



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE DEL
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Justicia chlorostachya* Leonard
(Insulina). EN RATONES CON HIPERGLICEMIA INDUCIDA.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

CARLITOS OSWALDO PAZMIÑO CHILUIZA

**RIOBAMBA-ECUADOR
2011**

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía, protección y fuente de sabiduría

A mis padres, a mis hermanos, a mi abuelita

Y a todos mis amigos y seres queridos,

quienes me brindaron su apoyo total

para concluir mi tesis.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Al BQF Fausto Contero y BQF Diego Vinuesa, miembros

De mi tesis por su colaboración incondicional

En la realización de la presente investigación

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE *Justicia chlorostachya Leonard* (INSULINA), EN RATONES CON HIPERGLICEMIA INDUCIDA” de responsabilidad del Sr. Egresado Carlitos Oswaldo Pazmiño Chiluiza ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz
**DECANA FACULTAD
DE CIENCIAS**

Dr. Luis Guevara
**DIRECTOR DE ESCUELA
BIOQUIMICA Y FARMACIA**

BQF. Fausto Contero
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Diego Vinuesa
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Tlgo. Carlos Rodríguez
**DIRECTOR CENTRO
DOCUMENTACIÓN**

NOTA DE TESIS ESCRITA _____

Yo Carlitos Oswaldo Pazmiño Chiluiza, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

CARLITOS OSWALDO PAZMIÑO CHILUIZA

INDICE GENERAL

INDICE DE ABREVIATURAS	iv
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE GRAFICOS	vii
INDICE DE FOTOGRAFIAS	viii
INDICE DE ANEXOS	x
INTRODUCCION	
1. MARCO TEORICO	1
1.1. DIABETES	1
1.1.1. INTRODUCCION	1
1.1.2. DEFINICIONES GENERALES	3
1.1.3. TIPOS DE DIABETES	5
1.1.4. POSIBLES COMPLICACIONES A LARGO PLAZO	6
1.1.4.1. DEPRESION	6
1.1.4.2. PROBLEMAS OCULARES	7
1.1.4.3. PROBLEMAS RENALES	10
1.1.4.4. PROBLEMAS DE LOS PIES	11
1.1.4.5. PROBLEMAS CARDIOVASCULARES	14
1.1.4.6. OTROS PROBLEMAS	16
1.1.5. MEJORAMIENTO DEL CONTROL DE LA DIABETES	16
1.1.6. ESTRATEGIA NACIONAL	17
1.1.7. TERAPIA FARMACOLOGICA	18
1.1.7.1. SULFONILUREAS	18
1.1.7.2. BIGUANIDAS	19
1.1.7.3. INHIBIDORES DE LA α -GLICOSIDASA	20
1.1.7.4. TIAZOLIDINEDIONAS	20
1.1.7.5. ACARBOSA-GLUCOBAY	21
1.1.8. BIOMODELOS DE INDUCCION A LA HIPERGLICEMIA	22
1.2. INSULINA VEGETAL (<i>Justicia chlorostachya</i>)	24

1.2.1.	HISTORIA DE LA INSULINA VEGETAL	25
1.2.2.	USOS ETNOBOTANICOS ANCESTRALES	25
1.2.3.	CUIDADOS Y CULTIVO	25
1.2.4.	COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DEL GENERO <i>Justicia</i>	26
2.	PARTE EXPERIMENTAL	28
2.1.	LUGAR DE LA INVESTIGACION	28
2.2.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	28
2.2.1.	MATERIAL BIOLOGICO	28
2.2.2.	ESTUDIO FARMACOGNOSICO Y CONTROL DE CALIDAD	30
2.3.	MANEJO ESPECIFICO DEL EXPERIMENTO	31
2.3.1.	OBTENCION DE LA MATERIA PRIMA	31
2.3.2.	ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE	31
2.3.2.1.	UNIDADES DE OBSERVACION	31
2.3.2.2.	GRUPOS DE ESTUDIO	31
2.3.2.3.	CRITERIOS DE INCLUSION	31
2.3.2.4.	PROCESO EXPERIMENTAL	32
2.3.2.5.	ANALISIS ESTADISTICO	33
2.3.2.6.	ESTUDIO DE TOXICIDAD	34
2.3.3.	INVESTIGACION FITOQUIMICA	34
2.4.	METODOS Y TECNICAS	34
2.4.1.	OBTENCION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	34
2.4.2.	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES BASALES	35
2.4.2.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	35
2.4.2.2.	PROCEDIMIENTO	35
2.4.3.	OBTENCION DE SANGRE DE LA VENA SAFENA	36
2.4.3.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	36
2.4.3.2.	PROCEDIMIENTO	36
2.4.4.	DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA	37
2.4.4.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	37
2.4.4.2.	METODO	38
2.4.4.3.	PRINCIPIO DE LA REACCION	38

2.4.5.	INDUCCION DE LA HIPERGLICEMIA	39
2.4.5.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	40
2.4.5.2.	PROCEDIMIENTO	40
2.4.6.	TRATAMIENTO A BASE DEL EXTRACTO	40
2.4.6.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	40
2.4.6.2.	PROCEDIMIENTO	40
2.4.7.	ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA	40
2.4.7.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	40
2.4.7.2.	PROCEDIMIENTO	40
2.4.8.	ESTUDIO HISTOPATOLOGICO	41
2.4.8.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	41
2.4.8.2.	PROCEDIMIENTO	42
2.4.8.3.	PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS	43
2.4.9.	CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA	44
2.4.10.	DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	45
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	51
3.1.	CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA	51
3.1.1.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	51
3.1.2.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	52
3.1.3.	DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES	52
3.2.	TAMIZAJE FITOQUIMICO	53
3.3.	ESTUDIO CROMATOGRAFICO	54
3.4.	ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE	55
3.5.	TOXICIDAD AGUDA Y ESTUDIO HISTOPATOLOGICO	63
4.	CONCLUSIONES	65
5.	RECOMENDACIONES	68
6.	RESUMEN	69
	SUMMARY	70
7.	BIBLIOGRAFIA	71
8.	ANEXOS	

INDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
R	Asignación al azar o aleatorización
G	grupo de sujetos los cuales corresponde a ratones albinos
T	Tiempo de determinación glicemia
X	Tratamiento administrado por vía oral a través de sonda orogástrica
Y	Sobrecarga de Sacarosa administrada
DMNID	Diabetes mellitus no insulino dependiente
EHA de Jc	Extracto Hidroalcohólico de <i>Justicia chlorostachya</i>
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
dL	Decilitros
%H	porcentaje de humedad
%C	Porcentaje de cenizas
H	Horas
Min	Minutos.

INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	Resultados del control de calidad de la materia prima vegetal.	51
CUADRO N° 2	Resultados del screening Fitoquímico.	53
CUADRO N° 3	Resultados del TLC de la fracción fenólica.	54
CUADRO N° 4	Descriptiva estadística de las glicemias a los 30 minutos.	55
CUADRO N° 5	Descriptiva estadística de las glicemias a los 60 minutos.	56
CUADRO N° 6	Descriptiva estadística de las glicemias a los 120 minutos.	56
CUADRO N° 7	Promedio de las glicemias en ayunas.	56
CUADRO N° 8	ANOVA un factor datos agrupados 30 minutos	57
CUADRO N° 9	Prueba Tuckey HSD 99% de confianza 30 minutos	58
CUADRO N° 10	ANOVA un factor datos agrupados 60 minutos	59
CUADRO N° 11	Prueba Tuckey HSD 99% de confianza 60 minutos	59
CUADRO N° 12	ANOVA un factor datos agrupados 120 minutos	61
CUADRO N° 13	Prueba Tuckey HSD 99% de confianza 120 minutos	61

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 2.1	Taxonomía de las animales de experimentación	29
TABLA N° 2.2	Descripción anatómica	29
TABLA N° 2.3	Detalle de condiciones de mantenimiento	29
TABLA N° 2.4	Detalle de grupos experimentales	30
TABLA N° 2.5	Materiales y reactivos para control de calidad y fitoquímico	30
TABLA N° 2.6	Grupos de estudio	31
TABLA N° 2.7	Descripción del diseño experimental	33

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N°1	Disminución porcentual de glucosa en sangre a los 30 min.	58
GRAFICO N°2	Disminución porcentual de glucosa en sangre a los 60 min.	60
GRAFICO N°3	Disminución porcentual de glucosa en sangre a los 120 min.	61
GRAFICO N°4	Actividad hipoglicemiante, Curva de tolerancia a la glucosa.	62
GRAFICO N°5	Variación de la masa corporal vs. Tiempo de estudio toxicidad	64

INDICE DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFIA N°1	Inflorescencia de <i>Justicia chlorostachya</i>	24
FOTOGRAFIA N°2	Ratones de experimentación	28
FOTOGRAFIA N°3	Pesaje de los animales de experimentación	36
FOTOGRAFIA N°4	Materiales para la punción de la vena safena.	37
FOTOGRAFIA N°5	Mecanismo de funcionamiento del biosensor en el glucómetro Prodiges	38
FOTOGRAFIA N°6	Cuarentena en estudio de toxicidad aguda.	41
FOTOGRAFIA N°7	Sacrificio de ratón por asfixia con éter-etílico	42
FOTOGRAFIA N°8	Materiales de disección	42
FOTOGRAFIA N°9	Extracción de órganos farmacocinéticos	43
FOTOGRAFIA N°10	Placas histológicas preparadas para la lectura	44
FOTOGRAFIA N°11	Placas de TLC Donde se evidencia la separación de compuestos flavo-fenólicos sistema de solventes. Acetato de Etilo, Acetona, HAc, H ₂ O 100:5:22:26	44
FOTOGRAFIA N°12	Control de calidad de la materia vegetal	79
FOTOGRAFIA N°13	Obtención de los extractos hidroalcohólico de <i>Justicia chlorostachya</i> .	80
FOTOGRAFIA N°14	Condiciones concentración del extracto	80
FOTOGRAFIA N°15	Obtención de los subextractos	81
FOTOGRAFIA N°16	Materiales para el tamizaje	81
FOTOGRAFIA N°17	Reactivos para el tamizaje	81
FOTOGRAFIA N°18	Reacción positiva para flavonoides	82
FOTOGRAFIA N°19	Reacción positiva para Cianidinas	82
FOTOGRAFIA N°20	Reacción positiva para compuestos fenólicos	82
FOTOGRAFIA N°21	Reacción positiva para flavonoides	83
FOTOGRAFIA N°22	Reacción positiva para alcaloides	83
FOTOGRAFIA N°23	Reacción positiva para saponinas	83
FOTOGRAFIA N°24	Corte Histológico de estómago RG1, HE 10X	86

FOTOGRAFIA N°25	Corte Histológico de Hígado, Parénquima Hepático RG1, HE 40X	86
FOTOGRAFIA N°26	Corte Histológico de Riñón, Túbulos renales RG1, HE 40X	87
FOTOGRAFIA N°27	Corte Histológico de hígado, Parénquima Hepático RG2, HE 40X	87
FOTOGRAFIA N°28	Corte Histológico de estómago RG2, HE 40X	88
FOTOGRAFIA N°29	Corte Histológico de Riñón, Túbulos renales Glomérulo, cápsula de Bowman RG2, HE 40X.	88
FOTOGRAFIA N°30	Corte Histológico de Estómago, mucosa Gástrica glándulas mucosecretoras RG3 HE 40X	89
FOTOGRAFIA N°31	Corte Histológico de Estómago, mucosa Gástrica glándulas mucosecretoras RG3 HE 40X.	89
FOTOGRAFIA N°32	Corte Histológico de Riñón, glomérulo renal, cápsula de Bowman. RG3 HE 40X	90

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1	CAUSAS DE MORTALIDAD EN EL ECUADOR, INEC	78
ANEXO N°2	ESQUEMA DIDACTICO DE LA INHIBICION DE LA α -AMILASA	79
ANEXO N°3	CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA VEGETAL	79
ANEXO N°4	TAMIZAJE FITOQUIMICO	80
ANEXO N°5	VARIAS FOTOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACION	84
ANEXO N°6	LECTURAS HISTOPATOLOGICAS DE LOS ORGANOS FARMACOCINETICOS	86
ANEXO N°7	BASE DE DATOS PARA ANALISIS ESTADISTICO DE LA VARIACION DE MASA CORPORAL DURANTE ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA	91
ANEXO N°8	REPORTE HISTOPATOLOGICO DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD CONFERIDO POR EL DR. OSWALDO DUQUE (ANATOMO-PATOLOGO DE SOLCA CHIMBORAZO).	92
ANEXO N°9	DATOS DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE DE ESTUDIOS REALIZADOS DE <i>Malmea depressa</i> y <i>Morus alba</i>	93

INTRODUCCION

La investigación en plantas, así como la utilización de los recursos del medio ambiente, bajo condiciones de racionalidad tales como mínimo costo y alto grado de satisfacción social, se han convertido, actualmente, en una premisa fundamental que debe ser considerada como lineamiento para orientar el desarrollo en la incorporación sistemática de los conocimientos científicos y tecnológicos a las actividades económicas, sociales y culturales, pues a pesar de la gran utilización de las plantas medicinales por la población, cada vez en aumento, pocas de ellas han sido estudiadas siguiendo métodos científicos válidos y atendiendo a las normas éticas establecidas internacionalmente, ya que si bien el uso popular es un indicador importante, no es garantía de la actividad terapéutica, existiendo, además, factores muy importantes como son las variaciones ecológicas, por las cuales una misma especie puede presentar concentraciones diferentes de los mismos principios activos, debido a que el metabolismo secundario de los vegetales superiores es responsable de la síntesis de sustancias químicas, con poca acción, del propio vegetal, aunque orientadas por las características genéticas de las plantas. Asimismo, la síntesis química de estas sustancias, es controlada por factores del ecosistema (luz, calor, temperatura, humedad y suelo), siendo importante, reconocer que muchas veces no es posible encontrar la misma proporción relativa de esos constituyentes en las mismas especies recogidas en épocas y lugares diferentes (1)

Asimismo, es necesario comprobar el potencial de toxicidad de una planta para su posible aceptación como medicamento, además de garantizar su efecto específico, evaluando la relación riesgo/beneficio, en la especie humana, siguiendo las normas éticas. La experimentación animal debe preceder a la evaluación de la planta medicinal en la especie humana, aunque éste sea el objetivo final de la validación. En cuanto a la especie humana, es preciso considerar la susceptibilidad individual a los fármacos, la reacción a los placebos y a la capacidad de autosugestión, para que puedan ser debidamente evaluados los efectos de una planta medicinal utilizada como medicamento. Asociando estas variables a las enfermedades, de intensidades diferentes, o de causas diferentes, es fácil imaginar que el tratamiento humano con una planta, sin control de calidad y sin la determinación de su actividad farmacológica, puede llevar a cualquier resultado ineficaz o hasta tóxico. (2)

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos remotos como nuevos agentes terapéuticos y sus usos han sido transmitidos de generación en generación, bien en forma oral o escrita, hasta nuestro días y es esto lo que se conoce como la "práctica terapéutica tradicional o conocimiento etnobotánico", el empleo de extractos o principios activos de las plantas, la cual ha sido importante en el cuidado de la salud de la población en el primer nivel de atención. (38)

La utilización de las plantas medicinales ha estado asociado a las prácticas médico-religiosas, a la charlatanería y al fraude, lo que ha ocasionado que en muchos casos se sobrevaloren y se les asignen una multitud de propiedades. (39)

