constituents of the leaves of *Desmodium gyrans DC*. International Research Journal of Pharmacy. 2012; 3 (8): 271- 4.

33. Kubo T, Hamada S, Nohara T, Wang ZR, Hirayama H, et al. Study on the Constituents of *Desmodium styracifolium*. Chem. Pharm Bull. 1989; 37(8): 2229-31.

34. Alexander-Lindo RL, Porter RBR, Nwokocha. Lattibeaudiere KG. The phytochemical and pharmacological screening of three crude extracts of *Desmodium canum* (strong back). Clinical Phitoscience. 2020; 6(1): 1-9.

35. Bussmann RW, Sharon D, Pérez F, Diaz D, Ford T, Rasheed T, Barocio Y, et al. Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. Arnaldoa. 2008; 15(1): 127 - 48.

36. Charles MC, Oleba OE, Obedeten KE, Obono ES. Antinociceptive Properties of *Desmodium adscendens* in Mice. J. Med. Pharm. Sci. 2016; 2 (4): 79-85.

37. Ramkumar K, Anton Smith. A, Vishwanath BA, Venkatesan N. Antidiabetic Activity of Phenolic Compounds from *Desmodium triflorum* Leaves in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2020; 62(2): 31-6.

38. Ramkumar K, Anton Smith A, Vishwanath BA, Venkatesan N. In-vitro Anti-Diabetic Activity of Ethanolic Extract of the Medicinal Plants *Desmodium triflorum*, *Allmonia nodiflora* and *Digeria muricata*. International Journal of sciences. 2020; 9(10): 12-6.

39. Ozougwu V.E.O, Akubain B.O. In vitro Inhibition of Carbohydrate Metabolizing Enzymes and in vivo Anti-hyperglycaemic Potential of Methanol Extract of *Desmodium velutinum* Leaves. Res. J. Med. Plants. 2018; 12(1): 48-56.

40. Govindarajan R, Asare-Anane H, Persaud S, Jones P, Houghton P. Effect of *Desmodium gangeticum* extract on blood glucose in rats and on insulin secretion in vitro. Planta Med. 2007; 73: 427-32.

41. Ramadas M. Evaluation of anti-diabetic and wound healing properties of *Desmodium triflorum* herb. [Dissertation for master's degree]. Karnataka, Bengalore Rajiv Gandhi University of health of sciences; 2011.

42. Bisht R, Bhattacharya S. Effect of various extracts of *Desmodium gangeticum* on Streptozotocin nicotinamide induced type-2 diabetes. Asian Journal of Plant Science and Research. 2013; 3(3): 28-34.

43. Noor S, Abdur Rahman SM, Ahmed Z, Das A, Monir Hossain MD. Evaluation of anti-inflammatory and antidiabetic activity of ethanolic extracts of *Desmodium pulchellum* Benth. (Fabaceae) barks on albino Wistar rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013; 3(7): 48-51. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3709.

44. Gopalakrishnan S and Rajameena R. Evaluation of Ethanolic Extract of *Desmodium gyrans* DC Leaves on Wound Healing Activity in Rats. Pharmaceut Anal Acta. 2012; 3(7): 1-5. DOI: 10.4172/2153-2435.1000169.

45. Shirwaikar A, Jahagirdar S, Udupa AL. Wound Healing Activity of *Desmodium triquetrum* Leaves. Indian J. Pharm. Sel. 2003; 65(5): 461-64.

46. Aguilar A. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Desmodium molliculum* (HBK) D.C. "manayupa". [Tesis de Título Profesional]. Huamanga-Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2018.

47. Jain V, Prasad V, Pandey RS. Wound Healing Activity of *Desmodium gangeticum* in Different Wound Models. Journal of Plant Sciences. 2010;5 (3): 328-34.

48. Poma RI. Evaluación in vivo del efecto antiinflamatorio en ratas albinas cepa Holtzman y el efecto analgésico en ratones albinos del extracto etanólico de hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (manayupa). [Tesis de Título Profesional]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.

49. Gordillo G, Bonilla P, Zúñiga H, Parreño J, Guerra G, Hernández L, et al. Efecto protector del *Desmodium molliculum* EAM (manayupa) en ratas con toxicidad hepática inducida por naproxeno. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2019; 4(3): 76-82.

50. Acaro-Chuquicaña FE. Efecto anticonceptivo y postcoital del extracto etanólico de las hojas del *Desmodium molliculum* (HBK). DC "manayupa" en ratas hembras Holtzmann. Revista ECIPerú. 2013; 9(2): 33-41.

51. Malpica R. Influencia del extracto seco *Desmodium vargasianum* Schubert en inflamación aguda experimental en *Rattus rattus*. [Tesis de Bachiller]. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 1991.

52. Organización Mundial de la Salud. WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine 2019. OMS; 2019. Disponible en: https://iris.who.int/handle/10665/312342.

53. Organización Mundial de la Salud. The Global Diabetes Compact [Internet]. Ginebra: OMS; 2021. Disponible en: https://www.who.int/initiatives/the-who-global-diabetes-compact.

54. Díaz VP. El concepto de ciencia como sistema, el positivismo, neopositivismo y las "investigaciones cuantitativas y cualitativas". Salud Uninorte. 2014; 1: 227-44.

55. Padrón J. Tendencias Epistemológicas de la Investigación Científica en el Siglo XXI. Cinta Moebio. 2007; 28: 1-32.

56. Zhi KK, Yang ZD, Shi DF, Yao XJ, Wang MG. Desmodeleganine, a new alkaloid from the leaves of *Desmodium elegans* as a potential monoamine oxidase inhibitor. Fitoterapia. 2014; 98, 160-165. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.07.022.

57. Li C, Zhang Q, Huang Z, Chen Q, Yao R. Chemical constituents of *Desmodium sambuense*. In Zhi ZZ. China Journal of Chinese Materia Medica. 2010;35(18):2420-3.

58. Nkwocha CC, Ogugofor MO, Chukwuma IF, Njoku OU. Identification and characterization of phytochemicals and constituents in *Desmodium velutinum* stem using high-performance liquid chromatography (HPLC). Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine. 2022; 3: 1-6.

59. Li XL, Wang H, Liu G, Zhang XQ, Ye WC, Zhao SX. Study on chemical constituents from *Desmodium styracifolium*. In Cai ZY. Journal of Chinese Medicinal Materials. 2007; 30(7):802-5.

60. Barreto D, Bonilla P. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de hojas de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. (manayupa). Ciencia e Investigación. 2017; 20(1): 3-8.

61. Zavaleta R. Estudio comparativo del efecto cicatrizante de gel a base de *Desmodium molliculum* (pie de perro) al 4%, 8% y 12% en herida inducida de mucosa palatina en *oryctolagus cuniculus* (conejo). Universidad Católica los Angeles Chimbote, (Tesis de Licenciatura), Trujillo-Perú; 2018.

62. Ohashi H, Ohashi K. Desmodieae. En Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M (eds.). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens. Kew, Richmond; 2005. p. 433-46.

63. Martinez PL. Caracterización de la explotación bovina en el distrito de Río Negro-Junín. [Tesis de licenciatura]. Satipo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2011.

64. Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue (ORAS-CONHU). Plantas medicinales de la subregión andina. Lima: 2014; 204 p.

65. Schubert BG. *Desmodium*. En JF. Macbride. Flora of Peru. Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser. 1943;13(3/1): 413-39.

66. Sagástegui A. Manual de malezas de la costa nor peruana. Universidad Nacional de Trujillo. 1973; 480 p.

67. Cerna LA. Ciencia y tecnología de malezas. Fondo Editorial de la Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo; 2013. 429 p.

68. Viera. Etnobotánica de las especies del monte ribereño en el río Chira, Sullana. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional de Piura; 2015. 126 p.

69. Loja B. Contribución al estudio florístico de la provincia de Concepción (Junín): dicotiledóneas. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002. 136 p.

70. Jørgensen P, Nee MH, Beck SG (eds.). Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia. In: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 2013; 127: 1-1741.

71. Jørgensen PM, León-Yánes S (eds.). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. In Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden Press. 1999; 75: 1-1181.

72. Brako L, Zarucchi LJ. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. St. Louis, U.S.A.: Missouri Botanical Garden;1993.1286 p.

73. Groom A. *Desmodium vargasianum*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2012. https://www.iucnredlist.org/species/19892511/20066402. 2015.

74. Gupta. Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador and Peru. 2006. Disponible en: https://repositorio.promperu.gob.pe/items/c75cd752-bcce-45a0-9e53-913c19689da1.

75. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian journal of pharmaceutical sciences. 2018; 13:12-23.

76. Lewandowska H, Kalinowska M, Lewandowski W, Stępkowski TM, Brzóska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. J Nutr Biochem. 2016; 32:1-19. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.006.

77. Viskupičová J, Ondrejovič M, Šturdík E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. J Food Nutr Res. 2008; 47(4): 151–62.

78. Ma XQ, Zheng CJ, Hu CL, Rahman K, Qin, LP. The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in chinese medicine phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 2011; 138:314-32. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.053.

79. Sasaki H, Shibata H, Imabayashi K, Takaishi Y, Kashiwada Y. Prenylated flavonoids from the stems and leaves of *Desmodium caudatum* and evaluation of their inhibitory activity against the film-forming growth of Zygosaccharomyces rouxii F51. J Agric Food Chem.2014; 62(27):6345-53. DOI: 10.1021/jf5020439.

80. Sieniawska E. Activities of Tannins-From In Vitro Studies to Clinical Trials. Nat Prod Commun. 2015; 10(11):1877-84.

81. Hagerman AE. The tannin handbook. Ohio: Miami University; 2011.

82. Hoda M, Hemaiswarya S, Doble M. Role of phenolic phytochemicals in diabetes management phenolic phytochemicals and diabetes. Springer Nature Singapore; 2019.

83. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int. 2011; 50(3):586-621. DOI: 10.1002/anie.201000044.

84. Haslam E. Gallic acid its metabolites. En Hemingway R, Laks P (Eds.), Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance (p. 169-194). Springer Science+Business Media New York; 1992.

85. Dey P, Kundu A, Kumar A, Gupta M, Lee BM, Bhakta T, et al. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). En Sanches A, Fazel S, Saeedi M, Mohammad S (Eds.), Recent advances in natural products analysis (p. 505-67). Elsevier Inc; 2020.

86. López PM, Garzón P, Wisocka W, Maiztegui B, lzugaray M, Del Zotto H, et al. Quinolizidine alkaloids isolated from Lupinus species enhance insulin secretion. European Journal of Pharmacology. 2004; 504(1-2): 139-42.

87. Wiedemann M, Gurrola-Díaz CM, Vargas-Guerrero B, Wink M, García-López PM, Düfer M. Lupanine. Improves Glucose Homeostasis by Influencing KATP Channels and Insulin Gene Expression. Molecules. 2015; 20(10):19085-100. DOI: 10.3390/molecules201019085.

88. Huang Y, Li X, Zhang X, Tang J. Oxymatrine Ameliorates Memory Impairment in Diabetic Rats by Regulating Oxidative Stress and Apoptosis: Involvement of NOX2/NOX4. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020; 20: 1-15.

89. Buckingham J, Baggalei K, Roberts A, Szabó L. Ed. Dictionary of alkaloids. Taylor & Francis Group; 2010.

90. Jaiswal N, Maurya CK, Venkateswarlu K, Sukanya P, Srivastava AK, Narender T, et al. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. Eur J Nutr. 2012; 51:893–8. DOI 10.1007/s00394-012-0374-9.

91. Miao L, Zhang H, Cheong MS, Zhong R, Garcia-Oliveira P, Prieto MA, et al. Anti-diabetic potential of apigenin, luteolin, and baicalein via partially activating PI3K/Akt/Glut-4 signaling pathways in insulin-resistant HepG2 cells. Food Science and Human Wellness.2023; 12(6): 1991-2000.

92. Abdulai IL, Kwofie SK, Gbewonyo WS, Boison D, Puplampu JB, Adinortey MB. Multitargeted Effects of Vitexin and Isovitexin on Diabetes Mellitus and Its Complications. Scientific World Journal. 2021; 1-20. DOI: 10.1155/2021/6641128.

93. Yang Y, Chen Z, Zhao X, Xie H, Du L, Gao H, et al. Mechanisms of Kaempferol in the treatment of diabetes: A comprehensive and latest review. Front Endocrinol. 2022; 1-15. DOI: 10.3389/fendo.2022.990299.

94. Al-Ishaq RK, Abotaleb M, Kubatka P, Kajo K, Büsselberg D. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. Biomolecules. 2019; 9(430): 1-35. DOI: 10.3390/biom9090430.

95. Li K, Yao F, Xue Q, Fan H, Yang L, Li X, et al. Inhibitory effects against α-glucosidase and α-amylase of the flavonoids-rich extract from Scutellaria baicalensis shoots and interpretation of structure-activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method. Chem Cent J. 2018;12(82):1-15. DOI: 10.1186/s13065-018-0445-y.

96. Nguyen-Ngoc H, Nguyen-Thi-Thu T, Vo-Thi KA, Nguyen-Huu T, Tran-Dai L, Vu HD, et al. Chemical constituents of *Desmodium triflorum* and their antifungal activity against various phytopathogenic fungi. Z Naturforsch C J Biosci. 2022; 78(5-6):179-87. DOI: 10.1515/znc-2022-0048.

97. Ganesan K, Ramkumar KM, Xu B. Vitexin restores pancreatic β-cell function and insulin signaling through Nrf2 and NF-κB signaling pathways. Eur J Pharmacol. 2020; 888:1-10. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173606.

98. De Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, et al. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of Kaempferol-3,7-*O*-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. J. Nat. Prod. 2004; 67: 829-32.

99. Zang Y, Sato H, Higarashi K. Antidiabetic effects of a kaempferol glycoside-rich fraction from unripe soybean (Edamame, *Glicine max L. Merill* "Jindai") leaves on KK-A mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011; 75(9): 1677-84.

100. Narváez-Mastache JM, Garduño-Ramírez ML, Alvarez L, Guillermo Delgado. Antihyperglycemic Activity and Chemical Constituents of *Eysenhardtia platycarpa.* J. Nat. Prod. 2006; 69: 1687-91.

101. Wu F, Jin Z, Jin J. Hypoglycemic effects of glabridin, a polyphenolic flavonoid from licorice, in an animal model of diabetes mellitus. Molecular medicine reports. 2013; 7: 1278-82.

102. Hanganu D, Vlase L, Olah N, Phytochemical analysis of isoflavons from some fabaceae species extracts. Not. bot. hort. agrobot. Cluj. 2010; 38 (1): 57-60.

103. Ahmed QU, Ali AHM, Mukhtar S, Alsharif MA, Parveen H, Sabere ASM, et al. Medicinal Potential of Isoflavonoids: Polyphenols That May Cure Diabetes. Molecules. 2020; 25:1-19. DOI: 10.3390/molecules2523549.

104. El-Kordy EA, Alshahrani AM. Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic β-cells of streptozotocin-induced diabetic rats: Histological and immunohisto chemical study. Journal of Microscopy and Ultrastructure. 2015; 63:1-12.

105. Wu K, Liang T, Duan X, Xu L, Zhang K, Li R. Anti-diabetic effects of puerarin, isolated from Pueraria lobata (Willd.), on streptozotocin-diabetogenic mice through promoting insulin expression and ameliorating metabolic function. Food Chem Toxicol. 2013; 341-7. DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.077.

106. Liu X, Kim JK, Li Y, Li J, Liu F, Chen X. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1. Cells. J Nutr. DOI 135(2): 165-71.

107. Türkan F, Taslimi P, Saltan FZ. Tannic acid as a natural antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease. J Biochem Mol Toxicol. 2019; 33(8): e22340. DOI: 10.1002/jbt.22340.

108. Ueda H, Tachibana Y, Moriyasu1 M, Kawanishi K, Alves SM. Aldose reductase inhibitors from the fruits of Caesalpinia ferrea Mart.Phytomedicine. 2001; 8(5): 377-81.

109. Daisy P, Balasubramanian K, Rajalakshmi M, Eliza J & Selvaraj J. Insulin mimetic impact of Catechin isolated from Cassia fistula on the glucose oxidation and molecular

mechanisms of glucose up take on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Phytomedicine. 2010; 17: 28–36.

110. Ahmad F, Khalid P, Khan MM, Rastogi AK, Kidwai JR. Insulin like activity in (-) epicatechin. Acta Diabetol Lat. 1989; 26(4):291-300. DOI: 10.1007/BF02624640.

111. Manickam M, Ramanathan M, Jahromi MA, Chansouria JPN & Ray AB. Antihyperglycemic Activity of Phenolics from *Pterocarpus marsupium*. J. Nat. Prod. 1997; 60: 609-610.

112. Sen S, Roy M & Chakraborti AS. Ameliorative effects of glycyrrhizin on streptozotocin-induced diabetes in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011; 63: 287–296.

113. Krenisky JM, Luo J, Reed MJ, Carney JR. Isolation and antihiperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a Peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. Biol. Pharm. Bull. 1999; 22(10): 1137-40.

114. Seo E, Lee EK, Lee CS, Chun KH, Lee MY, Jun HS. *Psoralea corylifolia* L. seed extract ameliorates streptozotocin-induced diabetes in mice by inhibition of oxidative stress. Oxid Med Cell Longev. 2014;1-9. DOI: 10.1155/2014/897296.

115. Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, et al. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. Diabetes.1998; 47(2):206-10. DOI: 10.2337/diab.47.2.206.

116. Tamrakar AK, Jaiswala N, Yadavb PP, Mauryab R, Srivastavaa AK. Pongamol from Pongamia pinnata stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells. Molecular and Cellular Endocrinology. 2011; 98– 104.

117. Fort DM, Rao K, Jolad SD, Luo J, Carlson TJ, King SR. Antihyperglycemic activity of Teramnus labialis (Fabaceae). Phytomedicine. 2000; 6(6):465-7. DOI: 10.1016/S0944-7113(00)80075-6

118. Bates S, Jones R & Bailey C. Insulin-like efect of pinitol. British Journal of Pharmacology. 2000; 130(8): 1944-8.

119. Saldanha LL, Quintiliano A, Marcourt L, de Paula NA, Ponce PM, Nejad S, et al. Hypoglycemic active principles from the leaves of Bauhinia holophylla: Comprehensive phytochemical characterization and in vivo activity profile. PLoS ONE. 2021;16(9): 1-20. DOI 10.1371/journal.pone.0258016.

120. De Fronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med 1999; 131(4): 281-303.

121. Katzung B. Farmacología básica y clínica. 14° edición. McGraw Hill; 2019.

122. Goday Arno A, Franch Nadal J. Criterios y pautas de terapia combinada en la diabetes tipo 2. Documento de consenso de la Sociedad Española de Diabetes y de la Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria. Endocrinología y Nutrición. 2001; 48(3): 82-97.

123. Adams M & Holland N. Farmacología para enfermería. Un enfoque fisiopatológico. 2° Edición. Pearson; 2009.

124. American Diabetes Association Profesional Practice Committe. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: Standar of Care in Diabetes-2024. Diabetes Care. 2024; 47(1): S20-S42. DOI:10.2337/dc24-S002.

125. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2014; 37(1): S81-S90. DOI: 10.2337/dc14-S081.

126. Schleicher E, Gerdes C, Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Freckmann G, Heinemann L, Nauck M, Landgraf R. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2022 Sep;130(S 01): S1-S8. DOI: 10.1055/a-1624-2897.

127. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. Am J Ther. 2005;12(6):580-91. DOI: 10.1097/01.mjt.0000178767.67857.63.

128. Husain AN, Vincent MT. Type 1 Diabetes Mellitus. Diabet Care. 2007; 15: 787-89.

129. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet. 2014; 383: 69-82.

130. Li S, Zhang M, Tian H, Liu Z, Yin X, Xi B. Preterm birth and risk of type 1 and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. Obes Rev. 2014 ;15(10):804-11. DOI: 10.1111/obr.12214.

131. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. Clin Chem. 2011;57(2):176-85. DOI: 10.1373/clinchem.2010.148221.

132. Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. Diabetes Metab Syndr. 2019;13(1):364-72. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.10.008.