Tanto los países desarrollados como los que se encuentran en vías de desarrollo han aumentado la utilización de las plantas medicinales o productos derivados de éstas, si bien las causas son diferentes. Los primeros principalmente por tratarse de una moda y los segundos por necesidad. Tanto en unos como en otros se ha presentado el uso abusivo, lo que ha traído consigo un aumento, en la actualidad, en el interés científico y en la comprobación científica de las propiedades atribuidas a las plantas medicinales. (38)

La Fitoterapia constituye el eslabón esencial como coadyudante en el control de muchas patologías crónicas entre ellas la diabetes. Los primeros testimonios que se conocen sobre el tratamiento de la diabetes se refieren al uso de las plantas. El papiro de Ebers (1550 a.C) recomendaba el uso de una dieta rica en fibra y ocre. Otras civilizaciones han preconizado multitud de plantas para el tratamiento de la diabetes. La mayor parte de estos remedios han desaparecido en los países occidentales desde la llegada de la insulina, pero en los países subdesarrollados siguen constituyendo la base fundamental del tratamiento de la diabetes. (40)

Sin embargo, en los últimos años, se ha observado un nuevo interés hacia las plantas medicinales como dignas de ser investigadas ya que muchas de las medicinas tradicionales de pueblos primitivos han demostrado tener un fundamento científico al contener principios activos susceptibles de ser aislados y, posteriormente modificados por los químicos médicos. Además, los medicamentos hoy disponibles para el tratamiento de la diabetes, en particular las sulfonilureas, la metformina o las glitazonas

no son capaces de restablecer la normalidad de la homeostasis de la glucosa y aunque compensan parcialmente las alteraciones metabólicas de la diabetes, no corrigen las lesiones bioquímicas subyacentes. Incluso el tratamiento insulínico no restaura completamente la homeostasis de la glucosa en los pacientes con diabetes de tipo I y sin contar que las sobredosis de insulina pueden incrementar el riesgo de aterogenesis y de episodios de hipoglucemia (41)

Aunque es difícil que se encuentre entre las plantas un sustituto de la insulina que sea activo por vía oral, si es posible que se encuentren moléculas que estimulen la biosíntesis y la secreción de la insulina endógena. En los últimos años, estamos asistiendo a un importante desarrollo de la investigación fitoterapéutica de las plantas chinas. Muchas de estas plantas, utilizadas durante milenios, está empezando a desvelar los principios activos responsables de su acción, y estos principios están siendo caracterizados y estudiados farmacológica y clínicamente (40)

Más de 400 plantas y extractos de plantas han sido descritos como beneficiosos para el paciente diabético. Aunque en la mayor parte de los casos, los efectos hipoglucemiantes son anecdóticos y otros muchos casos no se ha investigado científicamente el potencial terapéutico de las mismas, quedan algunos casos en los que, efectivamente, se ha comprobado un efecto real. Por lo tanto, se pueden dividir las plantas supuestamente antidiabéticas en tres grupos: (42)

- Plantas conocidas como hipoglucemiantes en las que se ha caracterizado un componente o una fracción con actividad demostrada (43)
- Plantas que han sido descritas como antidiabéticas pero de las que no se conoce la naturaleza del principio activo (44)
- Plantas supuestamente hipoglucemiantes cuya actividad no ha podido ser establecida de un modo inequívoco (45)

En América del Norte se ha recomendado un extracto de *Ruta graveolens* para el tratamiento de la diabetes, pero su eficacia no ha sido confirmada. La *R. graveolens* se añade en pequeñas cantidades a bebidas y alimentos como condimento, pero su uso en grandes cantidades es irritante para la piel y abortivo, por lo que no se

recomienda a mujeres embarazadas. La *R. graveolens* contiene grandes cantidades de rutina, un principio activo beneficioso para los pacientes con desórdenes cardiovasculares además de diabetes. En América de Norte también se utiliza el té de estragón (*Artemisia dracunculus*) que también contiene elevadas proporciones de rutina.

En Europa, las infusiones de lengua de pájaro (*Polygonum aviculare*) y otras hierbas de la misma familia han sido descritas como hipoglucemiantes, pero no se han obtenido hasta ahora pruebas de su actividad. El té de Xiaoke, una infusión muy popular en China ha mostrado reducir los niveles de glucosa en animales con diabetes inducida por estreptozotocina, pero no en otros modelos animales.

Otras plantas que tradicionalmente han sido empleadas en la diabetes pero con las que no se han observado efecto apreciables en pruebas de laboratorio incluyen el anacardo (*Anacardium occidentale*), el diente de león (*Taraxacum officinale*), el sambuco (*Sambucus niger*), la salvia (*Salvia officinale*) o el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*). Sin embargo, la ausencia de efectos hipoglucemiantes en un modelo de diabetes no excluye que puedan ser activos en otro modelo

Todas las investigaciones van dirigidas a mejorar la terapia del diabético ya que la diabetes mellitus representa un problema de Salud Pública Mundial y es considerada como una de las enfermedades crónicas con persistencia permanente, con características de epidemia. La OMS estima que en el mundo hay más de 220 millones de personas con diabetes, guarismo que muy probablemente, de no mediar intervención alguna, para 2030 se habrá más que duplicado. Casi el 80% de las muertes por diabetes se producen en países de ingresos bajos o medios. Así mismo, estas investigaciones le asignan a nuestro país, entre el 5.1% y 6%, para la prevalencia de diabetes mellitus en adultos. Según Lassus, el mercado farmacéutico mundial estima un volumen de ventas de medicamentos de US\$ 435,580 millones, de los cuales solamente EE.UU, Japón y Alemania acumularán el 80% del mercado mundial de venta de genéricos, y el restante será distribuido y consumido en el resto de países del planeta. Lo que hace indispensable la búsqueda de medicamentos eficaces, con bajo riesgo y al alcance de la gran mayoría. (26)

Según la Fundación Ecuatoriana contra la Diabetes el número de personas diabéticas en el Ecuador suman ya unas 700.000, aproximadamente. Por tal motivo el 27 de octubre del 2007 las organizaciones científicas, el Ministerio de Salud, y pacientes presentaron un proyecto que impulse la prevención y elementos de autocontrol para un tratamiento adecuado, se espera que se ponga en marcha este cuerpo legal en el congreso nacional (24)

Según el Ministerio de Salud Pública, la diabetes es la tercera causa de muerte en el país. “El diabético no controlado se expone a muchas complicaciones”. La retinopatía diabética, que llega a causar ceguera; la neuropatía diabética, que aumenta el riesgo de úlceras en los pies; la insuficiencia renal y cardiopatías son las principales amenazas que rondan a los diabéticos. (25)

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que afecta a adultos, jóvenes y niños y comprende una serie de trastornos metabólicos que comparten la característica común de la hiperglucemia, por la progresiva incapacidad de las células para utilizar la glucosa, o la incapacidad del páncreas para segregar la hormona insulina requerida. Existen 2 tipos de diabetes mellitus: I y II. Se desconoce la causa exacta de esta enfermedad; sin embargo, como en muchas otras enfermedades, dos factores son muy importantes y tienen funciones críticas: el genético y el ambiental. Asimismo, durante el estrés hay mayor secreción de 4 hormonas que influyen sobre el metabolismo de los carbohidratos: los glucocorticoides y las hormonas tiroideas, que tienden a elevar la glicemia, y el glucagón y las catecolaminas, que estimulan la formación de glucosa hepática a partir de glucógeno, aminoácidos y lactato, disminuyendo la aceptación de glucosa por los tejidos. La diabetes es una enfermedad multifactorial, producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos, y que influye negativamente sobre la calidad de vida de las personas que la sufren. En nuestro país, y en todo el mundo, se asocia a una modificación en el estilo de vida, que lleva un cambio implícito en la alimentación del individuo y una disminución de la actividad física cotidiana; en este contexto, es importante resolver y definir el camino a seguir con nuestro propio estilo de vida, adaptándonos a los cambios inherentes a la globalización que exige competitividad, conocimiento y creatividad, sin perder

nuestra identidad y conservando nuestra salud. Las plantas medicinales con actividad antidiabética, pueden constituir una fuente importante de nuevos compuestos orales hipoglucemiantes, ya sea como compuestos de primera línea, en el tratamiento de la diabetes, o como coadyuvantes de las terapias existentes. Para ello es muy importante, validar científicamente la efectividad y la seguridad. (3) Es por ello que aprovechando el conocimiento etnobotánico ancestral de las personas del oriente Ecuatoriano donde utilizan las partes aéreas de la planta denominada vulgarmente como Insulina (*Justicia chlorostachya*) para el tratamiento de la diabetes.

CAPITULO I

1.- MARCO TEORICO

1.1. DIABETES

1.1.1. INTRODUCCION

La diabetes es un desorden del metabolismo, el proceso que convierte el alimento que ingerimos en energía. La insulina es el factor más importante en este proceso. Durante la digestión se descomponen los alimentos para crear glucosa, la mayor fuente de combustible para el cuerpo. Esta glucosa pasa a la sangre, donde la insulina le permite entrar en las células. (La insulina es una hormona segregada por el páncreas, una glándula grande que se encuentra detrás del estómago). En personas con diabetes, una de dos componentes de este sistema falla (4):

- El páncreas no produce, o produce poca insulina (Tipo I)
- Las células del cuerpo no responden a la insulina que se produce (Tipo II).

Los nuevos criterios para su diagnóstico y clasificación fueron desarrollados casi simultáneamente por un comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y por un comité asesor de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Su clasificación se basa fundamentalmente en la etiología y características fisiopatológicas, pero adicionalmente describe la etapa de su historia natural en la que se encuentra el paciente diabético. Es una enfermedad progresiva dual, caracterizada en primer lugar por resistencia a la insulina, pero también por una falla progresiva de la función de las células β de los islotes pancreáticos. (27)

Existen alrededor de 15 millones de personas con DM (Diabetes Mellitus) en Latinoamérica y se estima que esa cifra llegará a 20 millones en los próximos 10 años, mucho más de lo esperado por el simple incremento poblacional. Dicho comportamiento probablemente se deba a varios factores, entre los cuales destacan la raza, el cambio en los hábitos de vida y el envejecimiento de la población. La

mayoría de la población latinoamericana es mestiza, aunque hay algunos países como Guatemala, Ecuador, Perú y Bolivia, donde más del 40% de sus habitantes son indígenas. Estudios en comunidades nativas americanas han demostrado una alta propensión al desarrollo de DM y otros problemas relacionados con la resistencia a la insulina, que se manifiesta con el cambio de los hábitos de vida, que está ocurriendo de manera progresiva. Se estima que entre un 20 y 40% de la población centroamericana y andina todavía vive en condiciones rurales, pero su acelerada migración urbana probablemente está influyendo sobre la incidencia de la DM. La prevalencia de la enfermedad en zonas urbanas oscila entre un 7% y 8%, mientras que en las zonas rurales es de 1% a 2%. (28)

El aumento de la expectativa de vida también contribuye con el aumento de la DM. En la mayoría de los países latinoamericanos la tasa anual de crecimiento de la población mayor de 60 años es del 3% al 4%. La prevalencia de DM2 en menores de 30 años es menor del 5%, mientras que en mayores de 60 años sube a más del 20%. Por otro lado, la altura parece ser un factor protector, ya que la prevalencia de DM2 en poblaciones ubicadas a más de 3.000 m sobre el nivel del mar, tienen proporcionalmente una prevalencia que es casi la mitad de la encontrada en poblaciones similares, pero ubicadas a menor altura. Otro factor que influye es que la DM2 se diagnostica tardíamente: alrededor de un 30% a 50% de las personas diabéticas desconocen su enfermedad por meses o años y en zonas rurales puede llegar hasta un 100% de los afectados. Los estudios económicos han demostrado que el mayor gasto en atención médica del paciente diabético se da en hospitalizaciones y el mismo se duplica cuando el paciente tiene complicaciones micro o macrovasculares e incluso es cinco veces más alto cuando tiene ambas. La mayoría de las causas de hospitalización en el diabético se pueden prevenir o por lo menos retardar con una buena educación y un adecuado programa de reconocimiento temprano de las complicaciones. La principal causa de muerte de la persona con DM2 es cardiovascular y prevenirla implica un manejo integral de todos sus factores de riesgo. Todos ellos, exceptuando el hábito de fumar, son más frecuentes en los diabéticos y su impacto sobre la enfermedad cardiovascular también es mayor. (27)

1.1.2. DEFINICIONES GENERALES

DIABETES: La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. (16)

GLICEMIA: La glicemia se define como el valor de los niveles de glucosa presentes en un litro de sangre. La glucosa que se mide proviene de los alimentos que son ingeridos por el propio organismo, particularmente los carbohidratos. Este nivel de glucosa o glicemia es nivelada por varias hormonas, pero sin duda la principal es la insulina secretada por el páncreas. La glucosa es trascendental para el desarrollo de las funciones del organismo, pues es una de las fuentes energéticas más importantes. El cerebro y los glóbulos rojos, por ejemplo, dependen totalmente de la glicemia para poder cumplir efectivamente sus roles en el cuerpo. (29)

HIPERGLICEMIA. Por su parte es la alta presencia de glucosa en la sangre y también es un factor influyente en las personas que tiene diabetes y deberá mantenerse controlada. Algunos síntomas incluyen aumento de sed, de hambre, respiración acelerada, náusea o vómito, visión borrosa y resequedad de la boca (28)

HIPOGLICEMIA: es baja presencia de glucosa en la sangre y un factor esencial en las personas con diabetes. Algunos de los indicios de la hipoglucemia son: temblores, mareos, sudoraciones, dolores de cabeza, palidez, cambios repentinos en estados de ánimo, entre otros.

PANCREAS: El páncreas es la glándula abdominal y se localiza detrás del estómago; este posee jugo que contribuye a la digestión, y que produce también una secreción hormonal interna (insulina). La mayor parte del páncreas está formado por tejido exocrino que libera enzimas en el duodeno. Hay grupos de células endocrinas, denominados islotes de Langerhans, distribuidos por todo el tejido que secretan insulina y glucagón. La insulina actúa sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y grasas, aumentando la tasa de utilización de la glucosa y

favoreciendo la formación de proteínas y el almacenamiento de grasas. El glucagón aumenta de forma transitoria los niveles de azúcar en la sangre mediante la liberación de glucosa procedente del hígado (29)

ISLOTES PANCREATICOS Y CÉLULAS BETA: Los islotes de Langerhans o islotes pancreáticos son unos cúmulos de células que se encargan de producir hormonas como la insulina y el glucagón, con función netamente endocrina. Los gránulos insulinógenos secretores de las células beta poseen un centro cristalino electrodenso de forma irregular. Su contenido se separa de la membrana limitante después de la fijación. Su diámetro es similar al de los gránulos de células alfa. La insulina es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso en forma de un polipéptido llamado preproinsulina que se transforma en proinsulina, que posee la misma actividad hormonal aunque no de la misma magnitud que la insulina. La proinsulina se modifica en el aparato de Golgi y las vesículas secretoras que salen del complejo mencionado contienen la hormona insulina. La insulina es secretada en reacción a la hiperglucemia y también por algunas hormonas péptidas como glucagón, colecistocinina-pancreocimina y secretina. Sus acciones principales son estimular la captación de glucosa en varios tipos de células, y disminuir el nivel de glucosa sanguínea, al estimular la conversión de glucosa en glucógeno en los hepatocitos y miocitos, siempre que aumente dicho nivel. (15)

INSULINA: Dentro del páncreas, las células beta producen la hormona insulina. Con cada comida, las células beta liberan insulina para ayudar al organismo a utilizar o almacenar la glucosa sanguínea que obtienen de los alimentos. En las personas que tienen diabetes tipo 1, el páncreas ya no fabrica más insulina. Las células beta han sido destruidas y la persona necesita inyectarse insulina para poder utilizar la glucosa de los alimentos. Las personas con diabetes tipo 2 sí producen insulina, pero el organismo no responde adecuadamente a esa hormona. Algunas personas con diabetes tipo 2 necesitan tomar medicamentos para la diabetes o inyectarse insulina para ayudar a sus organismos a que utilicen la glucosa para obtener energía. La insulina no puede administrarse en pastillas porque se destruiría durante la digestión, al igual que las proteínas de los alimentos. La insulina debe inyectarse en la grasa subcutánea para que penetre en la sangre. Existen muchas

clases de insulina para distintas situaciones y estilos de vida y, dentro de los Estados Unidos, hay más de 20 tipos de insulina disponibles. Esos tipos de insulina difieren en la forma en que están elaborados, la forma en que actúan dentro del organismo y el precio. La insulina se fabrica en el laboratorio para que sea idéntica a la insulina humana, o bien es de origen animal (porcino). La disponibilidad de la insulina de origen animal en el futuro es incierta. (13)

1.1.3. TIPOS DE DIABETES

DIABETES DE TIPO 1: (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia). Se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo 1, y no se puede prevenir con el conocimiento actual. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas pueden aparecer de forma súbita. (2)

DIABETES DE TIPO 2: (también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta). Se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones. Hasta hace poco, este tipo de diabetes sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños. (2)

DIABETES GESTACIONAL: Es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por vez primera durante el embarazo. Sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo 2, pero suele diagnosticarse mediante las pruebas prenatales, más que porque el paciente refiera síntomas. El deterioro de la tolerancia a la glucosa y la alteración de la glucemia en ayunas son estados de transición entre la normalidad

y la diabetes, y quienes los sufren corren mayor riesgo de progresar hacia la diabetes de tipo 2, aunque esto no es inevitable. (2)

1.1.4. POSIBLES COMPLICACIONES A LARGO PLAZO

El control de la diabetes requiere esfuerzo y disciplina a diario. Quizás, de vez en cuando, el paciente se sienta incapaz de hacer frente a la situación, y eso puede dar lugar a que sufra una depresión. Saber cómo tratar con tales sentimientos y de qué tipo de ayuda dispone es importante. El padecer diabetes desde hace años provoca daños físicos a los vasos sanguíneos y nervios muchas de las veces irremediables. Las complicaciones resultantes de estos daños pueden afectar a ojos, riñones, pies y corazón; además de poder sufrir otras complicaciones, como dificultades sexuales. Se puede tomar medidas prácticas para reducir el riesgo de sufrir complicaciones : por ejemplo, manteniendo los niveles de glucosa dentro de los rangos recomendados, manteniendo un peso saludable, comiendo sano, haciendo ejercicio, tomando la medicación, y acudiendo a revisión y a otras citas médicas. Estar atento a los síntomas de las complicaciones permitirá detectar los problemas precozmente y, si se desarrollan complicaciones, es de utilidad que se sepa qué tratamientos dispone y que le depara el futuro. (30)

1.1.4.1. DEPRESION

La depresión es frecuente entre las personas que padecen diabetes y esto se debe en parte a la presión constante de controlar la enfermedad y, en parte, debido a la amenaza, actual o futura, de complicaciones a largo plazo. Sentirse deprimido puede hacer que el paciente deje de cuidar de sí mismo. Por ello es importante reconocer los síntomas pronto y evitar que las cosas empeoren. Si el paciente se siente deprimido, quizás le ayuden las asistencias socio psicológicas y la medicación antidepressiva. (30)

Aunque la depresión no es una complicación directa de la diabetes, como si lo son por ejemplo los problemas renales, la depresión es muy frecuente entre las personas que padecen diabetes. Alrededor de una de cada cinco personas que padecen diabetes sufre depresión. La depresión puede ser problemática si padece diabetes,

ya que al estar deprimido, se sentirá frecuentemente cansado y desmotivado, y eso puede hacer que no controle los niveles de glucosa en sangre con regularidad, que no coma a las horas adecuadas o que no tome sus tabletas o insulina correctamente. Si se está muy deprimido quizás crea que no tiene sentido cuidar de si mismo. (2)

CAUSAS

Cuando padece diabetes el paciente puede sentirse deprimido porque (2):

- Se la acaban de diagnosticar y está preocupado y asustado por efecto que pueda tener la diabetes en su vida.
- Está cansado de tener que tratar con su diabetes todos los días
- Cree que la diabetes se le escapa de control porque sus acciones no parecen tener efecto.
- Quizás deba realizar un gran cambio en su tratamiento por ejemplo de pasar de tomar tabletas a inyectarse insulina.
- Le han dicho que tiene síntomas de las complicaciones a largo plazo.
- Sufre las complicaciones avanzadas de la diabetes.

PREVENCION Y TRATAMIENTO

Las actividades que eleven la autoestima pueden ayudar a prevenir la depresión. Para algunas personas esto puede implicar el contacto social con amigos y familiares, y para otros podría significar pasar tiempo solo dedicándose a una afición que lo disfrute, y aplique ayuda psicológica y terapéutica.(2)

1.1.4.2. PROBLEMAS OCULARES

RINOPATIA DIABETICA

La retinopatía diabética es una complicación ocular de la diabetes que está causada por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina. El daño de los vasos sanguíneos de la retina puede tener como resultado que estos sufran una fuga de fluido o sangre. Si la enfermedad avanza se forman nuevos vasos sanguíneos y prolifera el tejido fibroso en la retina, lo que tiene como consecuencia que la visión se deteriore, pues la imagen enviada al cerebro se hace borrosa. (12)

Existen dos tipos o etapas de la retinopatía: no proliferativa o proliferativa.

- La retinopatía diabética no proliferativa se desarrolla primero. Los vasos sanguíneos en el ojo se vuelven más grandes en ciertos puntos (llamados microaneurismas). Los vasos sanguíneos también pueden resultar bloqueados. Puede haber pequeñas cantidades de sangrado (hemorragias retinianas) y se puede escapar líquido hacia la retina, lo cual puede llevar a problemas notorios con la vista. (31)
- La retinopatía proliferativa es la forma más severa y avanzada de la enfermedad. Empiezan a crecer nuevos vasos sanguíneos dentro del ojo, los cuales son frágiles y pueden sangrar (hemorragia). Se pueden presentar pequeñas cicatrices, tanto en la retina como en otras partes del ojo (el humor vítreo). El resultado final es la pérdida de la visión al igual que otros problemas. (31)

CATARATAS

Las cataratas afectan diferentes partes del cristalino, en particular la zona nuclear, la zona cortical y, menos frecuentemente, la región subcapsular. Se han descrito dos tipos de cataratas en diabetes; metabólicas (o en copo de nieve) y seniles. Las primeras se producen en jóvenes o incluso niños que tengan hiperglucemias extremas. Tienen forma de copo de nieve y comienzan en la región subcapsular del cristalino. Las de tipo senil aparecen más a menudo en el paciente de la tercera edad y son similares a las de los no diabéticos. (32)

Muchos diabéticos experimentan también problemas transitorios de visión (usualmente miopía), problemas relacionados con las alteraciones de los electrolitos y fluidos debidos a un control inadecuado de la diabetes y que usualmente revierten cuando mejora la situación glucémica. (31)

Se han descrito varios mecanismos implicados en la formación de cataratas. El más aceptado concierne al metabolismo de los polioles ya que este tipo de alcoholes así como la enzima aldosa reductasa se acumulan en el tejido del cristalino. En las cataratas producidas por diabetes experimentales en animales o por un exceso de galactosa en la dieta, se observa la acumulación de sorbitol y galactitol (el

polialcohol derivado de la galactosa) y este proceso puede ser inhibido por la administración de inhibidores de la aldosa reductasa (pero sólo durante la primera fase de inducción de la cataratogénesis). Se ha sugerido que la acumulación de estos polialcoholes que son difícilmente transportables fuera de las células del cristalino) podrían producir unas condiciones de hipertoniá con un hinchamiento de las células que distorsionaría las propiedades de conducción de la luz de las mismas. La evidencia de que los polioles intervengan en las cataratas de la diabetes en humanos es mucho menos convincente. Aunque las concentraciones de sorbitol en el cristalino de los sujetos con diabetes son más elevadas que las de los sujetos normales, no son suficientes como para causar efectos osmóticos significativos. Además, los estudios clínicos realizados con el sorbinil, primer inhibidor de la aldosa reductasa utilizado en el hombre, no mostraron ningún efecto preventivo o terapéutico sobre las cataratas del diabético. (32)

Un mecanismo que explicaría mejor génesis de las cataratas del diabético podría ser la glicación no enzimática de proteínas. Las proteínas del cristalino son de las proteínas más duraderas del organismo y no hay mecanismo celulares de renovación de las mismas. Con la edad, estas proteínas van formando agregados y estructuras de alto peso molecular con lo que se modifican las propiedades de transmisión de la luz. La glicación no enzimática y el gradual oscurecimiento de las proteínas del cristalino están acelerados en la diabetes. En la diabetes experimental en la rata se ha observado como el grado de hiperglucemia está correlacionado con la glicación de los agregados proteicos del cristalino. En la diabetes humana también hay un aumento de la glicación de las proteínas del cristalino dos veces mayor que en los controles no diabéticos. Es interesante destacar que los inhibidores de la aldosa reductasa han mostrado disminuir la glicación de las proteínas tal como indica la reducción de la pentosidina (un marcador de la glicación proteica). De esta manera, parece ser que la vía metabólica de los polioles está conectada de alguna manera con la glicación no enzimática. (12)

La glicación no enzimática puede ocasionar degeneración del cristalino, bien por entrecruzamiento de las proteínas transparentes de este, bien por generación de radicales libres. La importancia de estos dos mecanismos ha sido estudiada por

Lyons y colaboradores habiendo observado que los productos de autorización se mantienen al mismo nivel en diabéticos y no diabéticos, mientras que los marcadores de la glicación no enzimática (pentosidina y fructosalisina) están aumentados con los diabéticos. (2)

1.1.4.3. PROBLEMAS RENALES

Los daños renales que pueden darse si padece diabetes desde hace muchos años, se conoce con el nombre de nefropatía. Los síntomas rara vez aparecen hasta que el daño es extenso, así que se utilizan análisis de orina y de sangre para detectar los problemas precozmente. Un buen control de los niveles de glucosa en sangre y de la presión sanguínea pueden ayudar a evitar que la nefropatía progrese hasta una etapa en la que se pierdan grandes cantidades de proteína en la orina, lo que sería indicativo de daños renales que pueden dar lugar a un fallo renal terminal y a la necesidad de diálisis o de un trasplante de riñón. (30)

La diabetes es una enfermedad que impide que el cuerpo use glucosa (azúcar) de forma adecuada. Si la glucosa se queda en la sangre en lugar de metabolizarse, puede provocar toxicidad. El daño que el exceso de glucosa en sangre causa a las nefronas se llama **nefropatía diabética**. Si se mantienen las concentraciones de glucosa en la sangre, en su rango normal (60-110 mg/dL) se puede demorar o prevenir la nefropatía diabética. Además otra definición podría ser que la nefropatía diabética es un trastorno o patología del riñón, incluyendo procesos inflamatorios, degenerativos y escleróticos. (33)

Estadio I. No provoca síntomas. Existe hiperfiltración glomerular y los análisis de orina y creatinina son normales. Tampoco hay alteraciones histológicas **Estadio II.** Aparece aproximadamente después de 5 años de evolución. Es silente. Mantiene función renal normal y no hay pérdida de albúmina. Alteraciones mínimas en el glomérulo como inicio de engrosamiento de membranas basales o ligero aumento de la matriz mesangial. **Estadio III.** Presencia de microalbuminuria (más de 30 mg de albúmina en 24 horas o 20 mg/litro de orina). La creatinina en sangre es normal. La hipertensión arterial asociada puede empeorar la lesión renal. Expansión mesangial y de las membranas basales. **Estadio IV.** Proteinuria persistente, disminución la función renal. Creatinina sérica en límites altos de lo normal o

elevados (mayor o igual de 1.3 mg/dl en la mujer o varones de menos de 65 kg de peso o mayor o igual 1.5 mg/dl en varones). Puede presentarse como síndrome nefrótico. Histología: glomerulosclerosis parcheada. Engrosamiento de membranas basales. Expansión mesangial. Aparición después de 15 años del diagnóstico. Se asocia a retinopatía en más del 75%, coronariopatía en más del 45% y enfermedad cerebro vascular en más de 25% de los casos. **Estadio V.** Proteinuria. Creatinina mayor de 200 μ mol/litro o 2.2 mg/dl, Hipertensión arterial. Glomerulosclerosis, lesiones nodulares, fibrosis intersticial, atrofia tubular. Aparición en general después de 20 años de evolución (17)

PREVENCION DE LA NEFROPATIA DIABETICA

Todas las personas con diabetes deben someterse a un chequeo médico anual para hacerse examinar la sangre y la orina en búsqueda de signos de posibles problemas renales. En lo posible, las personas con enfermedad renal deben evitar los medios de contraste que contengan yodo, dado que éstos son eliminados a través de los riñones y pueden empeorar la función renal. Ciertas pruebas imagenológicas usan estos tipos de tintes o medios de contraste. En caso de que se tengan que usar, se deben administrar líquidos a través de una vena durante varias horas antes del examen, lo cual permite su rápida eliminación del cuerpo. Los antiinflamatorios no esteroides (AINES) normalmente usados, incluyendo ibuprofeno, naproxeno e inhibidores de COX-2 recetados como el celecoxib (Celebrex), pueden lesionar el riñón debilitado. Siempre se debe hablar con el médico antes de usar cualquier fármaco. (34)

1.1.4.4. PROBLEMAS DE LOS PIES

Cuando padece diabetes, los problemas de los pies pueden ser provocados por daños en los nervios de sus piernas (Neuropatía periférica) o por la reducción del flujo sanguíneo que llega a sus pies (Isquemia Periférica). Si se sufre uno de estos problemas o ambos, se tendrá una mayor incidencia a padecer problemas asociados, como úlceras en los pies, pie de charcot, e infecciones graves como la gangrena. (16)

NEUROPATIA PERIFERICA E ISQUEMIA PERIFERICA

Es un problema con los nervios que llevan la información hasta y desde el cerebro y la médula espinal al resto del cuerpo. Esto puede producir dolor, pérdida de la sensibilidad y una incapacidad para controlar los músculos. (30)

La neuropatía periférica puede ser heredada o adquirida. Las causas de la neuropatía periférica adquirida incluyen una lesión física (trauma) a un nervio en nuestro caso el causado por el estrés glicosídico en la irrigación nerviosa lo que desensibiliza a la extremidad inferior especialmente, tumores, toxinas, respuestas auto-inmunes, deficiencias nutritivas, alcoholismo o desórdenes vasculares o metabólicos. Las enfermedades sistémicas-trastornos que afectan al cuerpo entero-frecuentemente causan neuropatía periférica. Estos trastornos pueden incluir: (16)