133. Ozougwu, J., Obimba, K., Belonwu, C. and Unakalamba, C. The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. Journal of Physiology and Pathophysiology. 2013; 4:46-57. DOI: 10.5897/JPAP2013.0001.

134. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. Clin Transl Immunology. 2020; 9(3): e1122. DOI: 10.1002/cti2.1122.

135. Tomita T. J. Apoptosis of pancreatic β-cells in type 1 diabetes: The role of Caspase-3 in β-cell apoptosis Pediatr Pediatr Med. 2018**;** 2(1): 14-27.

136. Mcllwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5(4): a008656. DOI: 10.1101/cshperspect. a008656.

137. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Dis Primers. 2017; 3:17016. DOI: 10.1038/nrdp.2017.16

138. Boucher J, Kleinridders A, Kahn RC. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014; 6(1):1-23. DOI:10.1101/cshperspect.a009191.

139. IDF [International Diabetes Federation]. Atlas de Diabetes de la FID. Octave Edition. IDF; 2017.

140. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 2000;106(4): 473-81.

141. Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. Rev Edu Bioq. 2008; 27: 9-18.

142. Hubbard SR. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5(3): a008946. DOI: 10.1101/cshperspect. a008946.

143. Kido Y, Nakae J, Accili D. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. Clinical Review. 2001; 86 (3): 972-9.

144. Draznin B. Perspectives in Diabetes Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85: The Two Sides of a Coin. Diabetes. 2006; 55(8): 2392-7.

145. White MF. Insulin signaling in health and disease. Science. 2003:302 (5651): 1710-11. DOI: 10.1126/science.1092952.

146. Sesti G (2006). Pathophysiology of insulin resistance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2006; 20: 665-79.

147. Rhodes, C.J. Type-2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? Science. 2005; 307: 380-4.

148. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type-2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003; 52: 581-7.

149. Senn, J.J., Klover, P.J., Nowak, I.A., Mooney, R.A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. Diabetes. 2002; 51: 3391-9. DOI: 10.2337/diabetes.51.12.3391.

150. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. J. Biol. Chem. 2003; 278: 13740-6. DOI: 10.1074/jbc.M210689200.

151. Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. International Journal of Endocrinology. 2015; 508409:1-9. DOI 10.1155/2015/508409.

152. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. The Journal of Clinical Investigation. 2003;112(12):1796-1808. DOI: 10.1172/JCI19246.

153. Xu H, Barnes G, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation. 2003; 112(12): 1821-30. DOI: 10.1172/JCI19451.

154. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest. 2006;116(11):3015-25. DOI: 10.1172/JCI28898.

155. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. Diabetes. 2008; 57(10): 2595-602. DOI: 10.2337/db08-0038.

156. Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, Ould Hamouda H, Riffault L, Taouis M. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. Diabetes. 2013; 62(1):102-14. DOI: 10.2337/db12-0237.

157. Agredano LT., Segura M., Guadalupe Trinidad Zavala GT., Jiménez LF. El retículo endoplásmico. En Jiménez LF. & Merchant H. Biología Celular y Molecular. México: Pearson Educación; 2003. p. 411-44.

158. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. Diabetes. 2009; 58(3): 693-700. DOI: 10.2337/db08-1220.

159. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell. 2010;140(6):900-17. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.034.

160. Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. Cell Metab. 2012; 15(5):623-34. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.03.007.

161. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2. diabetes. Science. 2004;306(5695):457-61. DOI: 10.1126/science.1103160.

162. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. Cell Tissue Res. 2009; 335(1):165-89. DOI: 10.1007/s00441-008-0685-6.

163. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2008; 7(12):1013-30. DOI: 10.1038/nrd2755.

164. Caspersen C, Pedersen PS, Treiman M. The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein. J Biol Chem. 2000; 275(29):22363-72. DOI: 10.1074/jbc.M001569200.

165. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002; 82(1): 47-95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.

166. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2010; 12(4):537-77. DOI: 10.1089/ars.2009.2531.

167. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Dubinin MV. Diabetes Mellitus, Mitochondrial Dysfunction and Ca^{2+}-Dependent Permeability Transition Pore. Int J Mol Sci. 2020; 21(18):6559. DOI: 10.3390/ijms21186559.

168. Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2011; 8(2):92-103. DOI: 10.1038/nrendo.2011.138.

169. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Science. 2005; 307(5708):384-7. DOI: 10.1126/science.1104343.

170. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. J Clin Invest. 2003; 112(12):1788-90. DOI: 10.1172/JCI20501.

171. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, et al. Uncoupling Protein-2 Negatively Regulates Insulin Secretion and is a Major Link Between Obesity, β Cell Dysfunction, and Type 2 Diabetes. Cell. 2001;105: 745–55.

172. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 2006; 212(2):167-78. DOI: 10.1016/j.taap.2006.01.003.

173. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, DeFronzo RA, et al. Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects with Type 2 Diabetes and Correlate with the Severity of Insulin Resistance. Diabetes. 2009; 58: 337-43.

174. Chavez JA, Summers SA. A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. Cell Metabolism. 2012; 15: 585-94. DOI 10.1016/j.cmet.2012.04.002.

175. Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid–induced ceramide biosynthesis in mice. J Clin Invest. 2011; 121(5): 1858–70. DOI:10.1172/JCI43378.

176. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids. The Journal of Biological Chemistry. 2003; 278(12): 10297–303.

177. Sokolowska E, Blachnio-Zabielska A. El papel de las ceramidas en la resistencia a la insulina. Frontiers in endocrinology. 2019; 10(577):1-13. DOI: 10.3389/fendo.2019.00577.

178. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010; 375(9733):2267-77. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60408-4.

179. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic. complications. Nature. 2001; 414: 813-20.

180. Thakur R, Jain N, Pathak R, Sandhu SS. Practices in Wound Healing Studies of Plants. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2011; 1-17. doi:10.1155/2011/438056.

181. Venes D, editor. Taber's Cyclopedic Medical Dictionary. 23° edition. Philadelphia: Davies Company; 2017. p. 2541.

182. Anderson DM, editor. Dorland's Illustrated Medical Dictionary. 32° edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p 2083.

183. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. World J Surg. 2004; 8(3):321-6. DOI: 10.1007/s00268-003-7397-6.

184. Broughton G, Jefrey E. The Basic Science of Wound Healing. Plast. Reconstr. Surg. 2006;117(7): 12S-34S.

185. Martin P. Wound healing–aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997; 276(5309): 75–81. DOI: 10.1126/science.276.5309.75.

186. Rodrigues M, Kosaric N, Bonhan C, Gurtner G. Wound Healing: A Celular Perspective. Physiol. Rev. 2017; 99: 665-706.

187. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Curr Probl Surg. 2001; 38: 72-140.

188. López-Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. Rev Esp Cardiol Supl. 2013; 13(B): 2-7. DOI: 10.1016/S1131-3587(13)70073-6.

189. Siljander P, Munnix I, Smethurst P, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand W, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. Blood. 2004; 103(4): 1333- 41.

190. Ruggeri Z.M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation Thrombosis Research. 2007; 120(1): S5–S9.

191. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28(3):403-12. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.150474.

192. Mann KG. Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. Thromb. and Haemost. 1999; 82(2): 165-174.

193. Martinuzzo M. Fisiología de la hemostasia normal. Hematología. 2017; 21: 31-42.

194. Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2010; 8(8): 1670-4. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03893.

195. Shuklaa S, Sharmaa A, Guptab V, Yashavarddhan MH. Pharmacological control of inflammation in wound healing. Journal of Tissue Viability. 2019; 28(4): 218-22.

196. Schultz GS, Chin GA, Wer LM. Principles of Wound Healing. En Robert Fitridge R & Thompson M. Mechanisms of Vascular Disease. University of Adelaide Press; 2011. p. 423-50.

197. Whitte M, Barbul A. Generals Principles of Wound Healing. Surgical Clinics of North America. 1997; 77(3): 509-17.

198. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. Adv Skin Wound Care. 2004; 17(1): 24-35. DOI: 10.1097/00129334-200401000-00012.

199. Holloway S, Harding K, Stechmiller JK, Schultz G. Acute and Chronic Wound Healing in Baranoski S, Ayello EA. Wound Care Esentials. 4ta edición. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 82-98.

200. Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 821–52.

201. Granger DN, Kvietys P. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. Redox Biology. 2015; 6: 524–51. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.020.

202. Koh T, DiPietro L. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Rev Mol Med. 2011; 13(E23):1-14. DOI: 10.1017/S1462399411001943.

203. Brown EJ. Phagocytosis. Bioessays. 1995; 17(2):109-17. DOI: 10.1002/bies.950170206.

204. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999; 341(10):738-46. DOI: 10.1056/NEJM199909023411006.

205. Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Investigation. 1987; 79: 319-26.

206. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. J Int Med Res. 2009; 37(5): 1528-42. DOI: 10.1177/147323000903700531.

207. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. Eur Surg Res. 2017; 58: 81–94. DOI: 10.1159/000454919.

208. Ng MF. The role of mast cells in wound healing. Int Wound J. 2010; 7(1):55-61. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2009.00651.x.

209. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. Clin Dermatol. 1994;12(1):157-69. DOI: 10.1016/0738-081x(94)90266-6.

210. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. Microsc Res Tech. 2003; 60(1):107-14. DOI: 10.1002/jemt.10249.

211. Bhushan M, Young HS, Brenchley PE, Griffiths CE. Recent advances in cutaneous angiogenesis. Br J Dermatol. 2002; 147(3): 418–25.

212. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. J Leukoc Biol. 2001; 70: 478-90.

213. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. Nat Biotechnol.2001;19:1029-34.

214. Goldberg S, Diegelmann R. Wound Healing Primer. Surg Clin North Am. 2010; 90(6): 1133 - 46. DOI: 10.1016/j.suc.2010.08.003.

215. Jimenez PA, Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. J Surg Res.1999; 81(2):238-42. DOI: 10.1006/jsre.1998.5501.

216. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. Surg Clin North Am.2017; 97(1):189-207. doi: 10.1016/j.suc.2016.08.013.

217. Wong ME, Hollinger JO, Pinero, G. J. Integrated processes responsible for soft tissue healing. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 1996; 82: 475–92.

218. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. Physiol Rev. 2003; 83(3): 837.

219. Teller P, White TK. The Physiology of Wound Healing. Surg Clin N Am. 2009; 89: 599-610. DOI: 10.1016/j.suc.2009.03.006.

220. Franz MG. Wound healing. En Doherty G, editor. Current diagnosis & treatment. Surgery. 14° Edition. Mc Graw Hill; 2015. p. 62-74.

221. Orgill D, Demling RH. Current concepts and approaches to wound healing. Crit Care Med. 1988; 16(9): 899-908. DOI: 10.1097/00003246-198809000-00016.

222. Diegelmann R, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. Plastic Reconstructive Surgery. 1981; 68(1): 107-13.

223. Leong M, Murphy KD, Phillips LG. Wound. Healing. En Towsen CM, Evers BM, Beauchamp R.D. Mattox K.L. editors. Sabiston Texbook of Surgery: The Biologycal Basis of Modern Surgical Practice.18° edition. Phyladelphya: Elsevier; 2017. p. 141.

224. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. Open Biol. 2020; 10(9):200223. DOI: 10.1098/rsob.200223.

225. Nethi K, Das S, Patra CR, Mukherjee MS. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications Susheel. Biomater. Sci. 2019; 7: 2652–74. DOI:10.1039/C9BM00423H.

226. Khan M. The influence of diabetes on wound healing. The Diabetic Foot 2005; 8(3): 144-53.

227. Sibbald G, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2008; Suppl 1: S25-30. DOI: 10.1002/dmrr.847.

228. Dong J, Chen L, Zhang Y, Jayaswal N, Mezghani I, Zhang W, et al. Mastocitos en diabetes y cicatrización de heridas diabéticas. Adv Ther. 2020; 37: 4519–37. DOI: 10.1007/s12325-020-01499-4.

229. Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifer, Frank S. Large and Sustained induction of chemokines during ompaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prologed persintence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. The Journal of investigative dermatology. 2000; 115(2): 245-53.

230. Gianino E, Miller C, Gilmore J. Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. Bioengineering. 2018; 5(3): 51. DOI: 10.3390/bioengineering5030051.

231. Zhang Y, McClain SA, Lee HM, Elburki MS, Yu H, Gu Y, et al. A Novel Chemically Modified Curcumin (Normalizes) Wound-Healing in Rats with Experimentally Induced Type I Diabetes: Initial Studies. Journal of Diabetes Research. 2016; 2016:5782904. DOI: 10.1155/2016/5782904.

232. Dinh T, Elder S, Veves A (2011). Delayed wound healing in diabetes: considering future treatments. Diabetes Manage. 2011; 1(5): 509–19.

233. Greenhalgh D. Wound healing and diabetes mellitus. Clin Plastic Surg. 2003; *30*, 37–45.

234. USP 40-NF 35. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Ed. 40. 2017; (1): 465, 885.

235. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2a ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.

236. Agrawal SS, Talele GS. Bioactivity guided isolation and characterization of the phytoconstituents from the Tridax procumbens. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn. 2011; 21(1): 58-62.

237. Esmaeili AK, Taha RM, Mohajer S & Behrooz Banisalam B. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). BioMed Research International. 2015; 2015:643285. Doi.org/10.1155/2015/643285.

238. Cui HX, Zhang LS, Yan HG, Yuan K, Jin SH. Constituents of Flavonoids from *Tridax procumbens* L. and Antioxidant Activity. Pharmacognosy Magazine. 2020; 16 (67): 201-5.

239. Fu Y, Zua Y, Liu W, Efferth T, Zhang N, Liu X, et al. Optimization of luteolin separation from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves by macroporous resins. Journal of Chromatography A. 2006; 1137(2): 145-52.

240. Li C, Zheng Y, Wang X, Feng S & Di D. Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea L*. (olive) leaves using macroporous resin. J Sci Food Agric. 2011; 91: 2826-34.

241. Yu YB. The Effective Preparation of Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* GEORGI by Diaion HP-20 Resin. *Korean J. Plant Res*. 2014; 27(6):635-41 http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2014.27.6.635.

242. Lock O, Cabello I, Doroteo V. Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú [online]. 2006 [accesada el 01 de diciembre del 2006]. Disponible en: http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/. 14.

243. Lastra H, Rodríguez E, Ponce de León H, González ML. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Rev Cubana Plant Med. 2000; 5(1): 17-22.

244. Cabello I, Shironoshita M, Lock O. Protocolo para el control de calidad de la sangre de grado. Revista de Química Pontificia Universidad Católica del Perú.1998; 12 (2): 21-30.

245. OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. París; 2008.

246. Kameswara Rao B., Kesavulu M.M., Appa Rao C. Antidiabetic and hypolipidemic effects of Momordica cymbalaria Hook. fruit powder in alloxan-diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 67: 103–9.

247. Vaisberg AJ, Milla M, Planas MC, Cordova JL, De Agusti ER, Ferreyra R, et al. Taspine is the Cicatriz ant Principle in Sangre de Grado Extracted from Croton lechleri. Planta Medica. 1989; 55: 140-3.

248. Ley N° 30407. Ley de Protección y Bienestar Animal. Diario El Peruano. [Internet]; 2016. Disponible: www.leyes.congreso.gob.pe/Documentos/Leyes/30407.pdf.

249. National Academy of Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition. 2011.

250. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids. Heidelberg: Springer; 1970.

251. Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. En Harbone JB, editor. Methods in plant biochemistry, volumen 1: plant phenolics. San Diego: Academic Press INC; 1989. p. 197-235.

252. Moore W. The Use of an Approximate Dielectric Constant to Blend Solvent Systems. Journal of the American Pharmaceutical Association.1958; 47(12): 855-7.

253. Markham KR & Mabry TJ. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. En Harbone JB Mabry TJ, Mabry H, editores. The Flavonoids. London: Chapman and Hall; 1975. p. 45-77.

254. Martínez A. Química de productos naturales. Universidad de Antioquia; 2020.

255. Cos P, Calomme M, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Antioxidant and Pro-Oxidant Compounds. Studies in Natural Products Chemistry. 2000; Volume 22, Part C: 307-41.

256. Iinuma M, Mizuno M. Natural occurrence and synthesis of 2′-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones, Phytochemistry. 1989; 28 (3): 681-94. DOI: 10.1016/0031-9422(89)80094-9.

257. Tanaka T, Iinuma M, Mizuno M. Spectral Properties of 2'-Oxygenated flavones. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1986; 34: 1667-71.

258. Iwashina T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. Journal of Plant Research. 2000; 113 (3): 287-99. DOI:10.1007/PL00013940.

259. Baiocchi C, Medana C, Giancotti V, Aigotti R, Dal Bello F, Massolino C, et al. Qualitative characterization of Desmodium adscendens constituents by high-performance liquid chromatography-diode array ultraviolet-electrospray ionization multistage mass spectrometry. Eur J Mass Spectrom (Chichester). 2023; 19(1):1-15. DOI: 10.1255/ejms.1214.

260. Xu QN, Zhu D, Wang GH, Lin T, Sun CL, Ding R, et al. Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from *Desmodium caudatum*. Nat Prod Res. 2020; 35(22):4534-41. DOI: 10.1080/14786419.2020.1739044.

261. Nakamura S. Métodos numéricos aplicados con software. 1ª ed. Prentice Hall Hispanoamericana; 1992.

262. Davies HG, Hicks GA. Mathematics for scientific and technical students. 2nd edition. Routledge; 1998.

263. Nieves A, Domínguez F. Métodos numéricos aplicados a la ingeniería. 4ta Edición. Grupo Editorial Patria; 2014.

264. Washington A, Evans R. Basic technical mathematics with calculus. Pearson Education; 2018.

265. Markham K, Bloor S. Analysis and identification of flavonoids in practice. En Rice-Evans C, Packer L, editors. Flavonoids in health and disease. New Yok: Marcel Dekker; 1998. p. 1-33.

266. Mizuno T, Kamo T, Sasaki N, Yada H, Murai Y, Iwashina T. Novel C-xylosylflavones from the leaves and flowers of Iris gracilipes. Nat Prod Commun. 2015; 3:441-4.

267. Materska, M. Flavone C-glycosides from Capsicum annuum L.: relationships between antioxidant activity and lipophilicity. Eur Food Res Technol. 2015; 240: 549–557. DOI: 10.1007/s00217-014-2353-2.

268. Chelyn JL, Omar MH, Mohd Yousof NS, Ranggasamy R, Wasiman MI, Ismail Z. Analysis of flavone C-glycosides in the leaves of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau by HPTLC and HPLC-UV/DAD. ScientificWorldJournal. 2014; 2014:724267. DOI: 10.1155/2014/724267.

269. Barron D & Ibrahim L. Isoprenylated flavonoids-A Survey. Phytochemistry. 1996; 43(5): 921-82.

270. Lv HW, Wang QL, Luo M, Zhu MD, Liang HM, Li WJ, et al. Phytochemistry and pharmacology of natural prenylated flavonoids. Arch Pharm Res. 2023; 46(4): 207-72. DOI: 10.1007/s12272-023-01443-4.

271. Hu Q, Yao S, Ma Y, Xiong R, Kong G, Wu Y, Zhao G, et al. Prenylated flavonoids isolated from the twigs of *Artocarpus champeden* as potential activators for tobacco

powdery mildew and their mode of actions. Chem. Biol. Technol. Agric. 2023; 10 (94). DOI: 10.1186/s40538-023-00457-w.

272. Hossain A, Ismail Z. New Prenylated Flavonoids of Orthosiphon stamineus Grown in Malaysia. Asian Journal of Biotechnology. 2011; 3: 200-5. DOI: 10.3923/ajbkr.2011.200.205.

273. Xie C, Veitch NC, Houghton PJ, Simmonds MS. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* MAKINO. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2003; (10):1204-7. DOI: 10.1248/cpb.51.1204.

274. Li W, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Choi CW & Kim YH. Phenolic Compounds from *Desmodium caudatum.* Natural Product Sciences. 2013; 19(3): 215-20.

275. Wollenweber E. Flavones and flavonols. In Harbone J, Mabry T. The flavonoids: advances in research. Springer; 1982 p. 189-259.