Trastornos metabólicos y endocrinológicos. Los tejidos nerviosos son muy vulnerables al daño causado por enfermedades que afectan la capacidad del cuerpo para transformar materias nutritivas en energía, procesar desperdicios, o fabricar las sustancias que componen los tejidos vivientes. La diabetes mellitus, que está caracterizada por niveles de glucosa crónicamente altos, es una de las causas principales de neuropatía periférica en los Estados Unidos. Alrededor del 60 al 70 por ciento de las personas con diabetes padecen de formas entre suaves y severas de daño al sistema nervioso. (30)

Los trastornos del riñón pueden conducir a cantidades excesivamente altas de sustancias tóxicas en la sangre, provocando severos daños a los tejidos nerviosos. La mayoría de los pacientes que requieren diálisis como resultado de una falla de los riñones, desarrollan polineuropatía. Algunas enfermedades del hígado también causan neuropatías como resultado de fallas en el equilibrio de las sustancias químicas. (12)

Los desequilibrios hormonales pueden trastornar los procesos metabólicos y causar neuropatías. Por ejemplo, una producción baja de hormonas tiroideas provoca lentitud en el metabolismo, produciendo retención de líquidos e hinchazón de los

tejidos, los que pueden presionar los nervios periféricos. La sobreproducción de la hormona del crecimiento puede conllevar a la acromegalia, una condición que se caracteriza por el crecimiento anormal de algunas partes del esqueleto, incluyendo las articulaciones. Los nervios que cursan junto a las articulaciones afectadas a menudo quedan atrapados. (2)

El daño vascular y las enfermedades de la sangre pueden disminuir el suministro de oxígeno a los nervios periféricos, lo que rápidamente produce daño grave o la muerte de los tejidos nerviosos, en la misma forma en que la falta de oxígeno en el cerebro puede causar un accidente vascular cerebral. La diabetes con frecuencia conlleva a la constricción de los vasos sanguíneos. Varias formas de vasculitis (inflamación de los vasos sanguíneos) con frecuencia causan endurecimiento y engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos, los que desarrollan tejido cicatrizal, disminuyendo su diámetro e impidiendo el flujo de la sangre. Esta categoría de daño neuronal, en la cual se produce daño en nervios aislados en distintas áreas, se llama mononeuropatía multiplex o mononeuropatía multifocal. (35)

Los trastornos del tejido conectivo e inflamación crónica pueden causar daño directo e indirecto al tejido conectivo. Cuando las capas múltiples de tejido protector que envuelven los nervios se inflaman, la inflamación puede pasar directamente a las fibras nerviosas. La inflamación crónica también conlleva a la destrucción progresiva del tejido conectivo, lo que hace que las fibras nerviosas se hagan más vulnerables a las heridas por compresión y a las infecciones. Las articulaciones pueden inflamarse e hincharse, comprimiendo los nervios y causando dolor aún más intenso.(35)

Las neuropatías hereditarias más comunes son un grupo de trastornos a los que se conoce como enfermedad Charcot-Marie-Tooth. Estas neuropatías son el resultado de fallas en los genes responsables de la producción de neuronas o de la cobertura de mielina. Las características de una típica enfermedad de Charcot-Marie-Tooth incluyen debilidad extrema y adelgazamiento de los músculos en las extremidades inferiores y los pies, anormalidad en la marcha, pérdida de reflejos de los tendones y entumecimiento de las extremidades inferiores. (30)

1.1.4.5. PROBLEMAS CARDIOVASCULARES:

La diabetes está muy ligada a una presión sanguínea alta y a la hiperlipemia, que además de ser problemas cardiovasculares (del corazón y del sistema circulatorio) en si mismas. También son importantes factores de riesgo para la aparición de otros problemas, como por ejemplo la enfermedad coronaria, la apoplejía, y la enfermedad vascular periférica (30)

PRESION SANGUINEA ALTA

Cuando las arterias están rígidas y son estrechas, la sangre se ve forzada a circular por un espacio menor y a una mayor presión, en esto consiste la hipertensión. Como la hipertensión es la causa principal de otras complicaciones propias de la diabetes como los problemas oculares, renales, enfermedad coronaria, apoplejía y la enfermedad vascular periférica. La prevención y tratamiento de la hipertensión resulta esencial. La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en las personas que padecen diabetes tipo 2. (30)

HIPERLIPEMIA

Se trata de un nivel anormalmente elevado de grasas en sangre, y esta es una de las causas principales de la enfermedad coronaria, la apoplejía y la enfermedad arterial periférica, es más común en personas con diabetes tipo 2. (17)

ENFERMEDAD CORONARIA

La enfermedad de las arterias coronarias (EAC) es el tipo más común de enfermedad cardíaca. Es la principal causa de muerte entre los hombres y las mujeres en los Estados Unidos. La EAC ocurre cuando las arterias que suministran la sangre al músculo cardíaco se endurecen y se estrechan. Esto se debe a la acumulación de colesterol y otros materiales llamados placa en la capa interna de las paredes de la arteria. Esta acumulación se llama arterioesclerosis. A medida que esta avanza, fluye menos sangre a través de las arterias. Como consecuencia, el músculo cardíaco no puede recibir la sangre o el oxígeno que necesita. Eso puede conducir a dolor en el pecho (angina) o a un infarto. La mayoría de los infartos

ocurren cuando un coágulo súbitamente interrumpe el suministro de sangre al corazón, causando un daño cardíaco permanente. Con el tiempo, la EAC también puede debilitar el músculo cardíaco y contribuir a la presencia de insuficiencia cardíaca y arritmias. Insuficiencia cardíaca significa que el corazón no puede bombear la sangre adecuadamente al resto del cuerpo. Las arritmias son cambios en el ritmo normal del corazón. (36)

APOPLEJIA

Una apoplejía es la muerte súbita e instantánea de células cerebrales tras una interrupción de la circulación de la sangre en el cerebro. Las apoplejías isquémicas se producen normalmente cuando un coágulo de sangre obtura alguno de los vasos sanguíneos del cerebro, provocando un cese temporal o permanente del suministro de oxígeno al cerebro. Es la forma más común de apoplejía, ya que supone un 80% de los casos. Las apoplejías hemorrágicas suponen el 20% restante y se producen por la ruptura de un vaso sanguíneo en el cerebro, que provoca un derrame en el tejido cerebral y deja sin oxígeno a algunas zonas del cerebro. Dependiendo del área del cerebro afectada, una apoplejía puede provocar una parálisis en brazos, piernas y músculos faciales, debilidad, pérdida de visión y de habla, inconsciencia o incluso la muerte. (12)

ENFERMEDAD VASCULAR PERIFERICA

La enfermedad vascular periférica (EVP) consiste en un daño u obstrucción en los vasos sanguíneos más alejados del corazón: las arterias y venas periféricas. Las arterias y venas periféricas transportan sangre hacia y desde los músculos de los brazos y las piernas y los órganos del abdomen. La EVP puede también afectar a las arterias que llevan sangre a la cabeza. Cuando la EVP afecta sólo a las arterias y no a las venas, se denomina «enfermedad arterial periférica» (EAP). Los principales tipos de EVP son los coágulos sanguíneos, la hinchazón (inflamación) y el estrechamiento y la obstrucción de los vasos sanguíneos. (36)

1.1.4.6. OTROS PROBLEMAS

LIPO HIPERTROFIA

La Lipohipertrófia se refiere a la piel dura y aterronada en los lugares de inyección de la insulina. (17)

DISFUSION ERECTIL

También conocida con el nombre de impotencia, es la incapacidad de conseguir o mantener una erección con la que pueda producirse una relación sexual. Este problema afecta a uno de cada tres hombres que padecen diabetes, y se va haciendo más frecuente a mayor edad. (30)

NEUROPATIA AUTONOMA.

Es un grupo de síntomas que ocurren cuando hay daño a los nervios que controlan funciones corporales cotidianas como la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la evacuación de los intestinos y de la vejiga y la digestión. (16)

1.1.5. MEJORAMIENTO DEL CONTROL DE LA DIABETES

A pesar de todos los avances en el tratamiento de la diabetes, la educación del paciente sobre su propia enfermedad sigue siendo la herramienta fundamental para el control de la diabetes. La gente que sufre de diabetes, a diferencia aquellos con muchos otros problemas médicos, no puede simplemente tomarse unas pastillas o insulina por la mañana, y olvidarse de su condición el resto del día. Cualquier diferencia en la dieta, el ejercicio, el nivel de estrés, u otros factores puede afectar el a nivel de azúcar en la sangre. Por lo tanto, cuanto mejor conozcan los pacientes los efectos de estos factores, mejor será el control que puedan ganar sobre su condición. También es necesario que la gente sepa qué puede hacer para prevenir o reducir el riesgo de complicaciones de la diabetes. Por ejemplo, se estima que con un cuidado correcto de los pies, se podría prescindir de un 75% de todas las amputaciones en personas con diabetes. Aunque las clases de educación sobre diabetes proporcionan información general útil, en el Diabetes and Hormone Center

of the Pacific por lo que cada paciente debería recibir una educación a medida de sus necesidades concretas. (4)

1.1.6. ESTRATEGIA NACIONAL

Se promueve más atención y cambio en estilos de vida. Con más de 180 millones de diabéticos, y previsiones de que esta cifra crecerá a más del doble dentro de las próximas dos décadas, esta enfermedad es una de las mayores amenazas para la salud pública de la población mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que la prevalencia de la diabetes entre la población adulta alcance un 6,4% para 2030, un 60% más que en 1995.

La magnitud del problema requiere de grandes medidas poblacionales que logren reducir los niveles de obesidad, así como la inactividad física. En Ecuador no existen cifras oficiales sobre la prevalencia de este padecimiento. Las que recoge el Ministerio de Salud Pública (MSP) no son representativas, pues se limitan a los ingresos por complicaciones relacionadas con la diabetes, en sus centros de salud. En el departamento de Estadísticas del Teodoro Maldonado Carbo, por ejemplo, solo llevan registro del número de consultas que atienden los endocrinólogos, no los clasifican por patología. “La diabetes es la enfermedad más frecuente en endocrinología”, afirma la Dra. Leonor Torresano, quien labora en el hospital. María Fernanda López, presidenta de la Asociación Ecuatoriana de Diabetes, lamenta que “pese a ser una de las principales causas de muerte en el país (tercera), no tenemos ayuda estatal”. En el sistema de salud público, la diabetes está clasificada dentro del Grupo de Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT), junto con la hipertensión, diabetes, insuficiencia renal, obesidad y dislipemias (alteraciones de los niveles de grasa en la sangre). El Programa de Enfermedades Crónicas no Transmisibles, del MSP, es el que traza los lineamientos contra este mal. También recae bajo su competencia la prevención de los factores de riesgo para las enfermedades isquémicas del corazón, como mala alimentación, sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo “*En estos últimos años hemos trabajado sobre este nuevo problema de la salud pública. Ahora pasamos a la implementación con una fase de capacitación y educación*”, indica la Dra. Margarita Rodríguez, responsable del Programa. La estrategia está dirigida a

“cambiar un poco la mentalidad de la población, para mejorar lo que es alimentación, actividad física, dejar de fumar, ingerir alcohol”, explica. Pero no esperan resultados inmediatos del plan preventivo. “No se verán en uno o dos años, sino en diez. Lo que sí es inmediato es para quienes ya tienen diabetes. Para este año, solo en medicamentos ya vamos a hacer la primera adquisición de casi un millón”. Para el caso de personas sin seguro médico, el MSP está coordinando su gestión con un comité nacional para “poder cubrirlos de la manera más eficiente”.

(5)

1.1.7. TERAPIA FARMACOLOGIA

Los hipoglucemiantes orales abarcan cuatro familias de drogas bien definidas:

- ✚ Sulfonilureas
- ✚ Biguanidas
- ✚ Inhibidores de las α - glucosidasas
- ✚ Tiazolidinedionas

1.1.7.1. SULFONILUREAS

El mecanismo de acción de estas drogas comprende efectos pancreáticos y extrapancreático. Los primeros incluyen un aumento de la estimulación a las células β del páncreas para la liberación de insulina, este efecto se produce por un bloqueo de la bomba K-ATPasa lo que se traduce en una despolarización prolongada de la membrana celular, con el consiguiente ingreso del Ca^{++} extracelular provocando la liberación de la insulina de los gránulos secretorios hacia el torrente sanguíneo. Al comienzo del tratamiento los niveles de insulina en sangre se elevan y la glucemia desciende, en tanto que con la administración crónica de sulfonilureas, los valores de insulina disminuyen hasta cifras pre-tratamiento, y se conservan valores reducidos de glucosa en plasma, el mecanismo íntimo de este proceso se desconoce en la actualidad, pero se supone que se debe a un aumento de la sensibilidad de los tejidos diana a la acción de la insulina, debido a la normalización de la glucemia y al predominio de los efectos extrapancreáticos (13)

Los efectos extrapancreáticos comprenden fundamentalmente un aumento de los receptores de insulina en monocitos, eritrocitos y adipocitos; aumentan el efecto de la insulina y el número de transportadores para dicha hormona, producen inhibición de la gluconeogénesis hepática y aumento del consumo de glucosa a nivel periférico. La vía de administración es la oral. La absorción de todas, excepto glimepirida (2), se altera con la presencia de alimentos en el tubo digestivo por lo cual se recomienda, para las de acción corta, la administración de la droga 30 minutos antes de las comidas. Las sulfonilureas circulan unidas en forma variable (70-99 %) a proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina. El metabolismo es fundamentalmente hepático, excepto la cloropropamida que se metaboliza escasamente (menos del 1%); la excreción es fundamentalmente renal. (13)

1.1.7.2. BIGUADINAS

Dentro de esta familia de fármacos, se encuentra los agentes fenformina, buformina (ambas retiradas del mercado farmacéutico por sus graves efectos adversos) y metformina³. El mecanismo de acción fundamental es la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el incremento de la glucólisis anaeróbica, con la consiguiente elevación de alanina, glicerol y ácido láctico. Otro mecanismo implicado es la disminución de la absorción intestinal de glucosa. La metformina se administra por vía oral, se absorbe en el intestino delgado. Su $V_{1/2}$ es de 1.3 - 4.5 horas. La droga no se une a las proteínas plasmáticas y se excreta sin cambios por la orina. Dentro de los efectos adversos los más frecuentes son de tipo gastrointestinal (20 % de los pacientes), estos incluyen diarreas (30%), náuseas, vómitos, anorexia y sabor metálico^{1,2}. El efecto adverso de mayor riesgo es la acidosis láctica, que alcanza una mortalidad de hasta el 50 %³, con una incidencia menor al 0,1/1000 pacientes/año. Las principales interacciones farmacológicas se presentan con la cimetidina y con el alcohol. En el primer caso se produce una competencia con la excreción renal, por lo que aumenta la concentración de metformina y debe ajustarse la dosis. En el segundo caso se potencia el efecto hiperlactacidémico por lo cual debe evitarse la administración conjunta. (14)

Su principal indicación la constituyen los pacientes con DMNID y obesidad, que no responden a la dieta ni al ejercicio físico⁹. Se las puede utilizar sola o combinada

con sulfonilureas o insulina. Las contraindicaciones son similares a las de las sulfonilureas, pero se agregan enfermedad cardiovascular grave, úlcera Gástrica Duodenal, deficiencia de Vitamina B 12, hierro y ácido fólico. (13)

1.1.7.3. INHIBIDORES DE LA α -GLUCOSIDASA

Dentro de este grupo se encuentran el miglitol y la acarbosa. El mecanismo de acción fundamental es la inhibición reversible y competitiva de las α -glucosidasas en el borde en cepillo de la mucosa intestinal, produciendo el retraso en la absorción de los hidratos de carbono complejos, con la consiguiente reducción del pico máximo de glucemia postprandial. Su utilización es más eficaz cuando se realiza conjuntamente a una dieta rica en fibras y reducido en glucosa y sacarosa. Los efectos adversos más frecuentes incluyen malabsorción, flatulencia, meteorismo (21-32%), cuando se administra como monodroga no se presenta hipoglucemia. Constituyen contraindicaciones para su utilización las enfermedades intestinales crónicas, el embarazo, lactancia, cirrosis hepática, insuficiencia renal con niveles de creatinina superiores a 2 mg/dl. Su principal indicación la constituyen pacientes con DMNID con valores de glucemia basales entre 140-180 mg/dl y glucemias postprandiales elevadas (entre 180-250 mg/dl), o aquellos casos en que exista contraindicación para el uso de sulfonilureas o metformina. (15)

1.1.7.4. TIAZOLIDINEDIONAS

Dentro de este grupo se encuentran la troglitazona, la pioglitazona y la ciglitazona, la primera fue retirada del mercado por sus efectos hepatotóxicos. El mecanismo de acción de estos fármacos se lleva a cabo mediante la unión al subtipo γ del receptor nuclear de proliferación activado por peroxisomas (PPAR γ), produciendo de esta manera un aumento en la transcripción de genes de las enzimas que normalmente son inducidas por la insulina, esta acción se lleva a cabo fundamentalmente en el tejido muscular y graso, todo esto se traduce en un aumento de la utilización periférica de glucosa. Otro mecanismo descrito es la inhibición de la gluconeogénesis hepática. (16)

La vía de administración es oral, circulan unidas a proteínas principalmente (99 %) albúmina plasmática y se metabolizan por conjugación en sulfoconjugados, ácido glucurónico y quinonas. Se excreta fundamentalmente por vía biliar, por lo cual no se altera con la insuficiencia renal. Se asocia la troglitazona con daño hepatocelular leve en un 2%, otros efectos adversos son las molestias gastrointestinales, reducción ligera de los niveles de hemoglobina, cardiomegalia sin hipertrofia del ventrículo izquierdo. Su principal indicación son los pacientes con DMNID con predominio de resistencia a la insulina, especialmente cuando existe intolerancia o contraindicación para el uso de metformina. (17)

1.1.7.5. ACARBOSA (GLUCOBAY DE 50 mg BAYER)

La acarbosa es una pseudotetramaltosa de origen microbiano utilizada en la diabetes para retrasar la absorción de los hidratos de carbono y evitar los picos post-pradiales de glucosa. (48)

El mecanismo de acción de la acarbosa se basa en la inhibición de las enzimas presentes en la membrana mucosa del intestino delgado (alfa-glucosidasas) implicadas en la degradación de los disacáridos, oligosacárido y polisacáridos de los alimentos. Esto lleva al retraso de la digestión de los carbohidratos siempre en función de la dosis. En consecuencia, la glucosa procedente de estos carbohidratos se libera con mayor lentitud y pasa a la sangre más lentamente. De esta forma la acarbosa disminuye o inhibe el aumento de la glucemia y de la insulina endógena después de las comidas. Gracias a la absorción retardada del azúcar disminuyen las fluctuaciones de la glucemia y las glucemias medias disminuyen a lo largo del día. (49)

Farmacocinética: tras la administración oral de 200 mg en voluntarios, aproximadamente un 2% de la dosis administrada se absorbe de forma inalterada en el tracto gastrointestinal, sin que ello produzca ningún efecto sistémico. Los productos de degradación absorbidos, después de la degradación enzimática por las enzimas digestivas y las bacterias intestinales, constituyen globalmente el 35% de la dosis administrada. Tanto la acarbosa como sus productos de degradación

absorbidos se eliminan rápida y completamente por los riñones. Al cabo de 96 horas se recuperan un 51 % de la dosis administrada, en las heces. (50)

Posología: Los comprimidos deben ingerirse con poca cantidad de agua inmediatamente antes de las comidas o con el primer bocado de éstas. *Esquema terapéutico aconsejado:* En el inicio, 1 comprimido de 50 mg con el primer bocado del desayuno, almuerzo y cena o 1/2 comprimido de 100 mg con el primer bocado del desayuno, almuerzo y cena. *Dosis máxima:* 2 comprimidos de Glucobay de 50 mg antes del desayuno, almuerzo y cena, o 1 comprimido de 100 mg con el primer bocado del desayuno, almuerzo y cena. Ocasionalmente, puede ser necesario incrementar la dosis hasta 2 comprimidos de 100 mg, 3 veces al día. La dosis se puede aumentar al cabo de 4-8 semanas si el paciente muestra una respuesta clínica insuficiente en la última fase del tratamiento. Si, pese a cumplir rigurosamente la dieta, aparecen síntomas molestos, no debe incrementarse más la posología sino, en todo caso, reducirse. La dosis media es de 300 mg de acarbosa al día (corresponde a 3 por 2 comprimidos de 50 mg de acarbosa al día o 3 por 1 comprimido de 100 mg de acarbosa al día). (51)

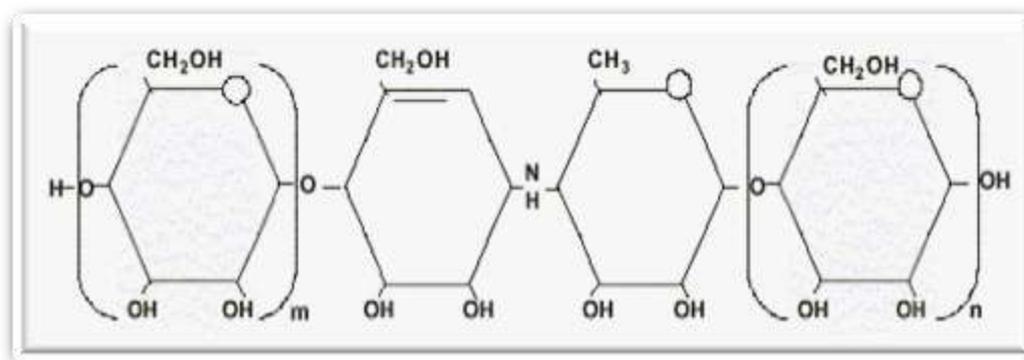


FIGURA N° 1 Acarbosa

FUENTE: http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol12_1_01/f0406101.gif

1.1.8. BIOMODELOS DE INDUCCION A LA HIPERGLICEMIA TEMPORAL Y PERMANENTE

Se sabe que los modelos animales utilizados en las investigaciones sobre la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), ayudan al estudio de los mecanismos patogénicos que conducen a la presentación de esta enfermedad, acompañada de severa o moderada

hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y otras alteraciones metabólicas relacionadas con la misma, y dan la oportunidad de explorar nuevos tratamientos y formas de prevenir estos cuadros. Estos biomodelos contribuyen al estudio de los mecanismos que originan esa afección y son de gran utilidad para los investigadores de esta rama de la Endocrinología, aunque no constituyan un reflejo exacto de esta enfermedad en el hombre. (37)

ADMINISTRACION DE SUSTANCIAS QUIMICAS

La administración de estreptozotocina (STZ) o alloxán, en altas dosis, induce severa insulinodeficiencia y hasta cetosis, mientras que las bajas dosis causan una parcial reducción de la masa de células β , lo cual puede aprovecharse para producir un estado diabético sin tendencia a la cetosis. La STZ es preferida por su mayor acción citotóxica, pero la sensibilidad varía según la especie animal, la línea, el sexo, la edad y el estado nutricional.²¹ En los recién nacidos, ambas sustancias pueden ser inyectadas alternativamente. Cuando se administran durante la primera semana de vida, provocan la enfermedad tardíamente. Si la STZ es inoculada por vía intravenosa (100 mg/kg) el primer día del nacimiento, las células β se destruyen aunque aproximadamente la mitad se regenera gradualmente. En relación con los métodos quirúrgicos, la pancreatectomía parcial puede provocar un estado de diabetes hipoinsulinémica. Se debe extirpar aproximadamente el 90 % de la glándula para lograr un incremento estable y moderado de la glucemia. (37)

LESIONES EN EL HIPOTALAMO VENTRO MEDIAL

La administración de electrolitos en la zona ventro medial hipotalámica causa lesiones que provocan hiperfagia, hiperinsulinemia y obesidad. Tras un período inicial de sensibilidad al aumento de la insulina, se desarrolla el estado de resistencia, especialmente al nivel muscular.²³ Cuando se administran en el núcleo paraventral inducen hiperfagia, obesidad y, algunas veces, intolerancia moderada a la glucosa.

ALTERACIONES DIETETICAS

El consumo de alimentos enriquecidos con grasas saturadas o azúcares simples, como la sacarosa, puede acrecentar la concentración de insulina y aumentar su deposición en el tejido adiposo lo que reduce la sensibilidad a la insulina y la intolerancia a la glucosa en los tejidos. La aparición de la diabetes evidente requiere de una susceptibilidad genética, presente en los roedores desérticos ADAPTADOS y en las ratas diabéticas Cohen. En los neonatos tratados con STZ o en los que se han producido lesiones en el hipotálamo, al ser alimentados con dietas de alto contenido en grasas se realzan los rasgos diabéticos. (37)

SOBRECARGA DE SACAROSA

Esta prueba trata de medir la capacidad de nuestro organismo para metabolizar la sacarosa un disacárido constituido de d-fructosa y d-glucosa, y con ello evaluar dos parámetros conjuntos: el primero la capacidad de intervención antagonista a nivel de absorción intestinal al competir por el sitio activo de enzimas digestivas de carbohidratos como lo es la α -amilasa que permite desdoblar carbohidratos complejos hasta su forma asimilable como monosacáridos, y segundo evaluar la capacidad de permanencia de glucosa en sangre la cual puede estar determinada por diversos parámetros metabólicos uno de los mas importantes es su paso al interior de las células somáticas para convertirse en la principal fuente de energía. (37)

1.2. INSULINA VEGETAL

(Justicia chlorostachya)



FOTOGRAFIA N°1 *Inflorescencia de Justicia chlorostachya*

FUENTE: Pazmiño C.

1.2.1. HISTORIA DE LA INSULINA VEGETAL

Planta nativa del oriente ecuatoriano, utilizada comúnmente para tratar desórdenes glicémicos en pacientes con diabetes su descripción botánica es la siguiente:

Nombre vulgar: INSULINA

Nombre científico: *Justicia chlorostachya Leonard*

Familia: Acanthaceae

Parte usada: Partes aéreas, hojas y tallos. Con usos hipoglucemiantes.

1.2.2. USOS ETNOBOTANICOS ANCESTRALES

Usos etnobotánicas de plantas del genero *Justicia*. El género *Justicia* que también es identificado como *Jacobinia*, incluye a plantas perennes nativas de América tropical de hojas verdes ovaladas, con los nervios bien marcados y con flores tubulares rosas, naranjas o rojo pálido. Pertenece a la familia Acanthaceae con más de 600 especies reconocidas.

Esta planta ya se utilizaba desde tiempos prehispánicos para problemas relacionados con el flujo menstrual, disentería, contra la sarna y como estimulante; en la actualidad, tiene un uso ritual en comunidades indígenas de la huasteca que consiste en bañar con al agua macerada de la planta a un niño recién nacido cuando cumple siete días; los demás asistentes también deben realizarlo. A esta ceremonia se le conoce como “baño de los siete días”. (21)

Probablemente sea relacionado al uso que se le da a la planta de purificador de la sangre. Recordemos que la Medicina indígena se ocupa no sólo de los padecimientos físicos sino además de los espirituales, que en nuestra época, tiene mucho que ver con todos los padecimientos ahora ya comunes con que vivimos día a día. El principal uso que le damos en Microdosis es para la anemia y para fortalecer al sistema inmunológico. (23)

1.2.3. CUIDADOS Y CULTIVO:

CUIDADOS

Mucha luz filtrada o a pleno sol, pero protegida del sol más intenso. Temperatura ambiental normal con un periodo de reposo de 13° C a partir del final de la floración hasta que aparezca la nueva vegetación. Mantenga el sustrato húmedo pero sin saturarlo en la época de crecimiento. Riegue menos el periodo de reposo. Si se supera los 13° C, coloque la maceta en una bandeja con piedras mojadas para conservar la humedad. Aplique un fertilizante líquido normal cada 2 semanas a la planta en crecimiento activo. Conservación: Corte las yemas terminales con regularidad para que la planta siga arbustiva. Sustitúyala por un esqueje arraigado cuando se disperse, por lo general después de 2 años. (22)

CULTIVO

En países con las cuatro estaciones en primavera mediante estaca miento de los tallos.

1.2.4. COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD FARMACOLOGIA DEL GENERO *Justicia*:

El género *Justicia* ha sido objeto de una considerable preocupación por los químicos. Entre los constituyentes más importantes se ha identificado la presencia de lignanos y saponinas con posibles efectos inhibidores de la fertilidad en las mujeres. El naphthalide lignano se ha asociado con actividad antidepresiva y antiarrítmica. En algunas especies se han aislado varias aminas aromáticas, kaempferol, esteroides, ácido salicílico y alcohol alifático. Los estudios químicos del género *Justicia* son todavía incipientes en relación con su uso como alucinógeno; algún trabajo ha reportado la presencia de tryptaminas. Los análisis preliminares de *Justicia pectoralis* demuestran la presencia de esteroides, mucílagos y un aceite esencial. (22) En la Amazonia venezolana los "curiosos" o curanderos emplean las hojas de "camaguari" en forma de tabaco en sus ceremonias curativas (Delascio, 1984). Los indígenas del Vaupés y el Alto Amazonas utilizan la decocción de toda

la planta en las afecciones pulmonares y especialmente en las neumonías; también la consideran como un buen expectorante. Entre los Andokes del río Caquetá esta planta es muy importante en las prácticas curativas siendo empleada en el tratamiento de varias enfermedades. *J. pectoralis* var. *stenophylla* forma parte de las mezclas de drogas alucinógenas Empleadas por varios grupos indígenas de la Amazonia, especialmente por los Waika o Yanomami de Venezuela y Brasil. (23)

CAPITULO II

2.- PARTE EXPERIMENTAL

2.1.- LUGAR DE LA INVESTIGACION.

La presente investigación fue llevada a cabo en el Bioterio, Laboratorio de Fotoquímica, Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la **ESPOCH**.