276. Voirin B. UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4′;), di-(3′,4′) or tri-(3′,4′,5′)-substituted B rings. Phytochemistry. 1983; 22: 2107-45. DOI:10.1016/S0031-9422(00)80133-8.

277. McCune L, Owen P, Johns T. Flavonoids, Xanthones, and Other Antioxidant Polyphenols. En Soumyanath A. Traditional Herbal Medicines for Modern Times Antidiabetic Plants. Boca Ratón: CRC Press; 2006. p. 293-303.

278. Reis J, Gaspar A, Milhazes N, Borges F. Chromone as a Privileged Scaffold in Drug Discovery: Recent Advances. J Med Chem. 2017; 60(19):7941-57. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01720.

279. Sarian MN, Ahmed QU, So'ad SZM, Alhassan AM, Murugesu S, Perumal V, et al. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study. BioMed Research International. 2017; 2017:8386065. DOI: 10.1155/2017/8386065.

280. Hyun J, Woo Y, Hwang DS, Jo G, Eom S, Lee Y, Park JC, Lim Y. Relationships between structures of hydroxyflavones and their antioxidative effects. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20(18):5510-3. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.07.068.

281. Koirala N, Thuan N, Ghimire GP, Thang DV, Sohng, JK. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. Enzyme and Microbial Technology. 2016; 86:103-116. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.02.003.

282. Xiao J, Capanoglu E, Jassbi AR, Miron A. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(1): S29-45. DOI: 10.1080/10408398.2015.1067595.

283. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Sci World J. 2013; 2013:162750.

284. During A, Larondelle Y. The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure-activity relationships of flavones. Biochem Pharmacol. 2013; 86(12):1739-46. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.10.003.

285. Kao TY, Wu HW, Lee SS, Liang PH, Guh JH, Hsu LC. Characterization of a fluorescent glucose derivative 1-NBDG and its application in the identification of natural SGLT1/2 inhibitors. J Food Drug Anal. 2021;29(3):521-532. DOI: 10.38212/2224-6614.3371.

286. Rezwendy R, Syahdi RR, Yanuar A. Indonesian herbal SGLT2 inhibitor discovery through pharmacophore-based virtual screening. Pharmacog J. 2018;10:803-807. DOI:10.5530/pj.2018.4.136.

287. Shi Y, Meng F, Liu J, Wang B. In silico modeling and in vitro activity of vitexin and isovitexin against SGLT2. Journal of Theoretical and Computational Chemistry. 2019; 18(7):1950035. DOI: 10.1142/s0219633619500354. (2020) 2092001 DOI: 10.1142/S0219633620920017.

288. Kato A, Nasu N, Takebayashi K, Adachi I, Minami Y, Sanae F, Asano N, Watson A, Nash R. Structure-activity relationships of flavonoids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. J. Agric. Food Chem. 2008; 56: 4469–73.

289. Nicolle E, Souard F, Faure P, Boumendjel A. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. Curr Med Chem. 2011;18(17):2661-72. DOI: 10.2174/092986711795933777.

290. Merlo S, Basile L, Giuffrida ML, Sortino MA, Guccione S, Copani A. Identification of 5-Methoxyflavone as a Novel DNA Polymerase-Beta Inhibitor and Neuroprotective Agent against Beta-Amyloid Toxicity. J Nat Prod. 2015; 78(11):2704-11. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00621.

291. Wang X, Cao Y, Chen S, Lin J, Bian J, Huang D. Anti-Inflammation Activity of Flavones and Their Structure-Activity Relationship. J Agric Food Chem. 2021; 69(26): 7285-302. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c02015.

292. Ezealigo U, Joshua P, Ononiwu C, Agbo M, Asomadu R, Ogugua V. Total phenolic and flavonoid content and in vitro antioxidant activity of methanol extract and solvent fractions of *Desmodium ramosissimum* G. Don. Med. Sci. Forum. 2021; 2(15):1-6. DOI: 10.3390/CAHD2020-08594.

293. Vipin PS, Johannah NM, Menon S, Lincy L, Raghavamenon AC, Padikkala J. Antithrombotic and anticoagulant activities of *Desmodium* gyrans (DC). J Chem Pharm Res. 2015; 7(5):973-80.

294. Tsai J, Huang G, Chiu T, SS Huang S, SC Huang1, Huang TH, et al. Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. International Journal of Anatomy and Physiology. 2018; 7 (3): 1-10.

295. Giri H y Rajbhandari M. Phytochemical evaluation of some medicinal plants of Pyuthan district of Nepal. Nepal Journal of Science and Technology. 2020; 19(1): 97-106.

296. Chakraborty S, Pal A y Bala N. Comparative study of yields and total phenolic and flavonoid contents of extracts of different extraction methods of *Clitoria ternatea* (fabaceae*).* Int J Curr Pharm Res. 2021; 14 (6): 32-5.

297. Yusiati L, Kurniawati A, Hanim C, Anas M. Protein Binding Capacity of Different Forages Tannin. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.2018; 119(1): 012007. DOI: 10.1088/1755-1315/119/1/012007.

298. Alam M, Amin M, Kabir A, Moniruzzaman M y McNeill. Effect of Tannins in *Acacia nilotica*, *Albizia procera* and *Sesbania acculeata Foliage* Determined In vitro, in sacco, and in vivo. Asian-Aust J Anim Sci. 2007; 20(2): 220-8.

299. Gutiérrez M, Ortiz D, Muñoz G, Bah M & Serrano V. Contenido de sustancias antinutricionales de malezas usadas como forraje. Rev Latinoam Quím. 2010; 38(1): 58-67.

300. Nkwocha CC, Ogugofor M.O, I.F. Chukwuma I.F, O.U. Njoku O.U. Identification and characterization of phytochemicals and constituents in *Desmodium velutinum* stem using high-performance liquid chromatography (HPLC). Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine. 2022; 3:10090. DOI: 10.1016/j.prmcm.2022.100090.

301. Ghosal S, Srivastava S, Banerjee PK y Dutta SK. Alkaloids of *Desmodium triflorum.* Phytochemistry. 1971; 10: 3312-3.

302. Ezike, A.C., P.A. Akah, C.O. Okoli, I.K. Ufere, E. Ezeudu, C.F. Okoye, C. Ashara and I.N. Igbokwe. American Journal of Pharmacology and Toxicology. 2014; 9 (2): 114-24.

303. Lai S, Ho Y, Huang S, Huang T, Lai Z, Wu C, Lian K, et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Desmodium triflorum* (L.) DC. The American Journal of Chinese Medicine. 2010; 38 (2): 329-42.

304. Cai L, Wang C, Huo XK, Dong PP, Zhang BJ, Zhang HL, Huang SS, Zhang B, Yu SM, Zhong M, Ma XC. Effect of Alkaloids Isolated from *Phyllodium pulchellum* on Monoamine Levels and Monoamine Oxidase Activity in Rat Brain. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 2016:6826175. DOI: 10.1155/2016/6826175.

305. Federiuk IF, Casey H, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of Type-1 Diabetes Mellitus in Laboratory Rats by Use of Alloxan: Route of Administration, Pitfalls, and Insulin Treatment. Comparative Medicine. 2004; 54(3): 252-7.

306. Rahman SS, Yasmin N, Mizanur Rahman ATM, Hafizur Rahman AZM, Abdur Rouf SM. Evaluation and Optimization of Effective-dose of Alloxan for Inducing Type-2 Diabetes Mellitus in Long Evans Rat. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2017; 51(4S): S661-6.

307. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Physiol. Res. 2001; 50: 536-46.

308. Dhanesha N, Joharapurkar A, Shah G, Dhote V, Kshirsagar S, Bahekar R, et al. Exendin-4 ameliorates diabetic symptoms through activation of glucokinase. Journal of Diabetes. 2012; (4): 369-77.

309. Kameswara Rao B, Kesavulu MM, Apparao C. Antihyperglycemic activity of Momordica cymbalaria in alloxan diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2001;78(1):67-71. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00324-5.

310. Vilchez H, Pineda M & Villanueva L & Pulido V. Actividad hipoglucemiante de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* "yacón" y *Vitis vinífera* "uva" en ratas con diabetes inducida por aloxano. Arnaldoa. 2018; 25 (2): 539-64.

311. Aranda-Ventura J, Villacrés J, Mego R. Efecto hipoglicemiante de los extractos de tabebuia obscura (tahuari oscuro) sobre ratas con diabetes mellitus experimental. Revista peruana de medicina integrativa. 2016; 1(1): 19-24.

312. Solgorré EJ. Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de Otholobium pubescens en la hiperglicemia experimental en *Rattus norvergicus* var. Albinus (Tesís de Maestría). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005.

313. Vargas-Tineo OW, Segura-Muñoz DM, Becerra-Gutiérrez LK, Amado-Tineo JP, Silva-Díaz H. Efecto hipoglicemiante de *Moringa oleifera* (moringa) comparado con *Smallanthus Sonchifolius* (yacón) en *Rattus norvegicus* con diabetes mellitus inducida. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2020; 37(3):478-84.

314. Lisson Abanto R (1999). Glibenclamida en diabetes mellitus. Rev Farmacol Terap. 1999; 6(1-2): 19.

315. Justil C, Angulo P, Justil H, Arroyo J. Evaluación de la Actividad Hipoglicemiante del Extracto Acuoso de *Abuta grandifolia* (Mart.) en Ratas con Diabetes Inducida por Aloxano. Rev. investig. vet. Perú. 2015; 26(2):206-12. DOI: 10.15381/rivep. v26i2.11008.

316. Kesari AN, Gupta RK, Singh SK, Diwakar S, Watal G. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of Aegle marmelos seed extract in normal and diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2006; 107(3):374-9. DOI: 10.1016/j.jep.2006.03.042.

317. Palomino CM. Efecto del extracto etanólico de hojas Annona muricata l. (“guanábana”) sobre la hiperglicemia inducida con aloxano en ratas (Tesis de Maestría). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.

318. Lozano JA, Galindo JD, García-Borrón, Martínez-Liarte JH, Peñafiel R, Solano F. Bioquimica y Biología Molecular para ciencias de la vida. 3.ª Mc Graw Hill; 2005.

319. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. Biochemistry. 9th. ed. New York: Macmillan; 2019.

320. Sandoval Vázquez L. La activación del Receptor para el factor liberador de corticotropina tipo1 (CRF1) estimula las vías PI3K/Akt y MAPK, involucradas en la

señalización de la insulina. (Tesis Maestría). México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional; 2015.

321. McMillin SL, Schmidt DL, Kahn BB, Witczak CA. GLUT4 Is Not Necessary for Overload-Induced Glucose Uptake or Hypertrophic Growth in Mouse Skeletal Muscle. Diabetes. 2017;66(6):1491-1500. DOI: 10.2337/db16-1075.

322. Kahn BB. Adipose Tissue, Inter-Organ Communication, and the Path to Type 2 Diabetes: The 2016 Banting Medal for Scientific Achievement Lecture. Diabetes. 2019;68(1):3-14. DOI: 10.2337/dbi18-0035.

323. YuLan H, Lin S, HongWei Y, QingHua M. Expression of glucose transporter 2 in liver tissue in patients with hepatogenous diabetes and its significance. J Clin Hepatol, 2017; 33(3): 512-5. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2017.03.023.

324. Singh V, Singh R, Singh MP, Katrolia A. Therapeutic Role of *Desmodium* Species on its Isolated Flavonoids. Curr Mol Med. 2024;24(1):74-84. DOI: 10.2174/1566524023666221213111851.

325. Yang Z, Huang W, Zhang J, Xie M, Wang X. Baicalein improves glucose metabolism in insulin resistant HepG2 cells. Eur J Pharmacol. 2019; 854:187-93. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.04.005.

326. Kitakaze T, Jiang H, Nomura T, Hironao KY, Yamashita Y, Ashida H. Kaempferol Promotes Glucose Uptake in Myotubes through a JAK2-Dependent Pathway. J Agric Food Chem. 2020; 68(47):13720-9. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c05236.

327. Hsu CY, Shih HY, Chia YC, Lee CH, Ashida H, Lai YK, et al. Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation. Mol Nutr Food Res. 2014;58(6):1168-76. DOI: 10.1002/mnfr.201300691.

328. Kwon EB, Kang MJ, Ryu HW, Lee S, Lee JW, Lee MK, et al. Acacetin enhances glucose uptake through insulin-independent GLUT4 translocation in L6 myotubes. Phytomedicine. 2020; 68:153178. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153178.

329. Zhang X, Zhang QX, Wang X, Zhang L, Qu W, Bao B, et al. Dietary luteolin activates browning and thermogenesis in mice through an AMPK/PGC1α pathway-mediated mechanism. Int J Obes (Lond). 2016;40(12):1841-9. DOI: 10.1038/ijo.2016.108.

330. Dhanya R, Arya AD, Nisha P, Jayamurthy P. Quercetin, a Lead Compound against Type 2 Diabetes Ameliorates Glucose Uptake via AMPK Pathway in Skeletal Muscle Cell Line. Front Pharmacol. 2017; 8:336. DOI: 10.3389/fphar.2017.00336.

331. Ali, M.; Hassan, M.; Ansari, S.A.; Alkahtani, H.M.; Al-Rasheed, L.S.; Ansari, S.A. Quercetin and Kaempferol as Multi-Targeting Antidiabetic Agents against Mouse Model of Chemically Induced Type 2 Diabetes. Pharmaceuticals 2024; 17(6): 757. DOI: 10.3390/ph17060757.

332. Cai Y, Fan C, Yan J, Tian N, Ma X. Effects of rutin on the expression of PPARγ in skeletal muscles of db/db mice. Planta Med. 2012;78(9):861-5. DOI: 10.1055/s-0031-1298548.

333. Feng X, Weng D, Zhou F, Owen YD, Qin H, Zhao J, et al. Activation of PPARγ by a Natural Flavonoid Modulator, Apigenin Ameliorates Obesity-Related Inflammation Via Regulation of Macrophage Polarization. EBioMedicine. 2016; 9:61-76. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.06.017.

334. Puhl AC, Bernardes A, Silveira RL, Yuan J, Campos JLO, Saidemberg DM, et al. Mode of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation by Luteolin. Molecular Pharmacology. 2012; 81 (6): 788-99. DOI: 10.1124/mol.111.076216.

335. Li Y, Li Q, Wang C, Lou Z, Li Q. Trigonelline reduced diabetic nephropathy and insulin resistance in type 2 diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor-γ. Exp Ther Med. 2019;18(2):1331-7. DOI: 10.3892/etm.2019.7698.

336. Baloyi JJ, Ngongoni NT, Topps JH, Acamovic T, Hamudikuwanda H. Condensed tannin and saponin content of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, *Desmodium uncinatum,*

Stylosanthes guianensis and *Stylosanthes scabra* grown in Zimbabwe. Trop Anim Health Prod. 2001;33(1):57-66. DOI: 10.1023/a:1010385527384.

337. Giner-Chavez B, Soest PJV, Robertson JB, Lascano C, Reed JD, Pell AN. A Method for Isolating Condensed Tannins from Crude Plant Extracts with Trivalent Ytterbium. J Sci Food Agric.1997; 74: 359-68.

338. Perez-Maldonado RA, Norton BW. Digestion of 14C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. Br J Nutr. 1996;76(4):501-13. DOI: 10.1079/bjn19960059.

339. Yamashita Y, Wang L, Nanba F, Ito C, Toda T, Ashida H. Procyanidin Promotes Translocation of Glucose Transporter 4 in Muscle of Mice through Activation of Insulin and AMPK Signaling Pathways. PLoS One. 2016;11(9):e0161704. DOI: 10.1371/journal.pone.0161704.

340. Choi JS, Islam MN, Ali MY, Kim EJ, Kim YM, Jung HA. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. Food Chem Toxicol. 2014; 64:27-33. DOI: 10.1016/j.fct.2013.11.020.

341. Tran TD, Bui TQ, Le TA, Nguyen MT, Hai NTT, Pham NH, et al. Styracifoline from the Vietnamese Plant *Desmodium styracifolium*: A Potential Inhibitor of Diabetes-Related and Thrombosis-Based Proteins. ACS Omega. 2021; 6(36): 23211-21. DOI: 10.1021/acsomega.1c02840.

342. Rabbani N, Thornalley PJ. Hexokinase-linked glycolytic overload and unscheduled glycolysis in hyperglycemia-induced pathogenesis of insulin resistance, beta-cell glucotoxicity, and diabetic vascular complications. Front Endocrinol (Lausanne). 2024; 14:1268308. DOI: 10.3389/fendo.2023.1268308.

343. Alkhalidy H, Moore W, Wang A, Luo J, McMillan RP, Wang Y, et al. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. J Nutr Biochem. 2018, 58:90-101. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.04.014.

344. Prince PSM, Kamalakkannan N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. J Biochem Mol Toxicol. 2006;20(2):96-102. DOI: 10.1002/jbt.20117.

345. Rines AK, Sharabi K, Tavares CD, Puigserver P. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. Nat Rev Drug Discov. 2016; 15(11):786-804. DOI: 10.1038/nrd.2016.151.

346. Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. Mol Nutr Food Res. 2006;50(1):52-7. DOI: 10.1002/mnfr.200500163.

347. Bumke -Vogt C, Osterhoff MA, Borchert A, Guzman-Perez V, Sarem Z, Birkenfeld AL, Bähr V, Pfeiffer AF. The flavones apigenin and luteolin induce FOXO1 translocation but inhibit gluconeogenic and lipogenic gene expression in human cells. PLoS One. 2014 ;9(8):e104321. DOI: 10.1371/journal.pone.0104321.

348. Lam TP, Tran NN, Pham LD, Lai NV, Dang BN, Truong NN, Nguyen-Vo SK, Hoang TL, Mai TT, Tran TD. Flavonoids as dual-target inhibitors against α-glucosidase and α-amylase: a systematic review of in vitro studies. Nat Prod Bioprospect. 2024; 14(1):4. DOI: 10.1007/s13659-023-00424-w.

349. Ayua EO, Nkhata SG, Namaumbo SJ, Kamau EH, Ngoma TN, Aduol KO. Polyphenolic inhibition of enterocytic starch digestion enzymes and glucose transporters for managing type 2 diabetes may be reduced in food systems. Heliyon. 2021;7(2):e06245. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06245.

350. Martinez-Gonzalez AI, Díaz-Sánchez ÁG, de la Rosa LA, Bustos-Jaimes I, Alvarez-Parrilla E. Inhibition of α-amylase by flavonoids: Structure actívate relationship (SAR). Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2019; 206:437-447. DOI: 10.1016/j.saa.2018.08.057.

351. Adhikari B. Roles of Alkaloids from Medicinal Plants in the Management of Diabetes Mellitus. Journal of Chemistry. 2021; 2691525. DOI: 10.1155/2021/2691525.

352. Hamden K, Mnafgui K, Amri Z, Aloulou A, Elfeki A. Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes and hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats. Sci Pharm. 2013;81(1):233-46. DOI: 10.3797/scipharm.1211-14. Erratum in: Sci Pharm. 2014;82(2):449-50.

353. Chao_Zhao, Xuzhi_Wan, Sheng Zhou, Hui Cao. Natural Polyphenols: A Potential Therapeutic Approach to Hypoglycemia. eFood. 2020; 1(2): 107-118. DOI: 10.2991/efood.k.200302.00.

354. Xing Y, Liu H, Zhang D, Jiang H, Xiu Z, Dong Y. Baicalein, a dietary flavonoid, enhances the insulin-sensitizing effect of metformin to prevent type 2 diabetes via the regulation of lipid metabolism and gut microenvironment. Food frontiers. 2024; 5: 668-90. DOI: 10.1002/fft2.348.

355. Fukaya M, Sato Y, Kondo S, Adachi SI, Yoshizawa F, Sato Y. Quercetin enhances fatty acid β-oxidation by inducing lipophagy in AML12 hepatocytes. Heliyon. 2021;7(6): e07324. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07324.

356. Inamdar S, Joshi A, Malik S, Boppana R, Ghaskadbi S. Vitexin alleviates non-alcoholic fatty liver disease by activating AMPK in high fat diet fed mice. Biochem Biophys Res Commun. 2019;519(1):106-12. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.139.

357. Zeng XY, Wang H, Bai F, Zhou X, Li SP, Ren LP, et al. Identification of matrine as a promising novel drug for hepatic steatosis and glucose intolerance with HSP72 as an upstream target. Br J Pharmacol. 2015; 172:4303–18. DOI: 10.1111/bph.13209.

358. Choi WH, Son HJ, Jang YJ, Ahn J, Jung CH, Ha TY. Apigenin Ameliorates the Obesity-Induced Skeletal Muscle Atrophy by Attenuating Mitochondrial Dysfunction in the Muscle of Obese Mice. Mol Nutr Food Res. 2017;61(12):1-12. DOI: 10.1002/mnfr.201700218.

359. Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J, Duan H. PGC-1α, glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. J Endocrinol. 2016;229(3): R99-R115. DOI: 10.1530/JOE-16-0021.

360. Kim MA, Kang K, Lee HJ, Kim M, Kim CY, Nho CW. Apigenin isolated from Daphne genkwa Siebold et Zucc. Inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation through a modulation of mitotic clonal expansion. Life Sci. 2014; 101:64-72.

361. Park HS, Kim SH, Kim YS, Ryu SY, Hwang JT, Yang HJ, et al. Luteolin inhibits adipogenic differentiation by regulating PPARgamma activation. BioFactors. 2009; 35(4):373–79. DOI: 10.1002/biof.38.

362. Zhang ZZ, Yu XH, Tan WH. Baicalein inhibits macrophage lipid accumulation and inflammatory response by activating the PPARγ/LXRα pathway. Clin Exp Immunol. 2022; 209(3):316-25. DOI: 10.1093/cei/uxac062.

363. Gire D, Acharya J, Malik S, Inamdar S, Ghaskadbi S. Molecular mechanism of anti-adipogenic effect of vitexin in differentiating hMSCs. Phytother Res. 2021; 35(11):6462-71. DOI: 10.1002/ptr.7300.

364. Puhl AC, Bernardes A, Silveira RL, Yuan J, Campos JL, Saidemberg DM, et al. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. Mol Pharmacol. 2012;81(6):788-99. DOI: 10.1124/mol.111.076216.

365. Nagai S, Matsumoto C, Shibano M, Fujimori K. Suppression of Fatty Acid and Triglyceride Synthesis by the Flavonoid Orientin through Decrease of C/EBPδ Expression and Inhibition of PI3K/Akt-FOXO1 Signaling in Adipocytes. Nutrients. 2018; 10(2):130. DOI: 10.3390/nu10020130.

366. Beekmann K, Rubió L, de Haan LH, Actis-Goretta L, van der Burg B, van Bladeren PJ, et al. The effect of quercetin and kaempferol aglycones and glucuronides on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-γ). Food Funct. 2015 ;6(4):1098-107. DOI: 10.1039/c5fo00076a.

367. Ilavenil S, Arasu MV, Lee JC, Kim DH, Roh SG, Park HS, et al. Trigonelline attenuates the adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Phytomedicine. 2015;21(5):758-65. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.11.007.

368. Ding L, Jin D, Chen X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPARγ transcriptional activity in adipocytes. J Nutr Biochem. 2010; 21(10):941-7. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2009.07.009.

369. Fang J, Zeng L, He Y, Liu X, Zhang T, Wang Q. Effects of Dietary Tannic Acid on Obesity and Gut Microbiota in C57BL/6J Mice Fed with High-Fat Diet. Foods. 2022;11(21):3325. DOI: 10.3390/foods11213325.

370. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. Cell Metab. 2016; 23(5):770-84. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.04.011.

371. Kracht M, Müller-Ladner U, Schmitz ML. Mutual regulation of metabolic processes and proinflammatory NF-κB signaling. J Allergy Clin Immunol. 2020; 146(4):694-705. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.07.027.

372. Cai F, Chen W, Zhao R, Liu Y. Mechanisms of Nrf2 and NF-κB pathways in diabetic wound and potential treatment strategies. Mol Biol Rep. 2023; 50(6):5355-67. DOI: 10.1007/s11033-023-08392-7.

373. Malik S, Suchal K, Khan SI, Bhatia J, Kishore K, Dinda AK, Arya DS. Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF-κB-TNF-α and TGF-β1-MAPK-fibronectin pathways. Am J Physiol Renal Physiol. 2017; 313(2): F414-F422. DOI: 10.1152/ajprenal.00393.2016.

374. Yin H, Huang L, Ouyang T, Chen L. Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway. Int Immunopharmacol. 2018; 55:55-62. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.12.002.

375. Yu J, Ke L, Zhou J, Ding C, Yang H, Yan D, Yu C. Stachydrine Relieved the Inflammation and Promoted the Autophagy in Diabetes Retinopathy Through Activating the AMPK/SIRT1 Signaling Pathway. Diabetes Metab Syndr Obes. 2023; 16:2593-604. DOI: 10.2147/DMSO.S420253.

376. Ding YH, Miao RX, Zhang Q. Hypaphorine exerts anti-inflammatory effects in sepsis induced acute lung injury via modulating DUSP1/p38/JNK pathway. Kaohsiung J Med Sci. 2021;37(10):883-93. DOI: 10.1002/kjm2.12418.

377. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. Biomed Pharmacother. 2018; 656-62. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.058.

378. Chaillou L, Nazareno M. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006; 54(22), 8397-402.

379. Hu JJ, Wang H, Pan CW, Lin MX. Isovitexin alleviates liver injury induced by lipopolysaccharide/d-galactosamine by activating Nrf2 and inhibiting NF-κB activation. Microb Pathog. 2018; 119:86-92. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.03.053.

380. Qin S, Deng F, Wu W, Jiang L, Yamashiro T, Yano S, Hou DX. Baicalein modulates Nrf2/Keap1 system in both Keap1-dependent and Keap1-independent mechanisms. Arch Biochem Biophys. 2014; 559:53-61. DOI: 10.1016/j.abb.2014.03.011.

381. Marin LC, Cavarsan EC, Díaz IE, Paciencia ML, Frana SA, & Suffredini IB. Analysis of Brazilian Plant Extracts as Potential Source of Antioxidant Natural Products Using Bench-Top Assays. Free Radicals and Antioxidants. 2018; 8(2): 120–29. DOI: 10.5530/fra.2018.2.18.

382. Agrawal M, Singhal M, Semwal BC, Arora S, Singh B, Sikarwar V, et al. Neuroprotective action of hordenine against the Aluminium Chloride ($AlCl_3$) induced Alzheimer's diseases & associated memory impairment in experimental rats. Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine. 2024; 12:100492. DOI: 10.1016/j.prmcm.2024.100492.

383. Su S, Cao M, Wu G, Long Z, Cheng X, Fan J, et al. Hordenine protects against hyperglycemia-associated renal complications in streptozotocin-induced diabetic mice. Biomed Pharmacother. 2018; 104:315-24. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.036.

384. Tundis R, Menichini F, Conforti F, Loizzo MR, Bonesi M, Statti G, et al. A potential role of alkaloid extracts from Salsola species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. J Enzyme Inhib Med Chem. 2009; 24(3):818-24. DOI: 10.1080/14756360802399662.

385. Zhu X, Wu Y, Zhang X, Gu W, Ning Z. Stachydrine ameliorates hypoxia reoxygenation injury of cardiomyocyte via enhancing SIRT1-Nrf2 pathway. J Cardiothorac Surg. 2023;18(1):265. DOI: 10.1186/s13019-023-02363-6.

386. Vidinski B, Gál P, 1T. Toporcer T, Longauer F, Lenhardt N, Sabo J. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats.Acta Vet. Brno. 2006; 75: 197–202.

387. Li J, Ma J, Wang KS, Mi C, Wang Z, Piao LX, Xu GH, et al. Baicalein inhibits TNF-α-induced NF-κB activation and expression of NF-κB-regulated target gene products. Oncol Rep. 2016; 36: 2771-6. DOI: 10.3892/or.2016.5108.

388. Park MH, Hong JT. Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. Cells. 2016; 5(2):15. DOI: 10.3390/cells5020015.

389. Ahmed OM, Mohamed T, Moustafa H, Hamdy H, Ahmed RR, Aboud E. Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress. Biomed Pharmacother. 2018; 101:58-73. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.040.

390. Idris MHM, Amin SNM, Amin SNM, Nyokat N, Khong HY, Selvaraj M, Zakaria ZA, Shaameri Z, Hamzah AS, Teh LK, Salleh MZ. Flavonoids as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX): molecular docking and in vitro studies. Journal of Basic and Applied Sciences, 2022; 11:117.

391. Wang CZ, Zhang CF, Luo Y, Yao H, Yu C, Chen L, Yuan J, Huang WH, Wan JY, Zeng J, Sawadogo WR, Yuan CS. Baicalein, an enteric microbial metabolite, suppresses gut inflammation and cancer progression in ApcMin/+ mice. Clin Transl Oncol. 2020; 22(7):1013-22. DOI: 10.1007/s12094-019-02225-5.

392. Gopalakrishnan A, Ram M, Kumawat S, Tandan S, Kumar D. Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF-β1. Indian J Exp Biol. 2016; 54(3):187-95.

393. Lee HR, Jeong YJ, Lee JW, Jhun J, Na HS, Cho KH, et al. Tannic acid, an IL-1β-direct binding compound, ameliorates IL-1β-induced inflammation and cartilage degradation by hindering IL-1β-IL-1R1 interaction. PLoS One. 2023;18(4): e0281834. DOI: 10.1371/journal.pone.0281834

394. Jin W, Xue Y, Xue Y, Han X, Song Q, Zhang J, Li Z, et al. Tannic acid ameliorates arsenic trioxide-induced nephrotoxicity, contribution of NF-κB and Nrf2 pathways. Biomed Pharmacother. 2020; 126:110047. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110047.

395. Chen Y, Tian L, Yang F, Tong W, Jia R, Zou Y, et al. Tannic Acid Accelerates Cutaneous Wound Healing in Rats Via Activation of the ERK 1/2 Signaling Pathways. Adv Wound Care (New Rochelle). 2019; 8(7):341-54. DOI: 10.1089/wound.2018.0853.

396. Nigdelioglu Dolanbay S, Şirin S, Aslim B. Cocktail of three isoquinoline alkaloids derived from Glaucium grandiflorum Boiss. & A. Huet subsp. refractum (Nábelek) Mory inhibits the production of LPS-induced ROS, pro-inflammatory cytokines, and mediators through the down-regulation of p38 MAPK in BV-2 cells. Fitoterapia. 2023; 170:105652. DOI: 10.1016/j.fitote.2023.105652.

397. Xia H, Liu Y, Xia G, Liu Y, Lin S, Guo L. Novel Isoquinoline Alkaloid Litcubanine A - A Potential Anti-Inflammatory Candidate. Front Immunol. 2021; 12:685556. DOI: 10.3389/fimmu.2021.685556.

398. Zhang H, Chen L, Sun X, Yang Q, Wan L, Guo C. Matrine: A Promising Natural Product With Various Pharmacological Activities. Front Pharmacol. 2020; 11:588. DOI: 10.3389/fphar.2020.00588.

399. Wang J, Xu D, Shen L, Zhou J, Lv X, Ma H, et al. Anti-inflammatory and analgesic actions of bufotenine through inhibiting lipid metabolism pathway. Biomed Pharmacother. 2021; 140:111749. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111749.

400. Wu H, Zhang M, Li W, Zhu S, Zhang D. Stachydrine attenuates IL-1β-induced inflammatory response in osteoarthritis chondrocytes through the NF-κB signaling pathway. Chem Biol Interact. 2020; 326:109136. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109136.

401. Martin A. The use of antioxidants in healing. Dermatol surg. 1996; 22(2): 156-60.

402. Al-Ghanayem AA, Alhussaini MS, Asad M & Joseph, B. Kaempferol promotes wound-healing in diabetic rats through antibacterial and antioxidant effects, devoid of proliferative action. Bioscience Journal. 2024; 40 (e40015): 1-15. DOI: 10.14393/BJ-v40n0a2024-68974.

403. Zhang B, Wang J, Zhao G, Lin M, Lang Y, Zhang D, Feng D, Tu C. Apigenin protects human melanocytes against oxidative damage by activation of the Nrf2 pathway. Cell Stress Chaperones. 2020; 25(2):277-85. DOI: 10.1007/s12192-020-01071-7.

404. Xu, X.; Li, M.; Chen, W.; Yu, H.; Yang, Y.; Hang, L. Apigenin attenuates oxidative injury in ARPE-19 cells thorough activation of Nrf2 pathway. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016; 2016: 4378461.

405. Shi L, Hao Z, Zhang S, Wei M, Lu B, Wang Z, Ji L. Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway: The involvement of ERK1/2 and PKC. Biochem Pharmacol. 2018; 150:9-23. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.026.

406. Sanjay S, Girish C, Toi PC, Bobby Z. Quercetin modulates NRF2 and NF-κB/TLR-4 pathways to protect against isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity in vivo. Can J Physiol Pharmacol. 2021; 99(9):952- 63. DOI: 10.1139/cjpp-2021-0008.

407. Li XS, Tang XY, Su W, Li X. Vitexin protects melanocytes from oxidative stress via activating MAPK-Nrf2/ARE pathway. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2020; 42(6):594-603. DOI: 10.1080/08923973.2020.1835952.

408. Li Y, Zhang JJ, Chen RJ, Chen L, Chen S, Yang XF, et al. Genistein mitigates oxidative stress and inflammation by regulating Nrf2/HO-1 and NF-κB signaling pathways in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice. Ann Transl Med. 2022; 10(2):32. DOI: 10.21037/atm-21-4958.

409. Jeong JY, Cha HJ, Choi EO, Kim CH, Kim GY, Yoo YH, et al. Activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to the protective effects of baicalein against oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in HEI193 Schwann cells. Int J Med Sci. 2019;16(1):145-55. DOI: 10.7150/ijms.27005.

410. Lan Z, Wang H, Wang S, Zhua T, Ma S, Song Y, et al. Rutin protects against cyclophosphamide induced immunological stress by inhibiting TLR4-NF-κB-mediated inflammation and activating the Nrf2- mediated antioxidant responses. Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine. 2022; 4:100135. DOI: 10.1016/j.prmcm.2022.100135.

411. Wiciński M, Erdmann J, Nowacka A, Kuźmiński O, Michalak K, Janowski K, et al. Natural Phytochemicals as SIRT Activators-Focus on Potential Biochemical Mechanisms. Nutrients. 2023; 15(16):3578. DOI: 10.3390/nu15163578.

412. Deng L, Du C, Song P, Chen T, Rui S, Armstrong D, Deng W. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. Oxid Med Cellular Longev. Oxid Med Cell Longev. 2021; 2021:8852759. DOI: 10.1155/2021/8852759.

413. İlhami Gülçin, Zübeyr Huyut, Mahfuz Elmastaş, Hassan Y. Aboul-Enein. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arabian Journal of Chemistry. 2010; 3(1): 43-53. DOI: 10.1016/j.arabjc.2009.12.008.

414. Zhao P, Zhou R, Zhu XY, Hao YJ, Li N, Wang J, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice. Int J Mol Med. 2015;36(3):633-44. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2260.

415. Chowdhury AA, Gawali NB, Munshi R, Juvekar AR. Trigonelline insulates against oxidative stress, proinflammatory cytokines and restores BDNF levels in lipopolysaccharide induced cognitive impairment in adult mice. Metab Brain Dis. 2018 ;33(3):681-691. DOI: 10.1007/s11011-017-0147-5.

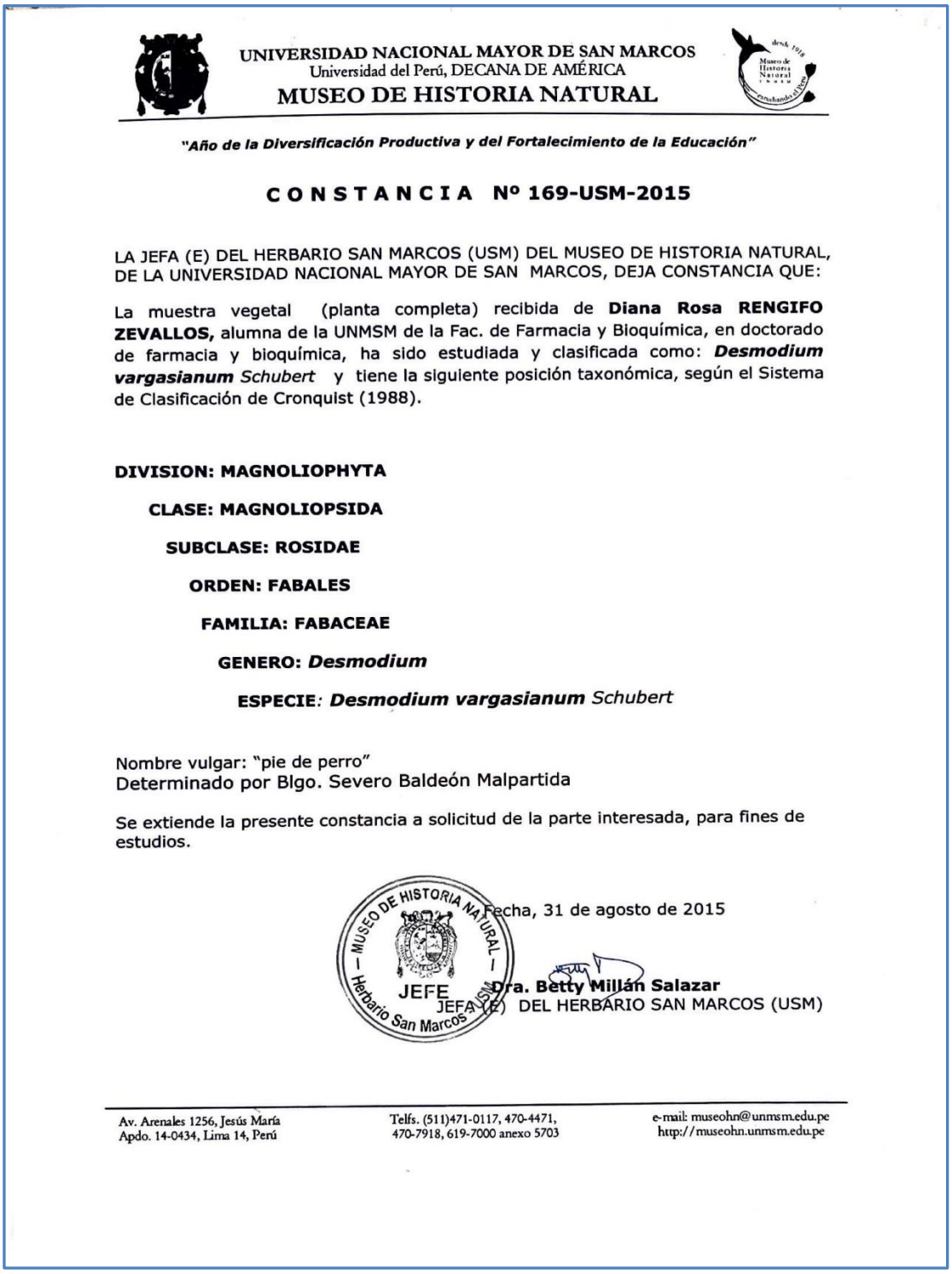
416. Zain C, Lee SY, Teo CY, Shaari K. Adsorption and Desorption Properties of Total Flavonoids from Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Mature Leaf on Macroporous Adsorption Resins. Molecules 2020; 25:778. DOI: 10.3390/molecules25040778.

417. Matteini P, Agati G, Pinelli P. et al. Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. Monatsh Chem. 2011; 142: 885–93. DOI: 10.1007/s00706-011-0545-z.

418. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51(2):216-26. DOI: 10.1007/s00125-007-0886-7.