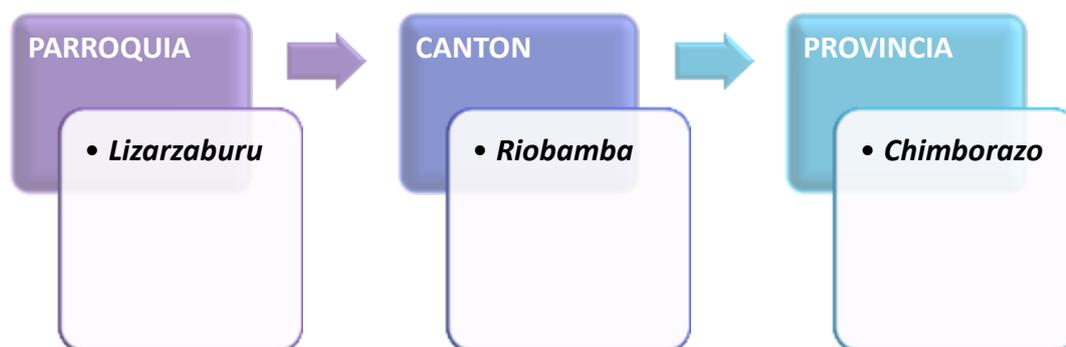
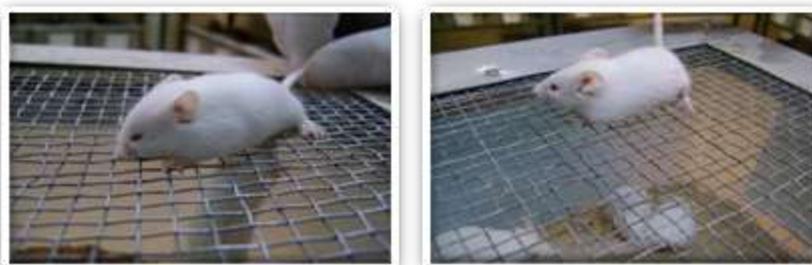


FIGURA N° 2. Lugar de investigación

2.2.- MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

2.2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

- **Población:** Ratones albinos (*Mus musculus*) provenientes del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.



FOTOGRAFIA N° 2: Ratones De Experimentación ESPOCH 2011

FUENTE: Pazmiño C.

- **TAXONOMIA**

TABLA 2.1 *Taxonomía de los animales de experimentación empleados en el estudio Farmacológico*

Reino:	<i>Animalia</i>
Filo:	<i>Chordata</i>
Clase:	<i>Mamalia</i>
Orden:	<i>Rodentia</i>
Familia:	<i>Muridae</i>
Género:	<i>Mus</i>
Especie:	<i>musculus</i>

- **DESCRIPCIÓN**

TABLA 2.2 *Descripción Anatómica*

Nomenclatura	CrI: (WI)BR
Edad	3-3.5 meses
Sexo	Machos
Peso Promedio	35 g
Lugar de Nacimiento	Bioterio Esc. BQF

- **CONDICIONES**

TABLA 2.3 *Detalle de condiciones de mantenimiento*

Humedad Relativa	55±10%
Temperatura	22±2°C
Periodo	12 Horas luz – 12 Horas Oscuridad

- **VALORES REFERENCIALES DE GLUCEMIA**

Suero, plasma ratas (ayunas) 80-110 mg/dL (Según Charles River, 1984)

- **MUESTRA**

12 (experimentos netos), 4 (grupo Blanco), 4 (grupo control positivo), 4 (grupo control negativo).

• **TRATAMIENTOS:**

TABLA 2.4 *Detalle de grupos Experimentales*

RG1	X1	Solución salina NaCl 0.9%
RG2	X2	Solución de Acarbosa 0.71mg/Kg
RG3	X3	Dosis uno (15 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG4	X4	Dosis dos (30 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG5	X5	Dosis tres (60 mg/kg/día) del extracto H.A
RG6	-	Ningún Tratamiento

2.2.2. MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL ESTUDIO FARMACOGNOSICO Y CONTROL DE CALIDAD.

TABLA 2.5 *Materiales y Reactivos para Control de calidad fisicoquímico y estudio Fitoquímico*

MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
Balones Aforados de 10, 25, 50, 100 mL	Agua destilada	Rotavapor
Balones Esmerilados de 500 mL	Alcohol 96°	Bomba para vacio
Vasos de Precipitación de 100, 250, 500 mL	Hexano	Estufa
Probetas de 25, 50, 100 mL	Éter de Petróleo	Mufla
Pipetas graduadas de 10mL	Anhídrido acético	Balanza Analítica
Matraz Erlenmeyer de 250mL	Acido Acético	Peachímetro
Cápsulas de Porcelana	Acetona	Refractómetro
Crisol	Acido Fórmico	Congeladora
Picetas	Cloroformo	Revelador Luz U.V.
Embudos	Hidróxido de amonio	Molino
Embudos de separación	Acido Clorhídrico conc.	
Trípodes	Acido Sulfúrico conc.	
Espátula	Acetato de etilo	
Varillas	Reactivo de Dragendorf f	
Tubos de ensayo	Reactivo de Mayer	
Gradilla	Reactivo de Wagner	
Papel aluminio	Reactivo de Baljet	
Cámara Cromatográfica	Reactivo de Boutrager	
Pipetas Pasteur	Cloruro férrico 5%	
Capilares de Vidrio	Hidróxido de sodio	
Placas de Sílice Gel 60F254	Hidróxido de potasio	
Refrigerante	Cloruro de sodio	
Mangeras	Solución de Gelatina al 1%	
Revelador	Magnesio metálico	
	Alcohol Amílico	
	Reactivo de Sudan III	
	Metanol	

2.3. MANEJO ESPECIFICO DEL EXPERIMENTO

2.3.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

El material vegetal de *Justicia chlorostachya*, se recolectó en el cantón La SHELL, Provincia del Tena a los 1100 msnm con una Humedad Relativa del 70% y temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.3.2. ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE

2.3.2.1. UNIDADES DE OBSERVACIÓN

Ratones (*Mus musculus*) inducidas hiperglucemia mediante Sobrecarga de sacarosa, con aplicación posterior a base de extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya*.

2.3.2.2. GRUPOS DE ESTUDIO

TABLA 2.6 Grupos de estudio

GRUPOS	TRATAMIENTO	DETALLE DEL TRATAMIENTO
RG1	X1	Solución salina NaCl 0.9%
RG2	X2	Solución de Acarbosa 0.71mg/Kg
RG3	X3	Dosis uno (16 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG4	X4	Dosis dos (32 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG5	X5	Dosis tres (64 mg/kg/día) del extracto H.A
RG6	-	Ningún Tratamiento

2.3.2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratones (*Mus musculus*) sanos
- Sexo Masculino
- En intervalo de 3-5 meses
- Pesos corporales entre 35 ± 5 g

2.3.2.4. PROCESO EXPERIMENTAL

Para el estudio se utilizó ratones machos con un peso promedio de 35 ± 5 g los cuales fueron mantenidos en cuarentena 3 días antes de empezar el estudio con libre disposición de agua y alimentos, controlando la temperatura y ciclos circadianos de doce horas luz, doce horas oscuridad. Doce horas antes del estudio se les retiró el alimento y dispusieron de agua *ad libitum*. Transcurridas las doce horas de ayuno se evaluó su glicemia inicial, para lo cual se extrajo sangre por medio de punción de la vena safena y se evaluó a través de tiras reactivas utilizando el glucómetro PRODIGY para su lectura. Posterior a la evaluación de la glicemia inicial (T0 en el diseño experimental) de todos los animales pertenecientes a los 6 grupos de estudio, se procedió a la administración de los tratamientos por vía oral de acuerdo con el siguiente esquema:

RG6	-	Sin tratamiento
RG1	X1	Solución salina NaCl 0.9%
RG2	X2	Solución de Acarbosa 0.71 mg/Kg
RG3	X3	Dosis uno (16 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG4	X4	Dosis dos (32 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG5	X5	Dosis tres (64 mg/kg/día) del extracto H.A

Una vez administrado los tratamientos a los grupos de estudio se procedió a inducir la Hiperglicemia, media hora después de la administración de los tratamientos (Xn en el diseño experimental) se administró, por vía oral una solución de sacarosa a razón de 4000 mg/Kg. Posteriormente se evaluó la glicemia a los treinta, sesenta y ciento veinte minutos, después de la sobrecarga de Sacarosa.

TABLA 2.7 Descripción del diseño experimental

GRUPO S DE TRABA JO	Evaluaci ón Glicemia Previa	Tratamiento de administració n del extracto	Tratamiento de sobrecarga de Sacarosa (4g/Kg)	TIEMPO DE EVALUACION (H)		
				0.5	1	2
RG1	T0	-	Y1	T1	T2	T3
RG2	T0	X0	Y1	T1	T2	T3
RG3	T0	X1	Y1	T1	T2	T3
RG4	T0	X2	Y1	T1	T2	T3
RG5	T0	X3	Y1	T1	T2	T3
RG0	T0	-	-	T1	T2	T3

FUENTE: Carlitos Pazmiño Ch.

Donde:

R= Para asignación al azar o aleatorización.

G= Para determinar el grupo de sujetos los cuales corresponde a ratones albinos con un peso entre 30-40 g, que han sido ambientados en el área de cuarentena durante tres días de adaptación, con libre acceso de agua y alimentación además de temperatura controlada. Doce horas antes del experimento los alimentos deben ser retirados permitiendo al animal agua *ad libitum*

T= Tiempo de determinación glicemia

X= Tratamiento administrado por vía oral a través de sonda orogástrica.

Y= Sobrecarga de sacarosa administrada media hora después de la administración del tratamiento específico de cada grupo, a una razón de 4g/Kg de peso. Por vía oral ayudado de una sonda orogástrica.

- Ausencia de estímulo o tratamiento corresponde al grupo control negativo.

2.3.2.5. ANALISIS ESTADISTICO

Se trabajó con un diseño experimental de series cronológicas múltiples compuesto de: 1) Un grupo control positivo, 2) un grupo control negativo, 3) tres grupos de

estudio y 4) Un grupo Blanco o Testigo. Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y controles fueron determinados mediante ANOVA un factor con datos agrupados, permitiéndonos con ello, evaluar la existencia de heterogeneidad de los grupos con respecto al factor respuesta (Glicemia), y posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples a un intervalo de confianza del 99% empleando la prueba de Tuckey HSD, lo que permitió evaluar que grupos son similares y diferentes con respecto a los tratamientos.

2.3.2.6. ESTUDIO DE TOXICIDAD

Se realizó el estudio de toxicidad Aguda, para lo cual se administró por vía oral a los individuos las dosis antes mencionadas cada día (durante 14 días), y se evaluó su comportamiento, estado físico general (características organolépticas, peso del animal). Cabe recalcar que durante estos 14 días de estudio el animal dispuso de alimento y agua *ad libitum*. Finalizado los 14 días de estudio se procedió a realizar las necropsias de los órganos farmacocinéticos más importantes de cada fitotratamiento, siendo entre ellos: *riñón, hígado, estómago*. Con los cuales se realizó el estudio histopatológico para investigar daño a nivel tisular.

2.3.3. INVESTIGACION FITOQUIMICA

Se realizó el tamizaje Fitoquímico de la planta con el objetivo de buscar grupos de metabolitos secundarios con un potencial interés farmacológico.

2.4. METODOS Y TECNICAS

2.4.1. OBTENCION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Justicia chlorostachya*:

Se obtuvo el extracto Hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* diariamente por digestión con Alcohol al 96° durante media hora. Posteriormente se filtró, concentró a sequedad y se reconstituyó en Agua destilada hasta obtener una solución final al 5% de la especie vegetal estudiada. Se colocó la solución en un frasco ámbar para proceder con su administración.

2.4.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES BASALES

2.4.2.1. MATERIALES

- Material biológico (Ratones (*Mus musculus*) procedentes del Bioterio
- Balanza ADAM AQT-1500
- Tiras reactivas PRODIGE
- Glucómetro PRODIGE
- Algodón
- Suero fisiológico.
- Marcadores indelebles.
- Lancetas o Agujas de jeringa N°3

2.4.2.2. PROCEDIMIENTO:

Previo a la realización del experimento se observó las condiciones previas sometiéndoles a los ratones seleccionados aleatoriamente a un tiempo de ambientación por 3 días aproximadamente para que se acostumbren a la alimentación y condiciones del medio en el que se encuentra. Sometiéndoles al posible control de temperatura y libre acceso de agua y alimentos. Diariamente a las ratas se les proporciona de comida 2.5 pellets por cada una, cuyo análisis del alimento proporcionado por el proveedor cumple con los siguientes parámetros: proteína cruda mínimo 22%, grasa cruda mínima 6.5%, fibra cruda mínimo 5%, para garantizar una dieta equilibrada y nutritiva.

Los parámetros que se debe considerar como condiciones basales son:

- Un estado de salud óptima (ausencia de heridas, malformaciones, etc.)
- Peso corporal entre 35 ± 5 g
- Glicemia entre 80-110 mg/dL (según Charles River, 1984.)



FOTOGRAFIA N° 3: *pesaje de los animales de experimentación.*

FUENTE: Pazmiño C. 2011

2.4.3. OBTENCION DE SANGRE DE LA VENA SAFENA

2.4.3.1. MATERIALES

- Lancetas
- Material biológico (Ratones Albinos)
- Algodón
- Alcohol 70°

2.4.3.2. PROCEDIMIENTO

Inmovilizar al ratón, por la técnica de manipulación con la mano izquierda, ubicar la vena safena (parte interna de la pata posterior), desinfectar la zona con alcohol antiséptico (no en abundancia), y realizar una punción segura, descartar la primera gota de sangre y colocar la siguiente en la tira reactiva. Limpiar la zona lacerada con alcohol antiséptico y practicar hemostasia por presión con apósito. Esperar que el animal se recupere totalmente para regresarlo a su jaula.



FOTOGRAFIA N° 4: *Materiales para punción de la vena safena*

FUENTE: Pazmiño C; 2011

2.4.4. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

2.4.4.1. MATERIALES

- Tiras Reactivas para Glucómetro PRODIGE
- Glucómetro PRODIGE
- Estándar de Calibración

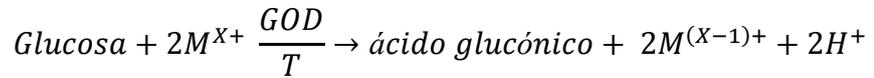
2.4.4.2. MÉTODO

La glucosa en la sangre se mide mediante una corriente eléctrica que se produce al mezclar la muestra de sangre con el reactivo que se encuentra en la tira reactiva, dicho reactivo contiene a la enzima **GLUCOSA OXIDASA** inmovilizada en la tira, sustancias mediadoras, que se comportan como agentes oxidantes ante la Glucosa (metales con estados de oxidación variable), y un transductor que permite cambiar la bioseñal en una señal electrónica. La corriente eléctrica cambia con la cantidad de glucosa en la muestra de sangre. El glucómetro PocketTM de Prodigy mide la resistencia de la corriente eléctrica, calcula el nivel de glucosa en la sangre y muestra el resultado en mg/dL o mmol/L. (54)

2.4.4.3. PRINCIPIO DE LA REACCIÓN

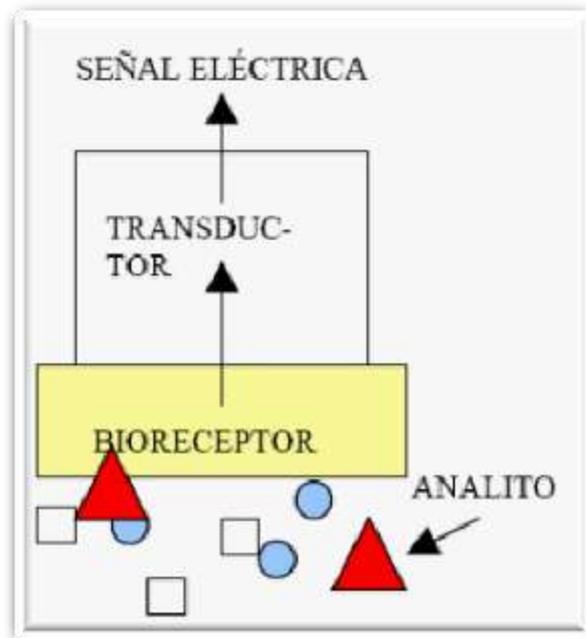
$E_{\text{pila}} = E_{\text{indicador (Biosensor)}} - E_{\text{referencia}}$

E indicador



$$\Delta E \approx [\text{glucosa}]$$

E referencia = Calomel saturado.