ANEXOS

Anexo 1. Identificación taxonómica de la especie *Desmodium vargasianum* Schubert.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA Nº 169-USM-2015

LA JEFA (E) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Diana Rosa RENGIFO ZEVALLOS,** alumna de la UNMSM de la Fac. de Farmacia y Bioquímica, en doctorado de farmacia y bioquímica, ha sido estudiada y clasificada como: ***Desmodium vargasianum*** *Schubert* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: FABALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Desmodium*

ESPECIE: *Desmodium vargasianum* *Schubert*

Nombre vulgar: "pie de perro"
Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 31 de agosto de 2015

MUSEO DE HISTORIA NATURAL – Herbario San Marcos – JEFE

Dra. Betty Millán Salazar
JEFA (E) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

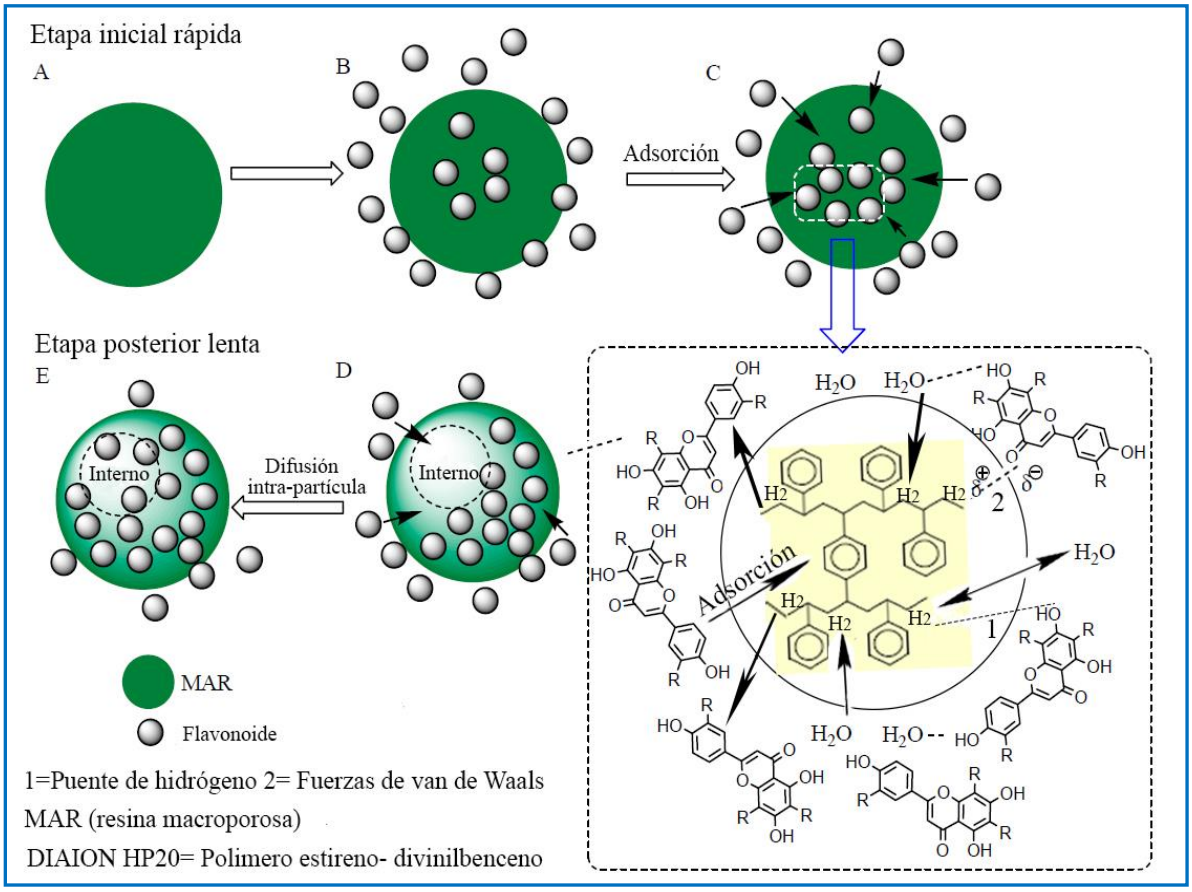
Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Telfs. (511)471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
http://museohn.unmsm.edu.pe

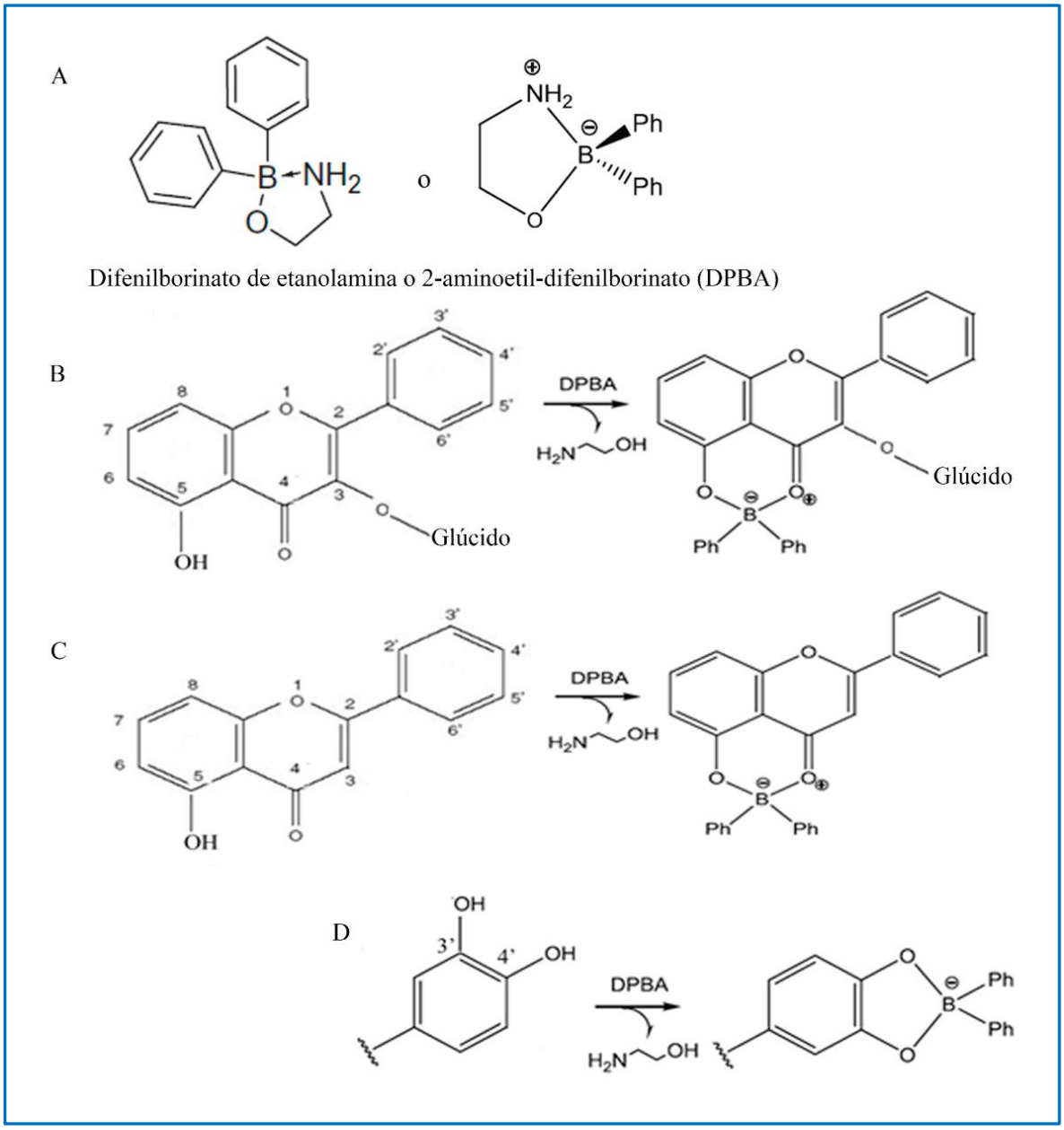
Fuente: elaboración propia.

Anexo 2. Diagrama esquemático del proceso de adsorción de flavonoides totales en resina Diaion HP-20**.**



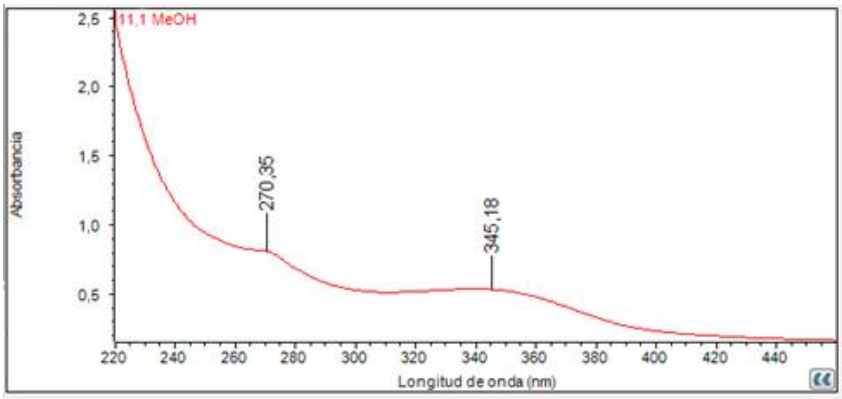
Fuente: adaptado de Zain et al.[416]

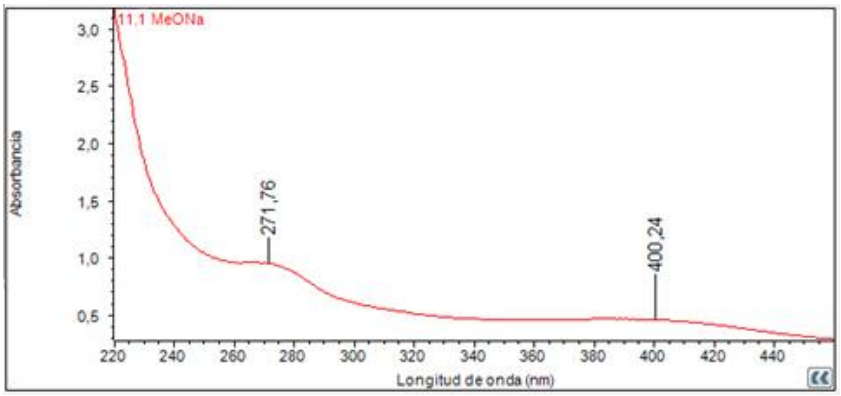
Anexo 3. Representacion del reactivo de Neu y sus vías de reacción en flavonoles y flavonas

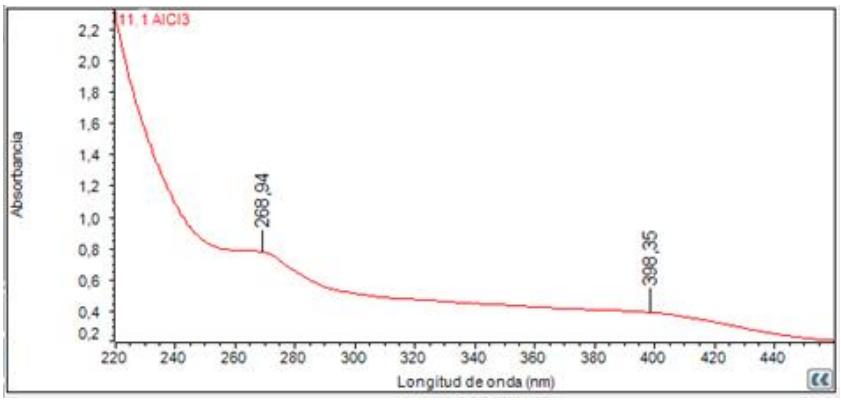


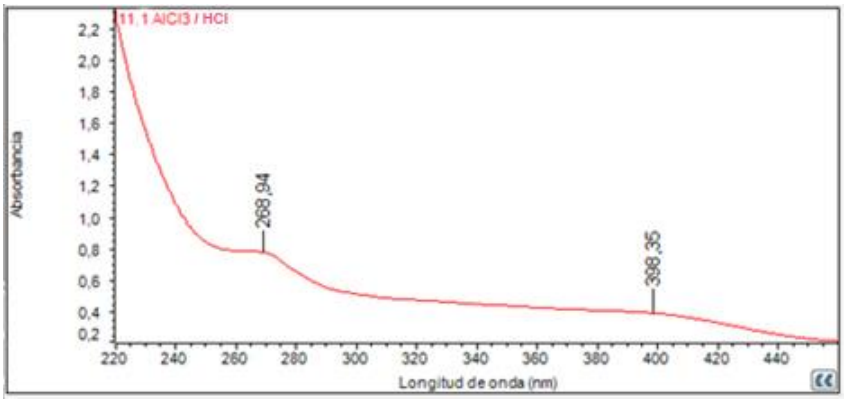
Leyenda: (A): Difenilborinato de etanolamina, también conocido con el nombre alternativo del 2-aminoetil difenil borinato (DPBA) (**B):** Vía de complejación a nivel de 5-OH y 4-ceto en los glúcidos de flavonoles (**C):** Vía de complejación a nivel de 5-OH y 4-ceto en flavonas (**D)**: Vía de complejación a nivel de 3'-OH y 4'-OH del flavonoide.
Fuente: adaptado de Matteini et al.[417]

Anexo 4. Espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$, $AlCl_3$ + HCl) de la fracción F1. Fuente: elaboración propia

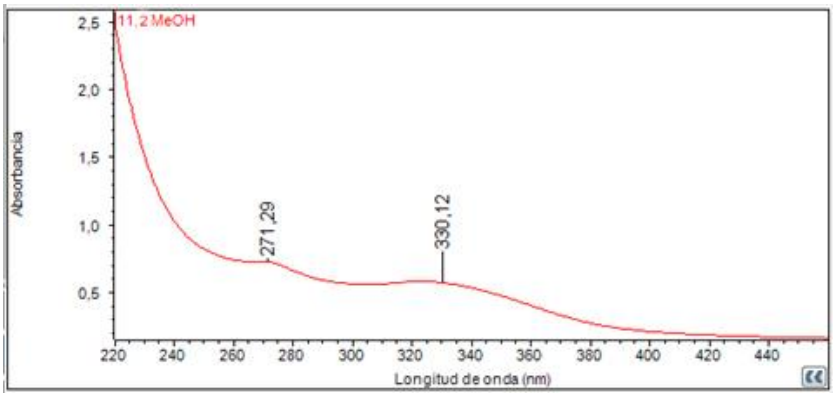


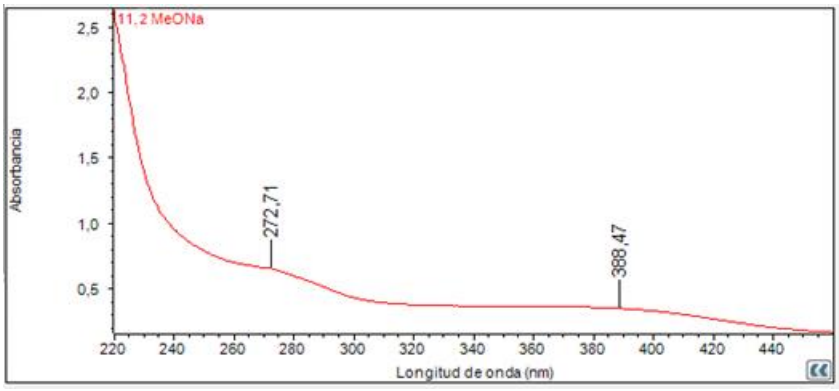


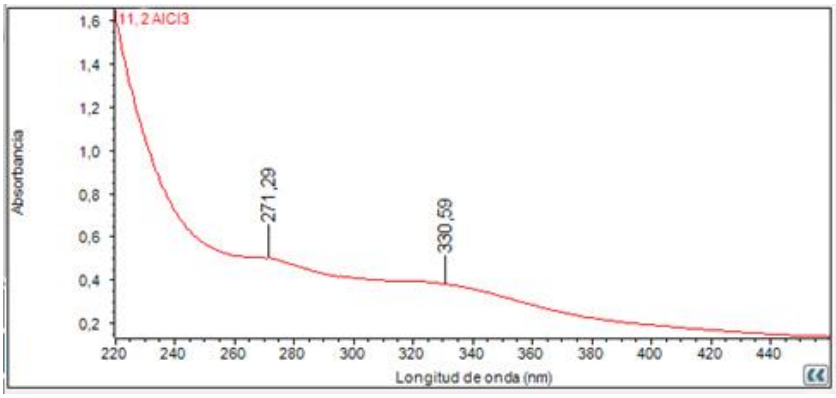


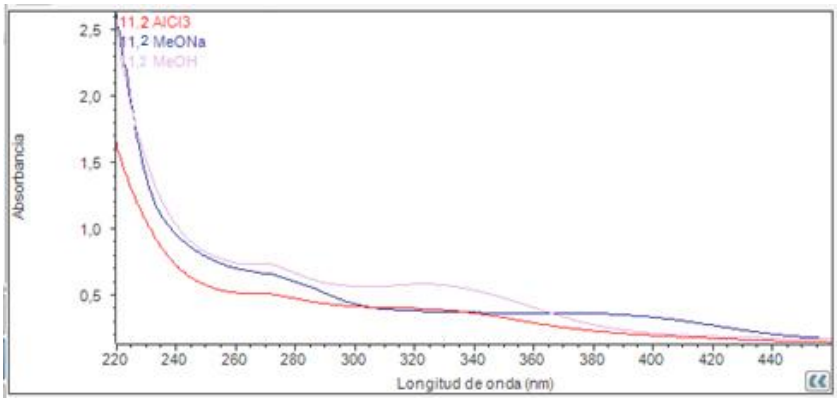


Anexo 5. Espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$, $AlCl_3$) y superposición de los espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$, $AlCl_3$) de la fracción F2. Fuente: elaboración propia.

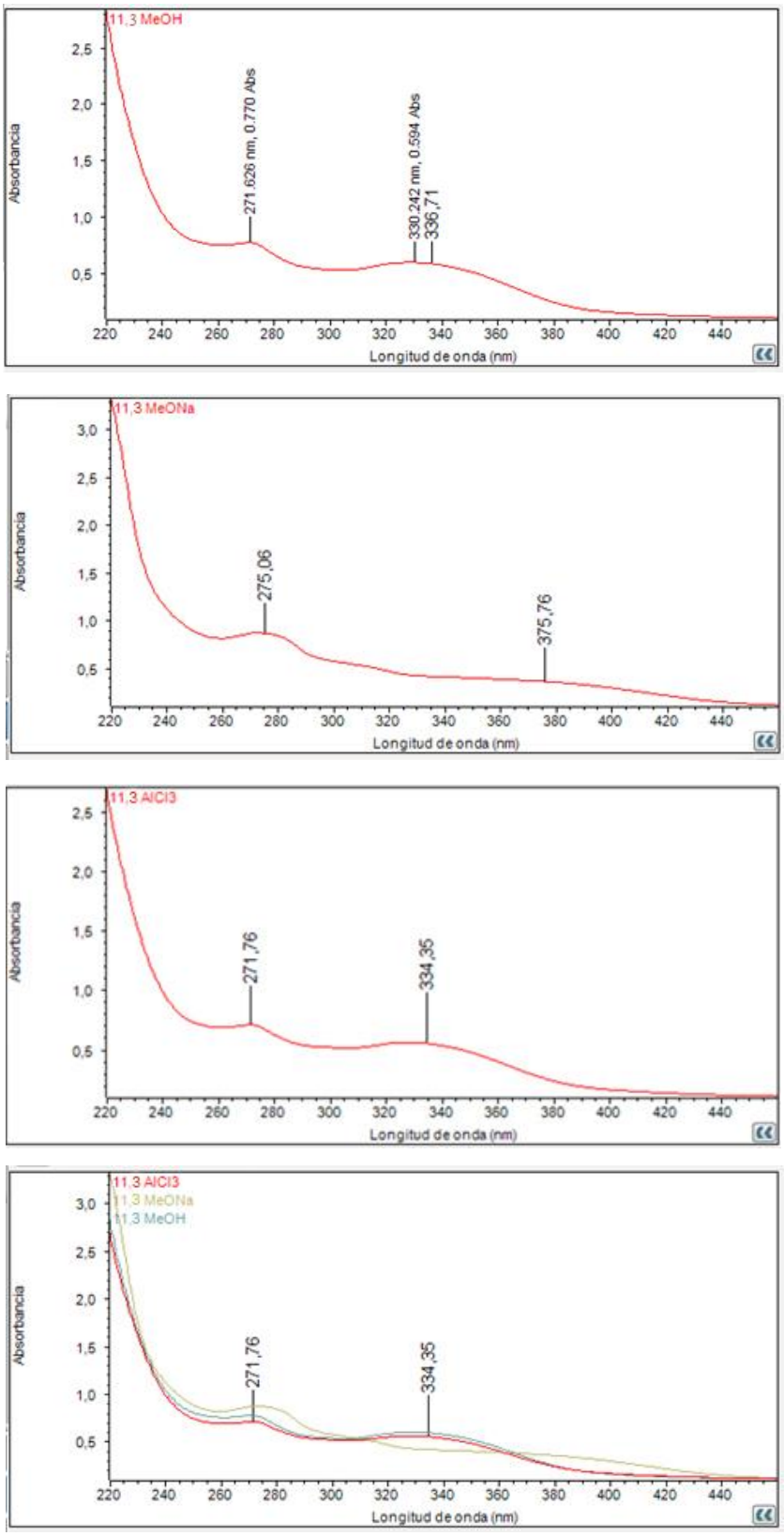




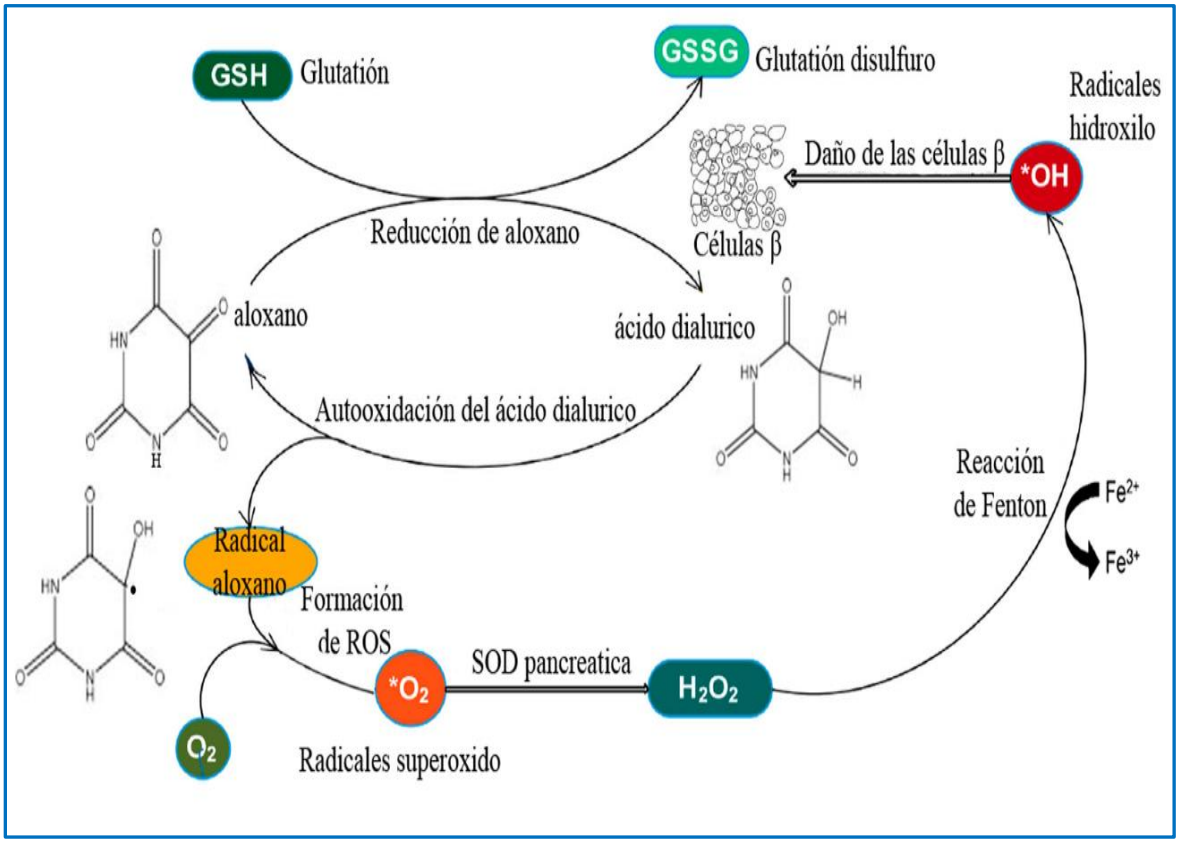




Anexo 6. Espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$,) y superposición de los espectros UV (MeOH, MeONa, $AlCl_3$,) de la fracción F3. Fuente: elaboración propia.



Anexo 7. Formación de ROS en el ciclo redox de aloxano



Fuente: adaptado de Ighodaro et al.[377]; Lenzen[418]

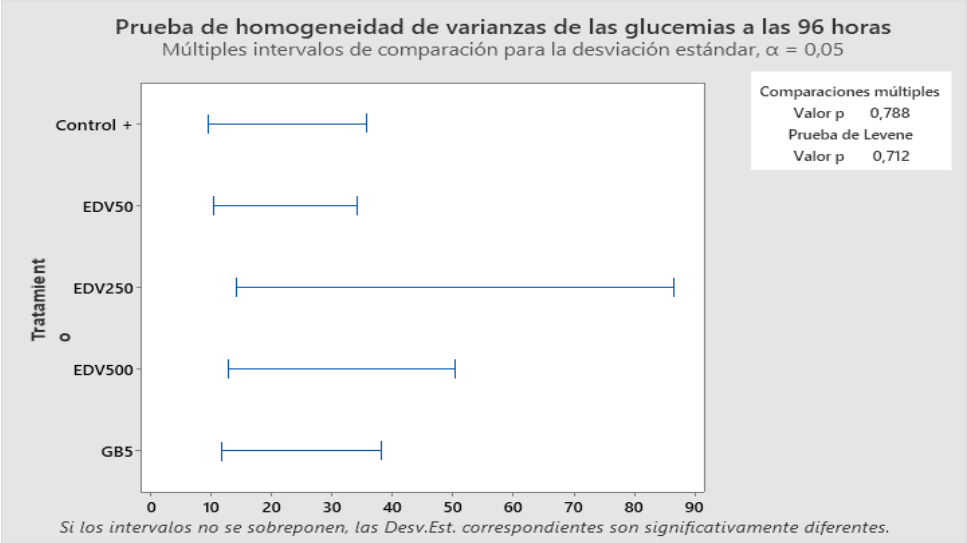
Anexo 8. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de normalidad (Shapiro Wilk)

Grupos	Shapiro Wilk		
	Estadístico	gl	sig
Control negativo	0.963	39	0.206
Control positivo	0.949	39	0.072
EDV 50 mg/kg	0.958	39	0.146
EDV 250 mg/kg	0.936	39	0.066
EDV 500 mg/kg	0.962	39	0.189
GB 5 mg/kg	0.961	39	0.178

Leyenda: EDV: Extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: Glibenclamida; gl: grados de libertad; sig.: nivel de significancia. Elaboración propia.

Anexo 9. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Valor de p	Tiempo pos tratamiento (horas)
1.68	4	35	0.176	24
0.35	4	35	0.843	48
0.27	4	35	0.894	72
0.53	4	35	0.712	96



p > 0.05 indica homogeneidad de varianzas. Fuente: elaboración propia.

Anexo 10. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de ANOVA de un factor)

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F crítico	Sig.
Basal						
Inter-grupos	231.854	5	46.371	1.904	2.438	0.114
Intra-grupos	1023.125	42	24.360			
Total	1254.979	47				
Basal hiperglucémico						
Inter-grupos	793466.417	5	158693.283	191.000	2.438	0.000
Intra-grupos	34895.5	42	830.845			
Total	828361.917	47				
Hora 1 postratamiento						
Inter-grupos	750683.5	5	150136.7	110.349	2.438	0.000
Intra-grupos	57143.75	42	1360.565			
Total	807827.25	47				
Hora 2 postratamiento						
Inter-grupos	685885.75	5	137177.15	177.321	2.438	0.000
Intra-grupos	32491.5	42	773.607			
Total	718377.25	47				
Hora 4 postratamiento						
Inter-grupos	668969.354	5	133793.871	207.961	2.438	0.000
Intra-grupos	27021.125	42	643.360			
Total	695990.479	47				
Hora 6 postratamiento						
Inter-grupos	655814.688	5	131162.938	170.634	2.438	0.000
Intra-grupos	32284.625	42	768.682			
Total	688099.313	47				
Hora 24 postratamiento						
Inter-grupos	762359	5	152471.8	432.632	2.438	0.000
Intra-grupos	14802	42	352.429			
Total	777161	47				
Hora 48 postratamiento						
Inter-grupos	742206.917	5	148441.383	355.513	2.438	0.000
Intra-grupos	17536.75	42	417.542			
Total	759743.667	47				
Hora 72 postratamiento						
Inter-grupos	726311.104	5	145262.221	473.943	2.438	0.000
Intra-grupos	12872.875	42	306.497			
Total	739183.976	47				
Hora 96 postratamiento						
Inter-grupos	703027.417	5	140605.483	423.898	2.438	0.000
Intra-grupos	13931.25	42	331.696			
Total	716958.667	47				

Fuente: elaboración propia.

Anexo 11. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de Tukey).

Tiempo (horas)	Diferencia de niveles del factor tratamiento	Diferencia de las medias de glucemia	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
0	Control positivo - Control negativo	354.6	14.4	(311.6; 397.6)	24.61	0.000
	EDV 250 - Control negativo	339.5	14.4	(296.5; 382.5)	23.56	0.000
	EDV 50 - Control negativo	349.6	14.4	(306.6; 392.6)	24.26	0.000
	EDV 500 - Control negativo	327.1	14.4	(284.1; 370.1)	22.70	0.000
	GB 5 - Control negativo	349.9	14.4	(306.9; 392.9)	24.28	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-15.1	14.4	(-58.1; 27.9)	-1.05	0.898
	EDV 50 - Control positivo	-5.0	14.4	(-48.0; 38.0)	-0.35	0.999
	EDV 500 - Control positivo	-27.5	14.4	(-70.5; 15.5)	-1.91	0.412
	GB 5 - Control positivo	-4.8	14.4	(-47.8; 38.3)	-0.33	0.999
	EDV 50 - EDV 250	10.1	14.4	(-32.9; 53.1)	0.70	0.981
	EDV 500 - EDV 250	-12.4	14.4	(-55.4; 30.6)	-0.86	0.954
	GB 5 - EDV 250	10.4	14.4	(-32.6; 53.4)	0.72	0.978
	EDV 500 - EDV 50	-22.5	14.4	(-65.5; 20.5)	-1.56	0.628
	GB 5 - EDV 50	0.3	14.4	(-42.8; 43.3)	0.02	1.000
	GB 5 - EDV 500	22.8	14.4	(-20.3; 65.8)	1.58	0.617
1	Control positivo - Control negativo	369.3	18.4	(314.2; 424.3)	20.02	0.000
	EDV 250 - Control negativo	312.3	18.4	(257.2; 367.3)	16.93	0.000
	EDV 50 - Control negativo	341.5	18.4	(286.5; 396.5)	18.52	0.000
	EDV 500 - Control negativo	300.9	18.4	(245.8; 355.9)	16.31	0.000
	GB 5 - Control negativo	328.4	18.4	(273.3; 383.4)	17.80	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-57.0	18.4	(-112.0; -2.0)	-3.09	0.039
	EDV 50 - Control positivo	-27.7	18.4	(-82.8; 27.3)	-1.50	0.663
	EDV 500 - Control positivo	-68.4	18.4	(-123.4; -13.3)	-3.71	0.007
	GB 5 - Control positivo	-40.9	18.4	(-95.9; 14.2)	-2.22	0.252
	EDV 50 - EDV 250	29.2	18.4	(-25.8; 84.3)	1.59	0.612
	EDV 500 - EDV 250	-11.4	18.4	(-66.4; 43.7)	-0.62	0.989
	GB 5 - EDV 250	16.1	18.4	(-38.9; 71.2)	0.87	0.951
	EDV 500 - EDV 50	-40.6	18.4	(-95.7; 14.4)	-2.20	0.258
	GB 5 - EDV 50	-13.1	18.4	(-68.2; 41.9)	-0.71	0.979
	GB 5 - EDV 500	27.5	18.4	(-27.5; 82.5)	1.49	0.672
2	Control positivo - Control negativo	378.0	13.9	(336.5; 419.5)	27.18	0.000
	EDV 250 - Control negativo	244.9	13.9	(203.4; 286.4)	17.61	0.000
	EDV 50 - Control negativo	310.9	13.9	(269.4; 352.4)	22.35	0.000
	EDV 500 - Control negativo	243.1	13.9	(201.6; 284.6)	17.48	0.000
	GB 5 - Control negativo	305.9	13.9	(264.4; 347.4)	21.99	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-133.1	13.9	(-174.6; -91.6)	-9.57	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-67.1	13.9	(-108.6; -25.6)	-4.83	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-134.9	13.9	(-176.4; -93.4)	-9.70	0.000
	GB 5 - Control positivo	-72.1	13.9	(-113.6; -30.6)	-5.19	0.000
	EDV 50 - EDV 250	66.0	13.9	(24.5; 107.5)	4.75	0.000
	EDV 500 - EDV 250	-1.8	13.9	(-43.2; 39.7)	-0.13	1.000
	GB 5 - EDV 250	61.0	13.9	(19.5; 102.5)	4.39	0.001
	EDV 500 - EDV 50	-67.8	13.9	(-109.2; -26.3)	-4.87	0.000
	GB 5 - EDV 50	-5.0	13.9	(-46.5; 36.5)	-0.36	0.999
	GB 5 - EDV 500	62.8	13.9	(21.3; 104.2)	4.51	0.001

Fuente: elaboración propia.

Anexo 11. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de Tukey) (continuación)

Tiempo (horas)	Diferencia de niveles del factor tratamiento	Diferencia de las medias de glucemia	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
4	Control positivo - Control negativo	385.5	12.7	(347.7; 423.3)	30.40	0.000
	EDV 250 - Control negativo	222.9	12.7	(185.0; 260.7)	17.57	0.000
	EDV 50 - Control negativo	291.6	12.7	(253.8; 329.5)	22.99	0.000
	EDV 500 - Control negativo	230.6	12.7	(192.8; 268.5)	18.18	0.000
	GB 5 - Control negativo	283.8	12.7	(245.9; 321.6)	22.37	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-162.6	12.7	(-200.5; -124.8)	-12.82	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-93.9	12.7	(-131.7; -56.0)	-7.40	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-154.9	12.7	(-192.7; -117.0)	-12.21	0.000
	GB 5 - Control positivo	-101.8	12.7	(-139.6; -63.9)	-8.02	0.000
	EDV 50 - EDV 250	68.8	12.7	(30.9; 106.6)	5.42	0.000
	EDV 500 - EDV 250	7.8	12.7	(-30.1; 45.6)	0.61	0.990
	GB 5 - EDV 250	60.9	12.7	(23.0; 98.7)	4.80	0.000
	EDV 500 - EDV 50	-61.0	12.7	(-98.8; -23.2)	-4.81	0.000
	GB 5 - EDV 50	-7.9	12.7	(-45.7; 30.0)	-0.62	0.989
	GB 5 - EDV 500	53.1	12.7	(15.3; 91.0)	4.19	0.002
6	Control positivo - Control negativo	385.5	13.9	(344.1; 426.9)	27.81	0.000
	EDV 250 - Control negativo	207.6	13.9	(166.3; 249.0)	14.98	0.000
	EDV 50 - Control negativo	282.9	13.9	(241.5; 324.2)	20.41	0.000
	EDV 500 - Control negativo	222.8	13.9	(181.4; 264.1)	16.07	0.000
	GB 5 - Control negativo	269.6	13.9	(228.3; 311.0)	19.45	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-177.9	13.9	(-219.2; -136.5)	-12.83	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-102.6	13.9	(-144.0; -61.3)	-7.40	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-162.8	13.9	(-204.1; -121.4)	-11.74	0.000
	GB 5 - Control positivo	-115.9	13.9	(-157.2; -74.5)	-8.36	0.000
	EDV 50 - EDV 250	75.3	13.9	(33.9; 116.6)	5.43	0.000
	EDV 500 - EDV 250	15.1	13.9	(-26.2; 56.5)	1.09	0.882
	GB 5 - EDV 250	62.0	13.9	(20.6; 103.4)	4.47	0.001
	EDV 500 - EDV 50	-60.1	13.9	(-101.5; -18.8)	-4.34	0.001
	GB 5 - EDV 50	-13.3	13.9	(-54.6; 28.1)	-0.96	0.929
	GB 5 - EDV 500	46.9	13.9	(5.5; 88.2)	3.38	0.018
24	Control positivo - Control negativo	412.38	9.39	(384.37; 440.38)	43.93	0.000
	EDV 250 - Control negativo	256.25	9.39	(228.24; 284.26)	27.30	0.000
	EDV 50 - Control negativo	308.63	9.39	(280.62; 336.63)	32.88	0.000
	EDV 500 - Control negativo	260.75	9.39	(232.74; 288.76)	27.78	0.000
	GB 5 - Control negativo	306.25	9.39	(278.24; 334.26)	32.63	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-156.13	9.39	(-184.13; -128.12)	-16.63	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-103.75	9.39	(-131.76; -75.74)	-11.05	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-151.63	9.39	(-179.63; -123.62)	-16.15	0.000
	GB 5 - Control positivo	-106.13	9.39	(-134.13; -78.12)	-11.31	0.000
	EDV 50 - EDV 250	52.38	9.39	(24.37; 80.38)	5.58	0.000
	EDV 500 - EDV 250	4.50	9.39	(-23.51; 32.51)	0.48	0.997
	GB 5 - EDV 250	50.00	9.39	(21.99; 78.01)	5.33	0.000
	EDV 500 - EDV 50	-47.88	9.39	(-75.88; -19.87)	-5.10	0.000
	GB 5 - EDV 50	-2.38	9.39	(-30.38; 25.63)	-0.25	1.000
	GB 5 - EDV 500	45.50	9.39	(17.49; 73.51)	4.85	0.000

Fuente: elaboración propia.