FOTOGRAFIA N° 5, Mecanismo de funcionamiento del biosensor del Glucómetro PRODIGE

FUENTE: <http://www.nib.fmed.edu.uy/Sciarra.pdf>

2.4.5. INDUCCION DE LA HIPERGLICEMIA POR SOBRECARGA DE SACAROSA

2.4.5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Material Biológico (Ratones albinos)
- Sacarosa (Solución al 60% m/v)
- Agua destilada
- Balones de Aforo
- Reverbero

2.4.5.2. PROCEDIMIENTO

Para la consecución del estado hiperglicémico experimental en los especímenes se administra a los animales por vía oral una solución de sacarosa al 60% en una relación de 4g/Kg. (CYTED)

Cuando se alcanzan niveles de glucosa en sangre superiores a 200 mg/dL se considera hiperglucemia. (6)

2.4.6. TRATAMIENTO A BASE DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Justicia chlorostachya*

Se realizó un tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* en tres dosis diferentes, se evaluó el nivel de glucosa a los 30, 60 120 minutos después de administrado el tratamiento, según se detalla en la **Tabla 2,7** perteneciente al diseño experimental empleado

2.4.6.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Material biológico (Ratones Albinos)
- Extracto Hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya*
- Cánulas orogástricas.
- Acarbosa (Glucobay) 50 mg
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL
- Balanza
- Suero Fisiológico
- Jeringas de insulina
- Lancetas
- Glucómetro

2.4.6.2. PROCEDIMIENTO

Administrar por vía oral en función del peso del animal, el extracto, Acarbosa 2 mg y Suero Fisiológico con la utilización de cánulas orogástrica para lo cual los animales deben ser sometidos a un ayuno previo durante 12 horas y evaluados inicialmente su glicemia. Siguiendo el siguiente Protocolo:

RG6	-	Sin tratamiento
RG1	X1	Solución salina NaCl 0.9%
RG2	X2	Solución de Acarbosa 0.71mg/Kg
RG3	X3	Dosis uno (16 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG4	X4	Dosis dos (32 mg/Kg/día) del extracto H.A
RG5	X5	Dosis tres (64 mg/kg/día) del extracto H.A

2.4.7. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA

2.4.7.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Material biológico (Ratones Albinos)
- Extracto Hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya*
- Cánulas orogástricas.
- Acarbosa (Glucobay) 50 mg
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL
- Balanza
- Suero Fisiológico
- Jeringas de Insulina

2.4.7.2. PROCEDIMIENTO

A cada grupo de ratones (4 por grupo) se les administrara por vía oral el extracto de *Justicia chlorostachya* a las dosis determinadas en el estudio de actividad hipoglicemiente, esto se realizará diariamente durante 14 días y se evaluará, estado físico, características organolépticas de los animales, masa corporal.



FOTOGRAFIA N° 6: *Grupos de experimentación en Cuarentena-Estudio de Toxicidad.*

FUENTE: Pazmiño C.

2.4.8. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Para verificar los efectos toxicológicos que puede presentar como producto de la administración de las dosis estudiadas, sobre los órganos farmacocinéticos mas importantes (ESTOMAGO, HIGADO, RIÑON), se realizó el Análisis histopatológico de los sujetos de cada uno de los grupos, cuyo trabajo fue realizado gracias a la colaboración del Dr. Oswaldo Duque (PATOLOGO SOLCA-RIOBAMBA) y al Dr. Javier Robles (BQF SOLCA-RIOBAMBA). (Ver Anexo 5)

2.4.8.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Material Biológico
- Equipo de disección
- Alcohol antiséptico.
- Formol al 10 %
- Micrótopo
- Dispensador de Parafina
- Estufa memmert 32-153L
- Microscopio CLX-300
- Hematoxilina-eosina

2.4.8.2. PROCEDIMIENTO EXTRACCION DE ORGANOS.

Sacrificar a los animales de estudio. Efectuar la disección con material estéril.



FOTOGRAFIA N° 7: *Sacrificio de ratón por asfixia con éter etílico*

FUENTE: Pazmiño C.



FOTOGRAFIA N° 8: *Material de disección.*

FUENTE: Pazmiño C.

Extraer cuidadosamente el estómago, hígado y riñón sin romperlos y observar su morfología macroscópica.



FOTOGRAFIA N°9: *Extracción de órganos farmacocinéticos.*

FUENTE: Pazmiño C.

Colocar los órganos en un vial estéril con formol buferado bien rotulado. Colocar los animales y todos los materiales en una bolsa de bioseguridad, cerrar y desechar adecuadamente.

2.4.8.3. PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS-TECNICA HISTOLOGICA TINCION HEMATOXILINA.EOSINA.





FOTOGRAFIA N°10: *Placas Histológicas Preparadas para la lectura.*

FUENTE: Pazmiño C.

2.4.9. CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA

2.4.9.1. DETERMINACION DE HUMEDAD

Se peso 2 gramos de material vegetal fresco en una cápsula de porcelana previamente tarada. Se colocó en una estufa a $103^{\circ}\text{C}\pm 2$ por un lapso de 2 a 3 horas. Se enfrió en el desecador a temperatura ambiente y se peso.

FORMULA:

$$\%H = 100 - \left(\frac{M1-M2}{m1-m} * 100 \right) \text{ Ec. 1.1}$$

Donde:

m = masa de la capsula tarada

m1= masa de la capsula con la muestra

m2 = Masa de la capsula con la muestra después del calentamiento

2.4.9.2. DETERMINACION DE CENIZAS TOTALES.

Se colocó la cápsula con la muestra seca resultado de la determinación del contenido de humedad, en un mechero y en la sorbona, para calcinar hasta ausencia de humos. Luego se transfirió la cápsula a la mufla y se incineró a $500-550^{\circ}\text{C}$, hasta obtener cenizas libres de residuo carbonoso. Se secó la cápsula y se colocó en desecador, se enfrió y pesó.

FORMULA:

$$\%C = \left(\frac{M1-M2}{m1-m} * 100 \right) \text{ Ec. 1.2}$$

Donde:

m = masa de la capsula tarada

m1= masa de la capsula con la muestra antes de la incineración

m2 = Masa de la capsula con la muestra después del calentamiento después de la incineración

2.4.9.3. DETERMINACION DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA.

A las cenizas Totales se añadió de 15 a 20 mL de agua. La capsula se tapó y se puso a hervir suavemente directo a la llama del quemador durante 5 minutos. La solución se filtró a través de papel filtro libre de cenizas determinadas o declaradas. El papel con el residuo se transfirió a la cápsula inicial, se carbonizó en un quemador y luego se incineró en un horno mufla a 500-550 °C, durante dos horas. Posteriormente se enfrió en el desecador hasta temperatura ambiente y se pesó.

$$\%C = \left(\frac{M1-M2}{m1-m} * 100 \right) \text{ Ec. 1.3}$$

Donde

m = masa de la capsula tarada

m1= masa de la cápsula con la muestra antes de la incineración

m2 = Masa de la cápsula con la muestra después del calentamiento después de la incineración

2.4.9.4. DETERMINACION DE CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHIDRICO

A las cenizas totales se añadió de 15 a 20 ml de HCl 10%. La cápsula se tapó y se puso a hervir suavemente directo a la llama del quemador durante 5 minutos. La solución se filtró a través de papel filtro libre de cenizas determinadas o declaradas. Se lavó el residuo con agua caliente hasta que muestre negativo la prueba con AgNO₃ 0.1N. El papel con el residuo se transfirió a la cápsula inicial, se carbonizó en un quemador y luego se incineró en un horno mufla a 500-550 °C, durante dos

horas. Posteriormente se enfrió en el desecador hasta temperatura ambiente y se pesó.

$$\%C = \left(\frac{M1-M2}{m1-m} * 100 \right) \text{ Ec. 1.4}$$

Donde

m = masa de la capsula tarada

m1= masa de la capsula con la muestra antes de la incineración

m2 = Masa de la capsula con la muestra después del calentamiento después de la incineración

2.4.10. DETERMINACION CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El cribado fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en la materia vegetal, y que por lo general son los responsables de la actividad farmacológica. Las técnicas de determinación más corrientemente utilizadas incluyen la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, antracenos, esteroles insaturados, saponinas, grupos fenólicos

2.4.10.1. FLAVONOIDES

Evaporar el equivalente a 5 gramos de material en una capsula de evaporar en baño de maría.

Se trituró el residuo con 15 ml de éter de petróleo y filtró. Se repitió con volúmenes adicionales hasta que sea incoloro, descartando el extracto. Este método selectivamente remueve materiales grasos solubles tales como: pigmentos, clorofila, resinas, etc., los cuales son solubles y retienen flavonoides, los cuales en general no son solubles en éter de petróleo.

Posteriormente se disolvió el residuo desengrasado en 10 mL de etanol al 80% y se filtró. Se colocó de 1 a 2 mL del filtrado en 3 tubos de ensayo, rotulando al tubo N° 1 como tubo control.

2.4.10.1.1. ENSAYO DE CIANIDINA

Al tubo N° 2 añadir 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y 3-4 virutas de magnesio. Observar la formación de color de (Vede a rojo) al cabo de 10 min.

De haber cambio de color con respecto al tubo control, enfriar y diluir con volúmenes iguales de agua y añada 1 mL de alcohol octílico. Agite y espere que se separe.

El desarrollo de tonalidades rojizas en la capa de octanol es indicativo de flavonoides.

2.4.10.1.2. ENSAYO DE LEUCOANTOCIANIDINA.

Al tubo N° 3 añadir 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado Y calentar en baño María por 5 min. El desarrollo de un color violeta es indicativo de la presencia de leucoantocininas.

2.4.10.2. ANTRACENOS.

2.4.10.2.1. ENSAYO DE BORNTRAGER

Evaporar, el extracto equivalente a 1 gramo de material vegetal hasta sequedad usando Rotavapor. Disolver el residuo 10 mL de agua destilada y filtrar. Agitar el filtrado con 10 mL de tolueno, en embudo de separación y dejar que se separe. Transferir la capa de tolueno a un tubo de ensayo añadir 5 mL de amoniaco y agitar. Observar cambios de color en la capa alcalina, la producción de un color rosado a rojo indica presencia de compuestos antracenicos.

2.4.10.3. TANINOS

2.4.10.3.1. ENSAYO DE LA GELATINA

Evaporar extracto equivalente a 10 gramos de planta hasta sequedad en rotavapor. Al residuo añadir 10 mL de agua destilada caliente. Agitar bien con varilla de vidrio y dejar enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 3 a 4 gotas de NaCl al 10% para salar y precipitar cualquier compuesto no tanino y así evitar resultados falsos positivos. Filtrar y dividir en 4 tubos el tubo uno sirve de control.

Al tubo 2 añadir 4-5 gotas de gelatina al 1%, la formación de un precipitado es indicativo de presencia de taninos.

Al tubo 3 2 añadir 4-5 gotas de gelatina al 1% más NaCl, la formación de un precipitado más abundante que el primero es indicativo de presencia de taninos

Al tubo 4 añadir 3-4 gotas de FeCl₃ 5%. La aparición de colores negro a azul es indicativo de anillo pirogalol, y grisáceo a negro es indicativo de la presencia de catecol. La ausencia de precipitados con gelatina y la aparición de colores con FeCl₃ es indicativo de compuestos fenolicos tipo no taninos.

2.4.10.4. TERPENOS-DETERMINACION CUALTITATIVA DE SAPONINAS Y ESTEROLES INSATURADOS.

2.4.10.4.1. ENSAYO DE ESPUMA.

A 1 gramo de material vegetal seco se añadió agua destilada hasta 1cm sobre el nivel del material.

Agitar fuertemente durante 30 segundos y dejar humedecer por unos 10 minutos, luego agitar durante 30 segundos. Dejar reposar por 3 minutos, la formación y persistencia de espuma es indicativo de la presencia de saponinas

2.4.10.4.2. ENSAYO PARA ESTEROLES.

Se evaporó el equivalente a 10 g de material hasta sequedad en rotavapor. Se añadió 10 mL de éter de petróleo al residuo, revolver por pocos minutos. Dejar sedimentar, decantar y descartar el sobrenadante. Repetir la operación hasta que el éter de petróleo haya removido la mayoría de pigmentos.

Se añadió 10 ml de CHCl₃ y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Se decantó en tubos de ensayo y añadió 100 mg de Na₂SO₄ anhidro, se agito y filtró se dividió el filtrado en tres tubos secos y rotulados, el tubo 1 es el control.

ENSAYO DE LIBERMAN-BUCHARD

Al tubo 2 se añadió 3 gotas de anhidro acético y se agitó, luego se añadió 1 gota de H₂SO₄ conc. y se agitó, el desarrollo de tonalidades rojizas, verdosas o violáceas con respecto al control son indicativo de la presencia de esteroleles.

ENSAYO DE SALKOWSKI

Al tubo 3 se añadió 0.5 mL de H₂SO₄ conc. dejándolo caer por las paredes por el fondo. la formación de un anillo de color rojo en la interface es indicativa de esteroides insaturados.

2.4.10.5. ENSAYO PARA ALCALOIDES

2.4.10.5.1. ENSAYO PRELIMINAR

Se evaporó el extracto equivalente a 25 g de material vegetal hasta sirope. Se añadió 10 mL de HCl 2N al extracto y se agitó mientras estuvo caliente, se dejó enfriar. Se filtró y dividió el filtrado en partes iguales en cuatro tubos de ensayo. El tubo 1 sirve como control.

Al tubo 2 se añadió unas gotas del reactivo de Mayer. La presencia de turbidez, floculación o precipitado es indicativo de alcaloides.

Al tubo 3 se añadió unas gotas del reactivo de Wagner. La presencia de turbidez, floculación o precipitado es indicativo de alcaloides

Al tubo 4 se añadió unas gotas del reactivo de Dragendorf. La presencia de turbidez, floculación o precipitado es indicativo de alcaloides

2.4.10.5.2. ENSAYO CONFIRMATORIO

En una segunda porción del extracto original, Se evaporó el extracto equivalente a 25 g de material vegetal hasta sirope. Se añadió 10 mL de HCl 2N al extracto y se agitó mientras estuvo caliente, se dejó enfriar. Se filtró, al filtrado se añadió CHCl₃ este extraerá las grasas, pigmentos y compuestos neutros remanentes que interfieren con el ensayo. Se alcalinizó con NH₄OH. Se colocó en un embudo de separación y se extrajo dos veces con CHCl₃, se combinó las fases orgánicas y evaporó a sequedad. Al residuo añadir 2.5 ml de HCl 2N agitando hasta disolver, filtrar y dividir el filtrado a partes iguales en 4 tubos y repetir los ensayos de MAYER, WAGNER Y DRANGENDORFF. La presencia de turbidez, floculación o precipitado es indicativo de alcaloides

2.4.11. EVALUACION CROMATOGRAFICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS REPRESENTATIVOS.

A 5 gramos de vegetal previamente desengrasado con éter de petróleo, se sometió a proceso de digestión con ETOH al 96%, posteriormente se filtró y evaporó hasta sirope con la ayuda del rotavapor (-0.5mm Hg y a 55°C). Posteriormente se extrajo sucesivamente hasta incoloro con éter de petróleo, se desechó la fase orgánica, la fase hidroalcohólico se utilizó para cromatografía en capa fina, utilizando para dicho fin una placa de sílice Gel 60F 254 (MERCK) de 10cm x 2cm. Aplicando el extracto en forma de banda con una pipeta Pasteur. A un centímetro del borde inferior de la placa. Se dejó secar y se eluyó con una fase móvil compuesta por la siguiente relación de polaridad Acetato de Etilo, Acetona, Acido Acético, H₂O (100:11:22:25). La placa desarrollada se deja secar a temperatura ambiente y se calcula los respectivos RF. Analizándolo al visible, UV 254-366nm, con agente revelador (Vainillina1%-H₂SO₄ 50% - FeCl₃ 5%)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA

Para este análisis se recolectó la materia vegetal (Partes aéreas) en la Provincia del Tena, Cantón la Shell, a una altura de 1100 msnm, Temperatura promedio de 25 ± 3 °C, Humedad Relativa aproximada del 70%.