Anexo 11. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de Tukey) (continuación)

Tiempo (horas)	Diferencia de niveles del factor tratamiento	Diferencia de las medias de glucemia	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
48	Control positivo - Control negativo	418.0	10.2	(387.5; 448.5)	40.91	0.000
	EDV 250 - Control negativo	206.1	10.2	(175.6; 236.6)	20.17	0.000
	EDV 50 - Control negativo	268.9	10.2	(238.4; 299.4)	26.32	0.000
	EDV 500 - Control negativo	222.3	10.2	(191.1; 252.7)	21.75	0.000
	GB 5 - Control negativo	279.3	10.2	(248.8; 309.7)	27.33	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-211.9	10.2	(-242.4; -181.4)	-20.74	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-149.1	10.2	(-179.6; -118.6)	-14.60	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-195.8	10.2	(-226.2; -165.3)	-19.16	0.000
	GB 5 - Control positivo	-138.8	10.2	(-169.2; -108.3)	-13.58	0.000
	EDV 50 - EDV 250	-62.8	10.2	(-93.2; 32.3)	-6.14	0.000
	EDV 500 - EDV 250	16.1	10.2	(-14.4; 46.6)	1.58	0.617
	GB 5 - EDV 250	73.1	10.2	(42.6; 103.6)	7.16	0.000
	EDV 500 - EDV 50	-46.6	10.2	(-77.1; -16.1)	-4.56	0.001
	GB 5 - EDV 50	10.4	10.2	(-20.1; 40.9)	1.02	0.910
	GB 5 - EDV 500	57.0	10.2	(26.5; 87.5)	5.58	0.000
72	Control positivo - Control negativo	417.13	8.75	(391.00; 443.25)	47.65	0.000
	EDV 250 - Control negativo	183.88	8.75	(157.75; 210.00)	21.01	0.000
	EDV 50 - Control negativo	247.88	8.75	(221.75; 274.00)	28.32	0.000
	EDV 500 - Control negativo	204.63	8.75	(178.50; 230.75)	23.38	0.000
	GB 5 - Control negativo	255.13	8.75	(229.00; 281.25)	29.15	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-233.25	8.75	(-259.37; -207.13)	-26.65	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-169.25	8.75	(-195.37; -143.13)	-19.34	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-212.50	8.75	(-238.62; -186.38)	-24.28	0.000
	GB 5 - Control positivo	-162.00	8.75	(-188.12; -135.88)	-18.51	0.000
	EDV 50 - EDV 250	64.00	8.75	(37.88; 90.12)	7.31	0.000
	EDV 500 - EDV 250	20.75	8.75	(-5.37; 46.87)	2.37	0.190
	GB 5 - EDV 250	71.25	8.75	(45.13; 97.37)	8.14	0.000
	EDV 500 - EDV 50	-43.25	8.75	(-69.37; -17.13)	-4.94	0.000
	GB 5 - EDV 50	7.25	8.75	(-18.87; 33.37)	0.83	0.961
	GB 5 - EDV 500	50.50	8.75	(24.38; 76.62)	5.77	0.000
96	Control positivo - Control negativo	411.00	9.11	(383.83; 438.17)	45.13	0.000
	EDV 250 - Control negativo	157.13	9.11	(129.95; 184.30)	17.25	0.000
	EDV 50 - Control negativo	218.50	9.11	(191.33; 245.67)	23.99	0.000
	EDV 500 - Control negativo	180.25	9.11	(153.08; 207.42)	19.79	0.000
	GB 5 - Control negativo	228.13	9.11	(200.95; 255.30)	25.05	0.000
	EDV 250 - Control positivo	-253.88	9.11	(-281.05; -226.70)	-27.88	0.000
	EDV 50 - Control positivo	-192.50	9.11	(-219.67; -165.33)	-21.14	0.000
	EDV 500 - Control positivo	-230.75	9.11	(-257.92; -203.58)	-25.34	0.000
	GB 5 - Control positivo	-182.88	9.11	(-210.05; -155.70)	-20.08	0.000
	EDV 50 - EDV 250	61.38	9.11	(34.20; 88.55)	6.74	0.000
	EDV 500 - EDV 250	23.13	9.11	(-4.05; 50.30)	2.54	0.136
	GB 5 - EDV 250	71.00	9.11	(43.83; 98.17)	7.80	0.000
	EDV 500 - EDV 50	-38.25	9.11	(-65.42; -11.08)	-4.20	0.002
	GB 5 - EDV 50	9.63	9.11	(-17.55; 36.80)	1.06	0.895
	GB 5 - EDV 500	47.88	9.11	(20.70; 75.05)	5.26	0.000

Fuente: elaboración propia.

Anexo 12. Efecto hipoglucemiante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de ANOVA de dos factores)

Efecto hipoglucemiante durante las 6 horas postratamiento

ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo	120077.725	4	30019.431	34.292	0.000	2.415
Tratamiento	3436853.183	5	687370.637	785.197	0.000	2.257
Interacción	117966.525	20	5898.326	6.738	0.000	1.621
Dentro del grupo	183836.5	210	875.412			
Total	3858733.933	239				

Fuente: elaboración propia.

Efecto hipoglucemiante durante las 96 horas postratamiento

ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo	208219.067	4	52054.767	116.245	0.000	2.415
Tratamiento	3503156.87	5	700631.374	1564.602	0.000	2.257
Interacción	224213.983	20	11210.699	25.035	0.000	1.621
Dentro del grupo	94038.375	210	447.802			
Total	4029628.3	239				

Fuente: elaboración propia.

Anexo 13. Comparaciones múltiples de las glucemias durante las 6 horas postratamiento. Prueba de Tukey

Grupos	Tiempo	H0	H1	H2	H4	H6
Control -	H1	0.800				
	H2	0.841	0.999			
	H4	0.822	0.999	0.999		
	H6	0.982	0.956	0.975	0.973	
Control +	H1	0.430				
	H2	0.243	0.904			
	H4	0.206	0.731	0.985		
	H6	0.394	0.884	0.996	0.999	
EDV 50 mg/kg	H1	0.977				
	H2	**0.002**	**0.015**			
	H4	**0.000**	**0.000**	**0.012**		
	H6	**0.000**	**0.000**	**0.002**	0.483	
EDV 250 mg/kg	H1	0.846				
	H2	**0.003**	0.058			
	H4	**0.000**	**0.001**	0.597		
	H6	**0.000**	**0.003**	0.222	0.818	
EDV 500 mg/kg	H1	0.813				
	H2	**0.004**	0.209			
	H4	**0.000**	**0.078**	0.954		
	H6	**0.000**	**0.034**	0.709	0.972	
Gb 5 mg/kg	H1	0.890				
	H2	0.245	0.718			
	H4	**0.026**	0.114	0.581		
	H6	**0.006**	**0.026**	0.152	0.784	

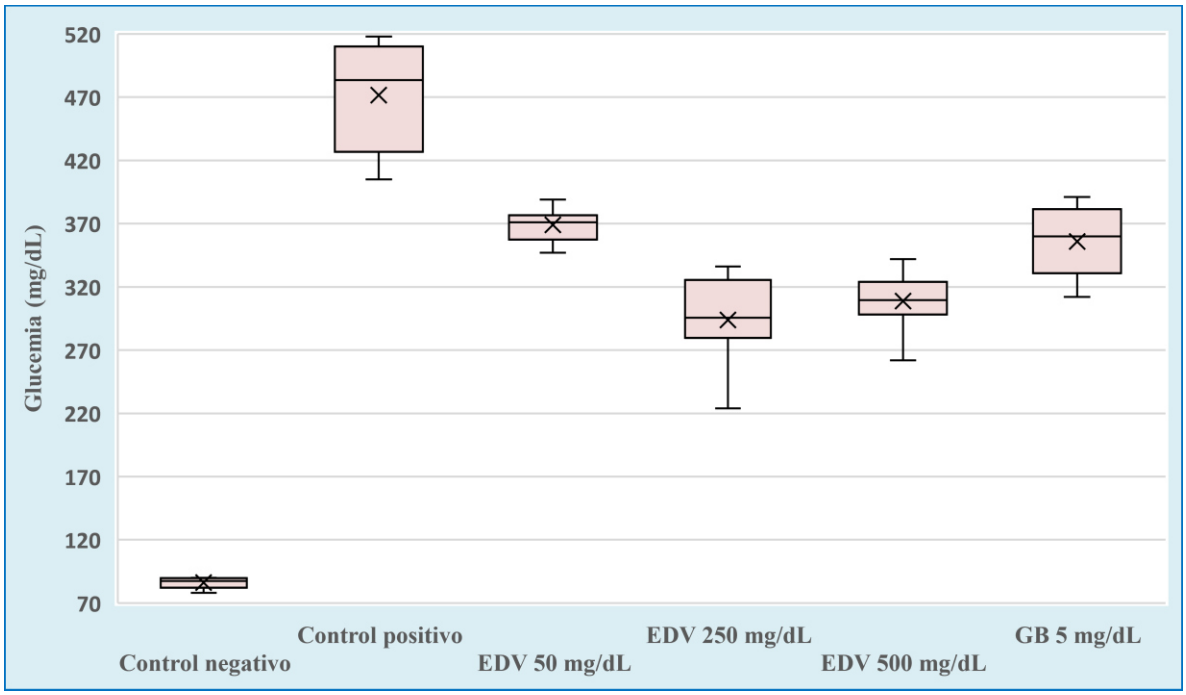
Fuente: elaboración propia.

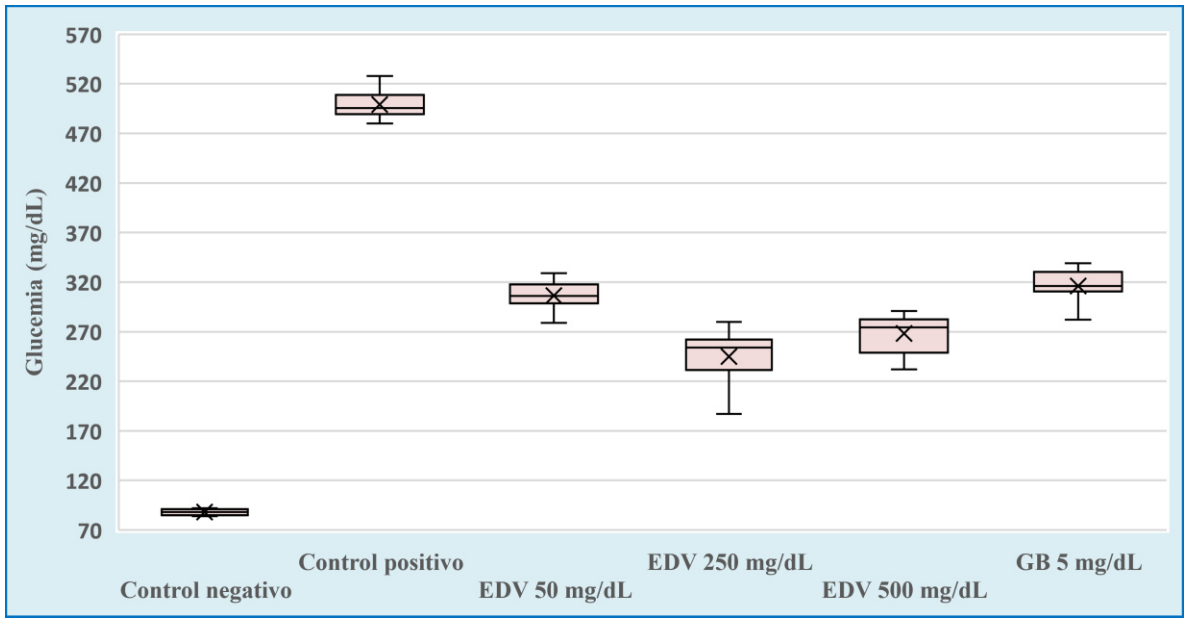
Anexo 14. Comparaciones múltiples de las glucemias durante las 96 horas postratamiento. Prueba de Tukey

Grupos	Tiempo	H0	H24	H48	H72	H96
Control -	H24	0.999				
	H48	0.967	0.931			
	H72	0.950	0.898	0.999		
	H96	0.637	0.237	0.955	0.978	
Control +	H24	**0.003**				
	H48	**0.000**	0.970			
	H72	**0.000**	0.975	0.999		
	H96	**0.001**	0.999	0.972	0.977	
EDV 50 mg/kg	H24	**0.001**				
	H48	**0.000**	**0.001**			
	H72	**0.000**	**0.001**	**0.001**		
	H96	**0.000**	**0.001**	**0.000**	**0.010**	
EDV 250 mg/kg	H24	**0.005**				
	H48	**0.000**	**0 .002**			
	H72	**0.000**	**0.000**	0.205		
	H96	**0.000**	**0.000**	**0.017**	0.249	
EDV 500 mg/kg	H24	**0.000**				
	H48	**0.000**	0.080			
	H72	**0.000**	**0.003**	0.715		
	H96	**0.000**	**0.000**	**0.046**	0.319	
GB 5 mg/kg	H24	0.151				
	H48	**0.014**	0.229			
	H72	**0.002**	**0.004**	0.210		
	H96	**0.000**	**0.000**	**0.002**	0.088	

Fuente: elaboración propia.

Anexo 15. Comparación de las glucemias entre los grupos experimentales a las 6 y 96 horas postratamiento





Fuente: elaboración propia.

Anexo 16. Variación del peso corporal en el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Desmodium vargasianum*

Grupo Experimental	Peso corporal (g) ± SD		
	• Peso inicial	• • Peso final	Variación (%)
Control +	234.9 ± 10.5	220.3 ± 8.7	-6.2
EDV 50 mg/kg	237.4 ± 7.7	236.9 ± 9.0	-0.2*
EDV 250 mg/kg	241.8 ± 7.2	244.9 ± 7.5	1.3*
EDV 500 mg/kg	237.4 ± 7.6	240.0 ± 11.6	1.1*
GB 5 mg/kg	243.5 ± 9.6	241.1± 10.7	-1.0*

(*) $p<0.05$.

Leyenda: EDV: Extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: Glibenclamida; SD: Desviación estándar. Elaboración propia.

• Peso inicial

Grupo	N	Media	SD	IC de 95%	Agrupación
Control +	8	234.88	10.52	(228.69; 241.06)	A
EDV 50	8	237.38	7.69	(231.19; 243.56)	A
EDV 250	8	241.75	7.25	(235.56; 247.94)	A
EDV 500	8	237.38	7.60	(231.19; 243.56)	A
GB 5	8	243.50	9.58	(237.31; 249.69)	A

Leyenda: EDV: Extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: Glibenclamida; SD: Desviación estándar (8.62244), IC: Intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

• • Peso final

Grupo	N	Media	SD	IC de 95%	Agrupación
Control +	8	220.25	8.73	(213.36; 227.14)	B
EDV 50	8	236.88	9.03	(229.98; 243.77)	A
EDV 250	8	244.88	7.45	(237.98; 251.77)	A
EDV 500	8	240.00	11.58	(233.11; 246.89	A
GB 5	8	241.13	10.66	(234.23; 248.02)	A

Leyenda: EDV: Extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: Glibenclamida; SD: Desviación estándar (9.60078), IC: Intervalo de confianza; Fuente: elaboración propia.

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Anexo 17. Evaluación del AUC de la glucemia durante las 6 y 96 horas postratamiento. Prueba de normalidad (Shapiro Wilk)

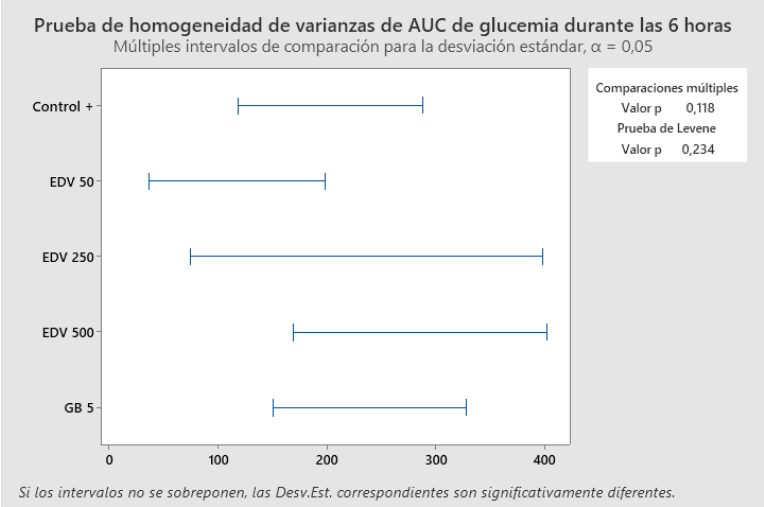
	Shapiro Wilk		
	Estadístico	gl	sig
Durante las 6 horas			
Control negativo	0.898	7	0.277
Control positivo	0.878	7	0.179
EDV 50	0.884	7	0.207
EDV 250	0.850	7	0.095
EDV 500	0.968	7	0.884
GB 5	0.974	7	0.929
Durante las 96 horas			
Conrol negativo	0.884	7	0.207
Control positivo	0.912	7	0.367
EDV 50	0.939	7	0.599
EDV 250	0.904	7	0.314
EDV 500	0.853	7	0.102
GB 5	0.956	7	0.398

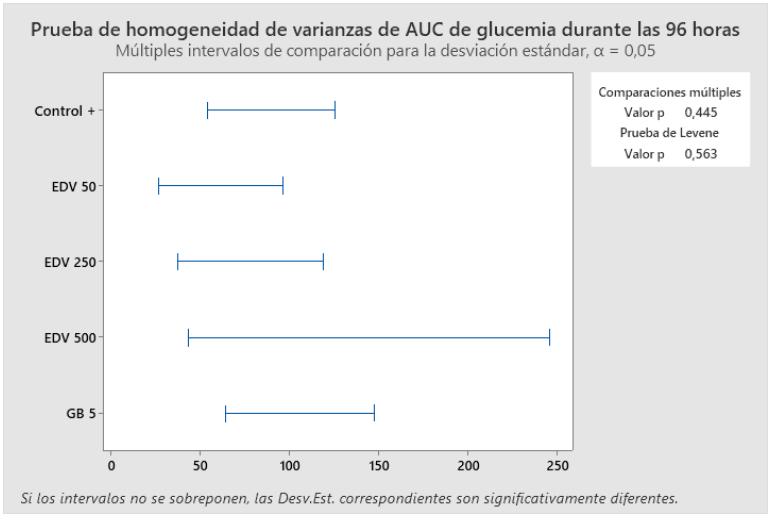
Leyenda: EDV: Extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: Glibenclamida; gl: grados de libertad; sig.: nivel de significancia. Elaboración propia.

Anexo 18. Evaluación del AUC de la glucemia durante las 6 y 96 horas postratamiento. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)

Estadístico de Levene	gl_1	gl_2	p
Durante las 6 horas			
1.47	4	35	0.234
Durante las 96 horas			
0.75	4	35	0.563

Leyenda: gl: grados de libertad; p: valor de probabilidad. Elaboración propia.





Fuente: elaboración propia.

Anexo 19. Evaluación del AUC de la glucemia durante las 6 y 96 horas postratamiento (prueba de ANOVA de un factor)

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F crítico	Sig
Durante las 6 horas postratamiento						
Inter-grupos	24464205.1	5	4892841.02	236.190	2.438	0.000
Intra-grupos	870059.028	42	20715.691			
Total	25334264.1	47				
Durante las 96 horas postratamiento						
Inter-grupos	11515553.71	5	2303110.74	613.36	2.438	0.000
Intra-grupos	157705.389	42	3754.890			
Total	11673259.1	47				

Leyenda: gl: grados de libertad; F: estadístico F; sig.: nivel de significancia.
Fuente: elaboración propia.

Anexo 20. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de normalidad (Shapiro Wilk)

	Shapiro Wilk		
	Estadístico	gl	sig
Control negativo	0.974	7	0.930
Control positivo	0.945	7	0.663
EDV 50 mg/kg	0.909	7	0.349
EDV 250 mg/kg	0.936	7	0.569
EDV 500 mg/kg	0.982	7	0.970
GB 5 mg/kg	0.971	7	0.364

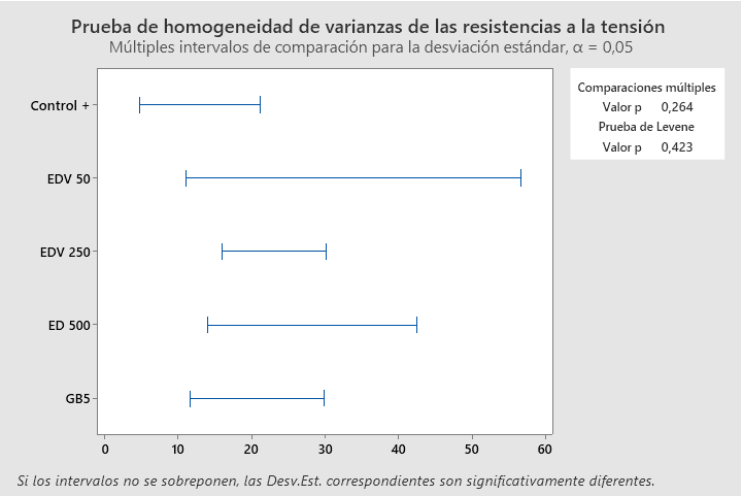
Leyenda: EDV: extracto de *Desmodium vargasianum*; GB: glibenclamida; gl: grados de libertad; sig.: nivel de significancia. Fuente: elaboración propia.

Anexo 21. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)

Estadístico de Levene	gl_1	gl_2	p
1.00	4	35	0.423

$p > 0.05$ indica homogeneidad de varianzas

Leyenda: gl: grados de libertad; p: valor de probabilidad. Fuente: elaboración propia.



Fuente: elaboración propia.

Anexo 22. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de ANOVA de un factor)

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F crítico	Sig
Inter-grupos	4194905.4	5	838981.07	2540.786	2.438	0.000
Intra-grupos	13868.625	42	330.205			
Total	4208774	47				

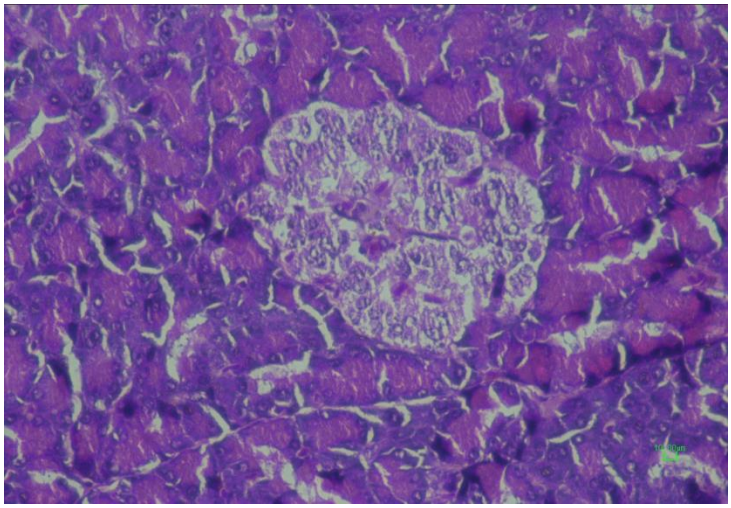
Leyenda: gl: grados de libertad, F: estadístico F, sig.: nivel de significancia.
Fuente: elaboración propia.

Anexo 23. Efecto cicatrizante del extracto de *D. vargasianum* en ratas diabéticas (prueba de Tukey)

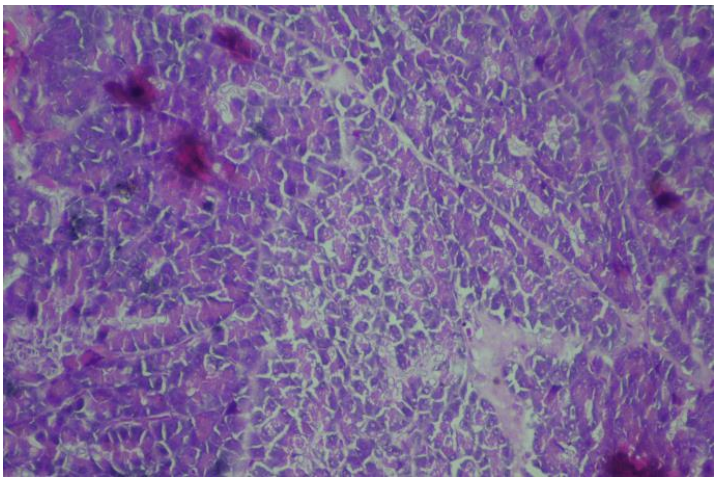
Diferencia de niveles del factor tratamiento	Diferencia de las medias de resistencia a la tensión	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Control positivo - Control negativo	-889.63	9.09	(-916.74; -862.51)	-97.91	0.000
EDV 250 - Control negativo	-726.25	9.09	(-753.36; -699.14)	-79.93	0.000
EDV 50 - Control negativo	-771.88	9.09	(-798.99; -744.76)	-84.95	0.000
EDV 500 - Control negativo	-742.50	9.09	(-769.61; -715.39)	-81.72	0.000
GB 5 - Control negativo	-773.38	9.09	(-800.49; -746.26)	-85.12	0.000
EDV 250 - Control positivo	163.38	9.09	(136.26; 190.49)	17.98	0.000
EDV 50 - Control positivo	117.75	9.09	(90.64; 144.86)	12.96	0.000
EDV 500 - Control positivo	147.13	9.09	(120.01; 174.24)	16.19	0.000
GB 5 - Control positivo	116.25	9.09	(89.14; 143.36)	12.79	0.000
EDV 50 - EDV 250	-45.63	9.09	(-72.74; -18.51)	-5.02	0.000
EDV 500 - EDV 250	-16.25	9.09	(-43.36; 10.86)	-1.79	0.484
GB 5 - EDV 250	-47.13	9.09	(-74.24; -20.01)	-5.19	0.000
EDV 500 - EDV 50	29.38	9.09	(2.26; 56.49)	3.23	0.027
GB 5 - EDV 50	-1.50	9.09	(-28.61; 25.61)	-0.17	1.000
GB 5 - EDV 500	-30.88	9.09	(-57.99; -3.76)	-3.40	0.018

Fuente: elaboración propia.

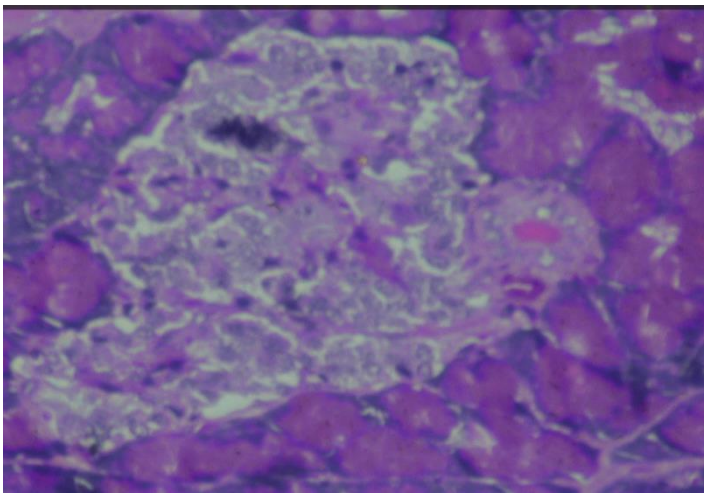
Anexo 24. Fotomicrografias de cortes histológicos de páncreas de ratas diabéticas tratadas con el extracto de hojas de *Desmodium vargasianum.* Fuente: elaboración propia.



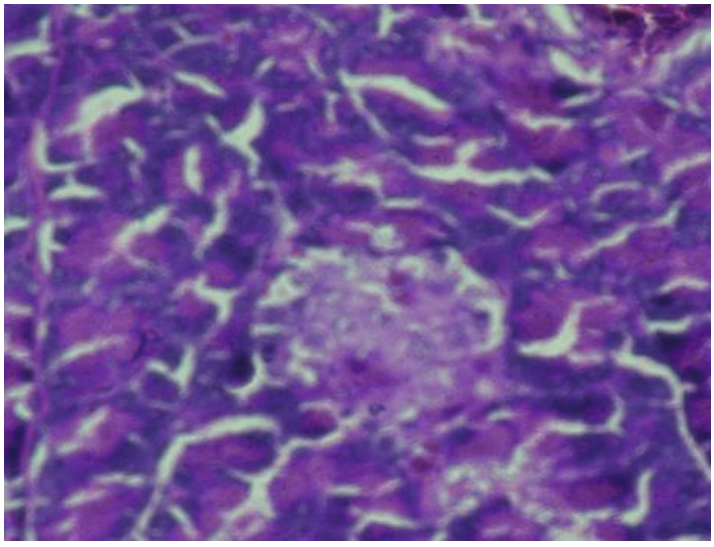
A. Corte histológico de pàncreas de rata sin diabetes tratada con suero fisiológico por vía oral. Páncreas. Parénquima: Normal. Islotes: De bordes regulares con células alfa, beta y gamma. Sin lesión. Coloración hematoxilina-eosina 400X.



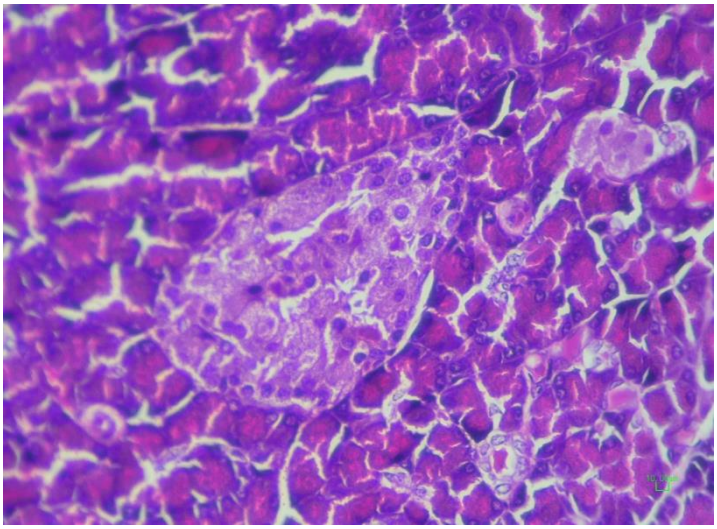
B. Corte histológico de páncreas de rata diabética sin tratamiento. Páncreas. Parénquima con alteraciones. No tiene islotes. Necrosis. Lesión: (+++). Coloración hematoxilina-eosina 100X.



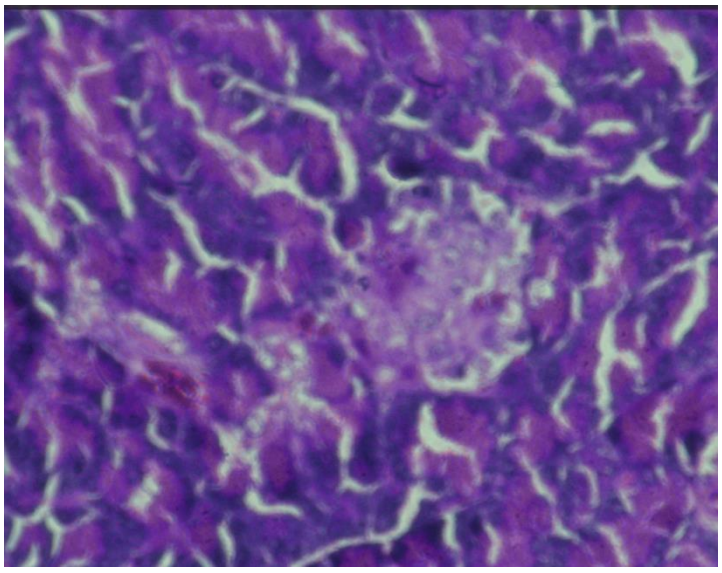
C. Corte histológico de páncreas de rata diabética tratada con solución acuosa de glibenclamida 5 mg/kg por vía oral. Páncreas. Parénquima: Conservado. Islotes: De bordes irregulares. Lesión: ++. Coloración hematoxilina-eosina 400X.



D. Corte histológico de pàncreas de rata diabética tratada con solución acuosa de extracto 50 mg/kg por vía oral. Páncreas. Parénquima: Conservado. Islotes: De bordes irregulares. Lesión: ++. Coloración hematoxilina-eosina 400X.

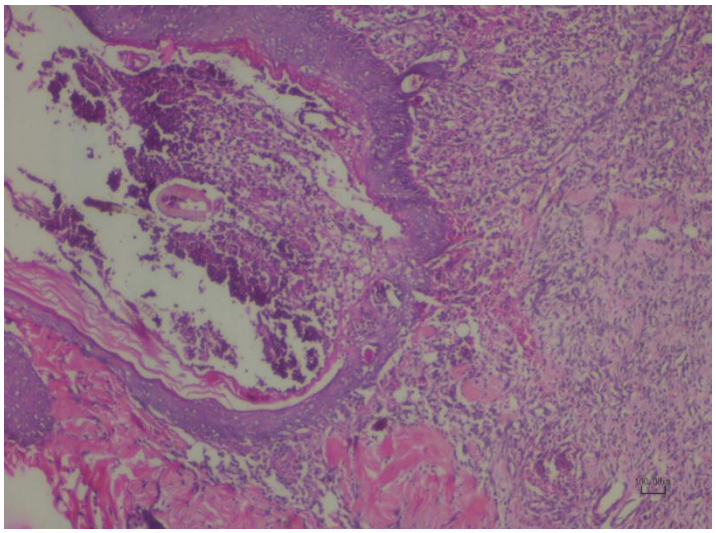


E. Corte histológico de páncreas de rata diabética tratada con solución acuosa de extracto 250 mg/kg por vía oral. Páncreas. Parénquima: Conservado. Islotes: De bordes irregulares. Lesión: ++. Coloración hematoxilina-eosina 400X.

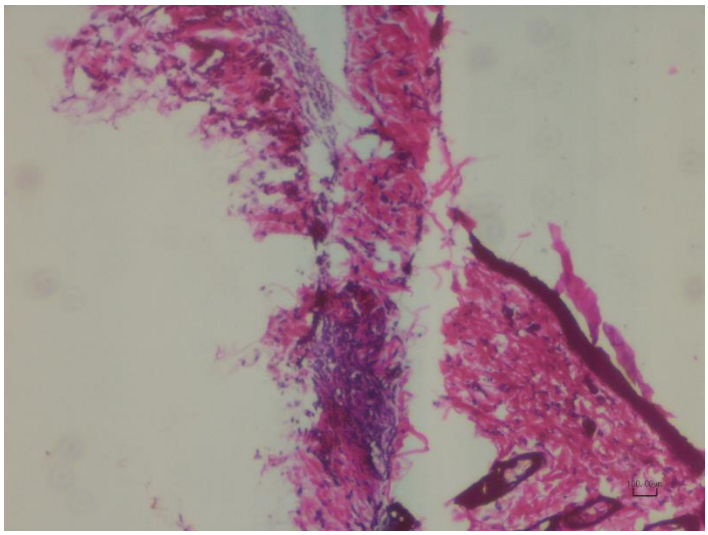


F. Corte histológico de páncreas de rata diabética tratada con solución acuosa de extracto 500 mg/kg por vía oral. Páncreas. Parénquima: Conservado. Islotes: De bordes irregulares. Lesión: ++. Coloración hematoxilina-eosina 400X.

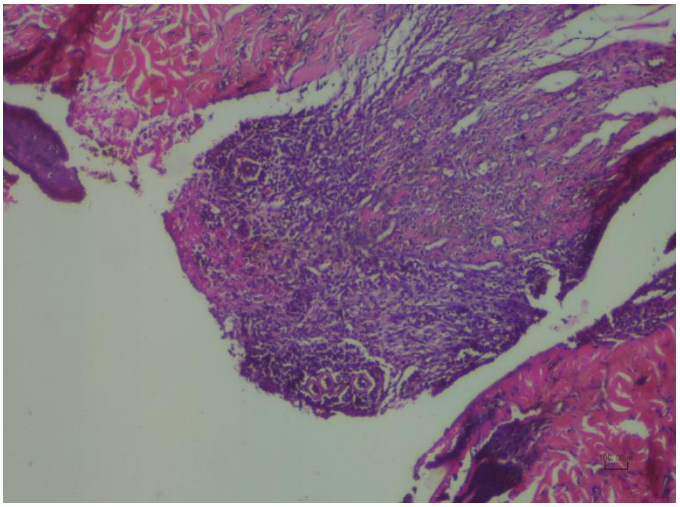
Anexo 25. Fotomicrografias de cortes histológicos de heridas cutáneas en ratas diabéticas postratamiento con el extracto de hojas de *Desmodium vargasianum*. Elaboración propia.



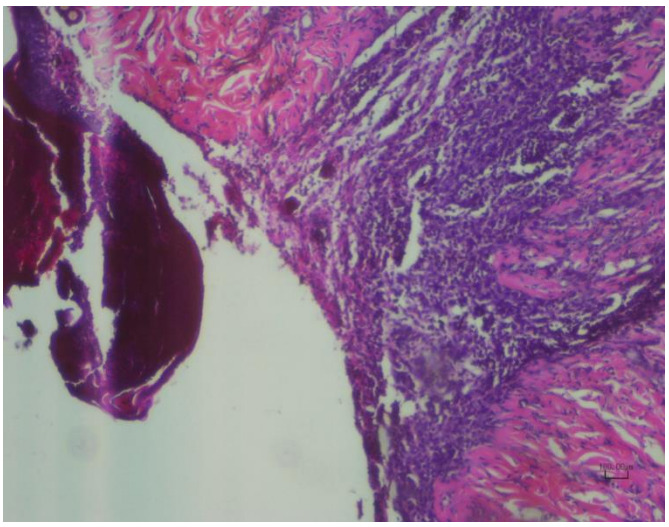
A. Corte histológico de herida cutánea de rata sin diabetes tratada con suero fisiológico por vía oral. Tejido epitelial: Reepitelización Completa. Tejido fibroso: Presente. Tejido de granulación: Escaso. Macrófagos: Abundantes. Cicatrización: Completa. Coloración hematoxilina-eosina 400X.



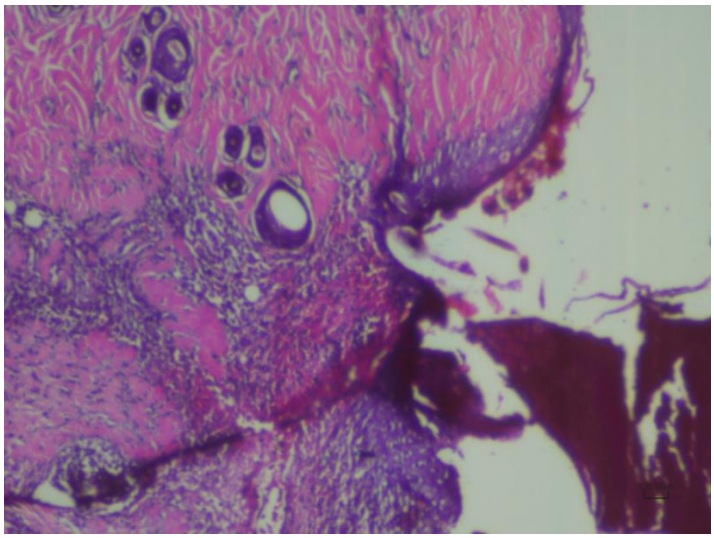
B. Corte histológico de herida cutánea de rata diabética sin tratamiento. Tejido epitelial: Ausente. Tejido conjuntivo: Presente. Tejido de granulación: Regular. Tejido fibroso: Ausente. Cicatrización: Ausente. Coloración hematoxilina-eosina 100X.



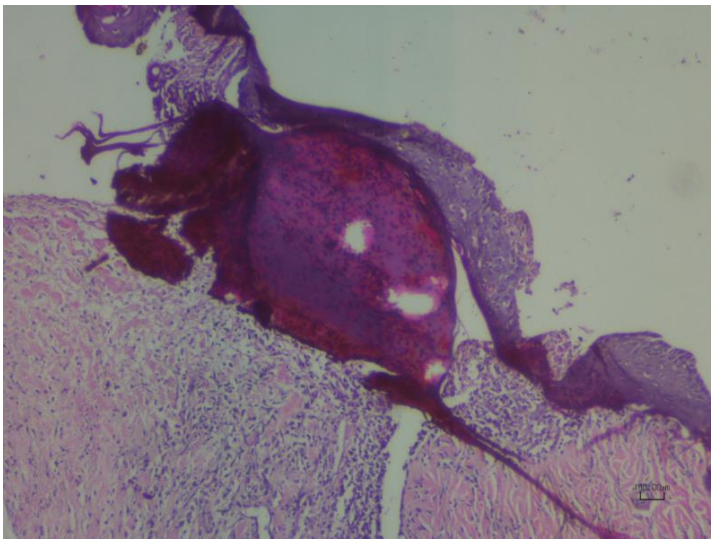
C. Corte histológico de herida cutánea de rata diabética tratada con solución acuosa de glibenclamida 5 mg/kg por vía oral. Tejido epitelial: Reepitelización incipiente. Tejido conjuntivo: Regular. Tejido de granulación: Regular. Tejido fibroso: Presencia de fibroblastos. Macrofagos: 20. Cicatrización: En vías. Coloración hematoxilina-eosina 400X.



D. Corte histológico de herida cutánea de rata diabética tratada con solución acuosa de extracto 50 mg/kg por vía oral. Tejido epitelial: Reepitelización incipiente. Tejido conjuntivo: Abundante. Tejido de granulación: Abundante. Macrófagos: Abundantes. Cicatrización: En vías. Coloración hematoxilina-eosina 400X.



E. Corte histológico de herida cutánea de rata diabética tratada con solución acuosa de extracto 250 mg/kg por vía oral. Tejido epitelial: Reepitelización inicial. Tejido conjuntivo: Abundante. Tejido de granulación: Regular. Tejido fibroso: Fibroblastos abundantes. Macrofagos: 20. Cicatrización: En vías. Coloración H&E, 400X.



F. Corte histológico de herida cutánea de rata diabética tratada con solución acuosa de extracto 500 mg/kg por vía oral. Tejido epitelial: Reepitelización inicial. Tejido conjuntivo: Regular. Tejido de granulación: Regular. Tejido fibroso: Presencia de fibroblastos. Macrófagos. Cicatrización: En vías. Coloración H&E, 400X.