Se tomó en cuenta el color y estado físico, descartándose aquellas partes aéreas deterioradas de la planta. Una vez separadas las mismas, se lavó la planta con abundante agua potable para luego desinfectarlas con Kilol DF 100.

CUADRO N° 1 Resultados del control de calidad de la materia prima vegetal (*Justicia chlorostachya*).

Parámetro	%
Determinación de Humedad	90.36
Determinación de Cenizas Totales	2.38
Determinación de Sustancias Solubles	1.15
Determinación de sustancias insolubles	0.77

3.1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se observó que *Justicia chlorostachya*, contiene una cantidad considerable de agua siendo esta el 90.36% de la masa total fresca. Por este motivo el proceso de secado fue muy cuidadoso para que no exista termo degradación de compuestos termolábiles, se recomienda para ello el secado en estufa a temperatura de 30 ± 2 °C, ya que así se puede controlar el proceso. Obteniéndose después del proceso de secado natural una humedad residual del 5.02 % ya que para una buena conservación esta debe ser inferior al 10%, de esta manera se evita los procesos enzimáticos involucrados en la degradación y pérdida de potencial farmacológico de la materia vegetal.

3.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Para esta determinación se utilizó el material vegetal secado a la estufa.

En relación con las cenizas totales, como promedio de tres réplicas se obtuvo un valor de 2.38%. Con dependencia de dicho valor, al parecer no están constituidas mayoritariamente por compuestos inorgánicos (metales pesados), parámetro que se justifica con el valor obtenido para las cenizas insolubles en ácido (0.77%). Muchas plantas medicinales tienen un valor de cenizas entre 2-5% por lo que en nuestro caso los valores reportados están dentro de parámetros normales de aceptación, recordando que si dicho valor sobrepasa el 12% la materia vegetal deberá ser rechazada por contaminación.

3.1.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES

La diferenciación entre cenizas solubles en agua respecto a las totales nos da una idea del contenido en materia mineral de la planta.

Con nuestro resultado obtenido por el promedio de tres réplicas, diremos que el contenido de sustancia minerales resultó ser bajo, y además se encuentra dentro de los parámetros normales, ya que para plantas medicinales el porcentaje de cenizas solubles no debe sobrepasar al 2%

3.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Con el objetivo de conocer cualitativamente a los metabolitos secundarios con potencial farmacológico, justificable para nuestro estudio posterior de actividad hipoglicémica. Se realizó el cribado fitoquímico, obteniéndose los siguientes resultados:

CUADRO N° 2 Resultados del screening Fitoquímico de *Justicia chlorostachya*.

ESPOCH 2011.

METABOLITO 2RIO	ENSAYO	RESULTADO
<i>Flavonoides</i>	<i>Shinoda</i>	+++
<i>Cianidinas</i>	<i>HCl conc.</i>	++
<i>Leucoantocininas</i>	<i>HCl conc.</i>	-
<i>Taninos</i>	<i>Gelatina 1% + NaCl</i>	-
<i>Compuestos Fenolicos</i>	<i>FeCl3</i>	+++
<i>Compuestos Antracenicos</i>	<i>Borntrager</i>	-
<i>Esteroles</i>	<i>Lieberman Buchard/Salcowski</i>	++
<i>Saponinas</i>	<i>Espuma</i>	++
<i>Alcaloides</i>	<i>Mayer/Dragendorff/ Wagner</i>	+

Donde:

(-) Significa que se obtuvo respuesta negativa para ese Metabolito

(+) Significa que se obtuvo una baja intensidad de la Reacción para ese Metabolito

(++) Significa que se obtuvo una intensidad moderada de la Reacción para ese Metabolito

(+++)

Significa que se obtuvo una intensidad alta de la Reacción para ese Metabolito

Gracias al cribado fitoquímico realizado por triplicado concluimos finalmente que los metabolitos secundarios representativos con potencial farmacológico son los compuestos fenólicos, y entre ellos los flavonoides, siendo estos los responsables del color rojo adquirido por los extractos acuosos desengrasados obtenidos para el estudio. Además, cuya actividad antioxidante los hacen idóneos para mitigar el estrés oxidativo provocado por múltiples factores internos y externos que influyen directamente sobre la homeostasis corporal, alterándola, y desencadenando

patologías oxidodegenerativas recurrentes. En evidencia de lo anterior se atribuyó la actividad hipoglicemiante a este grupo complejo de flavonoides.

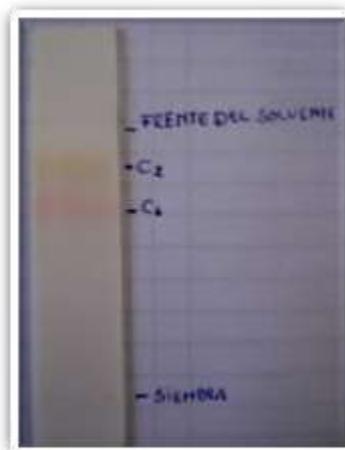
3.3. ESTUDIO CROMATOGRAFICO.

Con el estudio cromatográfico por TLC de la fracción flavo-fenólica de la muestra desengrasada, se pudo evidenciar la presencia de dos compuestos los cuales tuvieron los siguientes RF. Como lo muestra la Fotografía 11, se evidencia una buena separación de esos compuestos por lo que el siguiente paso sería su separación por Cromatografía en columna y posterior purificación para una posterior elucidación estructural y evaluación cuantitativa de marcadores de calidad para dosificación.

CUADRO N° 3 *Resultados del TLC de la fracción fenólica de Justicia chlorostachya. ESPOCH 2011.*

(FE: Sílice Gel 60F254; FM: Acetato de Etilo, Acetona, HAc, H2O 100:5:22:26)

Compuesto	Rf
1	0.89
2	0.94



FOTOGRAFIA N°11: *Placas de TLC donde se evidencia la separación de compuestos flavo-fenolicos sistema de solventes. Acetato de Etilo, Acetona, HAc, H2O 100:5:22:26*

FUENTE: Pazmiño C.

3.4. ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE

3.4.1. RESULTADOS DE LA ADMINISTRACION DEL EXTRACTO DE *Justicia chlorostachya*

En este estudio se analizó la potencial actividad hipoglicemiante mediante la inhibición competitiva de la α -amilasa intestinal, del extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya*, para este fin se administró por vía orogástrica, a los animales de experimentación (ratones albinos) tres dosis del extracto, para obtener una relación de 16, 32, 64 mg de planta / Kg de peso. Esto en base al conocimiento y uso etnobotánico ancestral que se le da a nuestra planta por parte de la población aborígen amazónica ecuatoriana, y posteriormente se indujo la hiperglicemia a los mismos mediante sobrecarga de sacarosa, como se lo menciona detalladamente en la sección 2.3.2.4. Se utilizó Acarbosa (Control Positivo) como medicamento hipoglicemiante inhibidor competitivo de la α -amilasa intestinal, con el fin de comparar la eficiencia y eficacia frente a nuestra planta investigada. Se realizaron las respectivas mediciones de la glicemia a las 0.5, 1 y 2 horas después de la sobrecarga de sacarosa. Se realizó un promedio de cuatro réplicas, y los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO N° 4 Descriptiva estadística de las glicemias (mg/dL) a los 30 minutos en los grupos bajo tratamiento.

GRUPO	N	Media	Mediana	Desviación		
				Típica	Mínimo	Máximo
RG1	4	369.7500	369.0000	15.2179	352.0000	389.0000
RG2	4	178.0000	182.0000	20.9284	150.0000	198.0000
RG3	4	226.0000	224.0000	16.5731	208.0000	248.0000
RG4	4	209.5000	210.0000	7.7244	201.0000	217.0000
RG5	4	190.2500	190.0000	8.7702	181.0000	200.0000
RG6	4	94.7500	94.0000	5.4391	89.0000	102.0000

CUADRO N° 5 *Descriptiva estadística de las glicemias (mg/dL) a los 60 minutos en los grupos bajo tratamiento.*

<i>GRUPO</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desviación</i>		
				<i>Típica</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
RG1	4	326.0000	326.0000	13.9523	310.0000	342.0000
RG2	4	183.5000	183.0000	5.1962	178.0000	190.0000
RG3	4	201.7500	203.5000	15.7771	181.0000	219.0000
RG4	4	187.5000	188.0000	8.1854	179.0000	195.0000
RG5	4	170.5000	167.5000	15.5456	155.0000	192.0000
RG6	4	88.2500	89.0000	5.4391	81.0000	94.0000

CUADRO N° 6 *Descriptiva estadística de las glicemias (mg/dL) a los 120 minutos en los grupos bajo tratamiento.*

<i>GRUPO</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desviación</i>		
				<i>Típica</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
RG1	4	229.0000	218.5000	24.1247	214.0000	265.0000
RG2	4	165.7500	166.0000	5.5603	159.0000	172.0000
RG3	4	148.5000	147.5000	6.2450	142.0000	157.0000
RG4	4	148.5000	149.0000	2.6458	145.0000	151.0000
RG5	4	145.0000	143.0000	7.1181	139.0000	155.0000
RG6	4	83.2500	83.5000	2.7538	80.0000	86.0000

CUADRO N° 7 *Promedio de las glicemias (mg/dL) en ayunas (12 Horas)*

GRUPOS DE EXPERIMENTACION	VALOR DE LA GLICEMIA BASAL MEDIA (mg/dL)
RG1	86,5
RG2	95,7
RG3	117,3
RG4	98,3
RG5	89,0
RG6	97,8

3.4.2. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Con los resultados de las glicemias obtenidos a los tiempos fijados en el modelo de diseño experimental (sección 2.3.2.4). Se procedió al análisis estadístico de empleando para ello el análisis de varianzas ANOVA un factor con datos agrupados, con el objetivo de encontrar la existencia de diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y los controles, posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples a un intervalo de confianza del 99% empleando la prueba de Tuckey HSD, lo que permitió evaluar que grupos son similares y diferentes con respecto a los tratamientos, utilizando para este fin el programa Estadístico G-STAT Student 2.2 (de licencia libre). Posteriormente se realizó la curva de tolerancia de los grupos de experimentación con la ayuda de Microsoft Excel 2007 y conjuntamente con el análisis estadístico previo, evaluar si existe o no actividad hipoglicemiante de nuestra planta, y si resulta ser igual o no al medicamento de control positivo.

CUADRO N° 8 ANOVA un factor datos agrupados glicemia a los 30 minutos

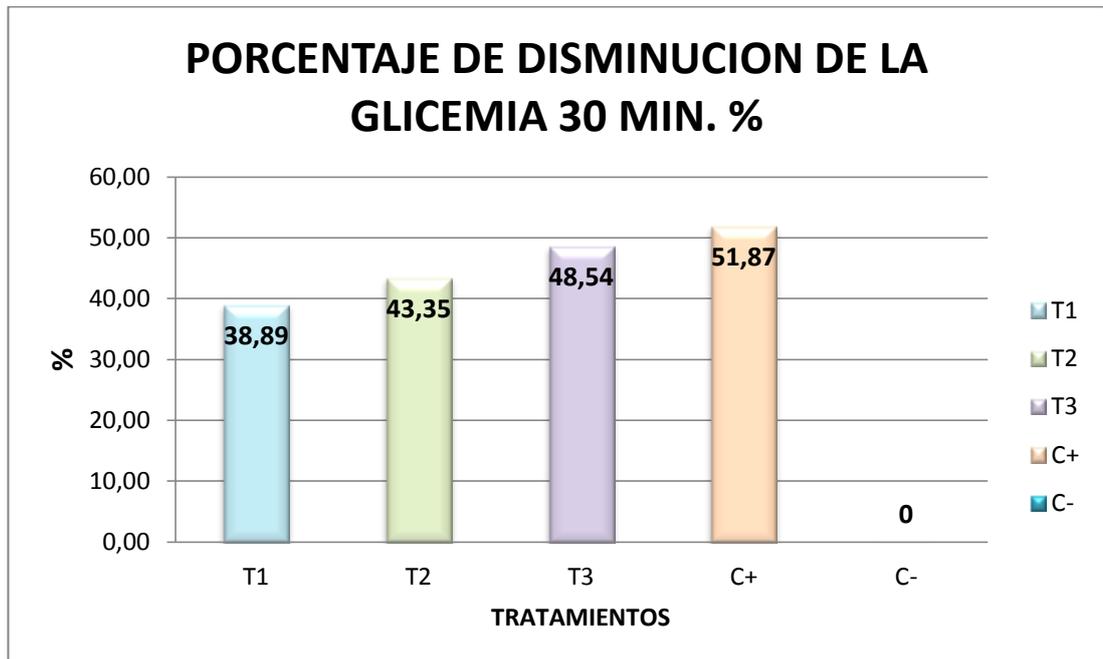
Anova Un Factor 30 minutos

Número de Casos:	24				
	Suma de		Cuadrado		
	Cuadrados	G.L.	Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	161846.3750	5	32369.2750	174.9034	0.0001E-10
Dentro Grupos	3331.2499	18	185.0694		
Total (corr.)	165177.6249	23			

CUADRO N° 9 Comparaciones múltiples Tuckey HSD 99% de confianza a los 30 minutos.

	N	Media	Grupos
			Homogéneos
B	4	94.7500	X
C +	4	178.0000	X
T3	4	190.2500	XX
T2	4	209.5000	XX
T1	4	226.0000	X
C -	4	369.7500	X

GRAFICO N° 1 Grafica de la disminución porcentual de glucosa en sangre en los grupos experimentales con los tratamientos, a los 30 minutos



ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Como lo indica el cuadro N° 8 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de las glicemias entre los diferentes grupos es menor al nivel de significancia del 1% (0.01), por lo que posteriormente se realizó la comparación múltiple para ver que

grupos de tratamientos eran iguales y cuales diferentes ya que el análisis de ANOVA simplemente nos indica que hay diferencia. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 9, existen tres grupos estadísticamente diferentes siendo, los tratamientos T1 (16mg/Kg), T2 (32 mg/Kg), T3 (64 mg/Kg) y C + (Control Positivo con Acarbosa 0.71 mg/Kg), estadísticamente similares, y significativamente diferentes con los grupos C – (Ningún tratamiento) y Grupo Testigo o Blanco (No se indujo la sobrecarga ni se administro tratamiento alguno). Y como se observa en la Grafica N°1 los porcentajes de disminución de glucosa en sangre en los grupos experimentales con los tratamientos así como el grupo control positivo (Acarbosa), indican una disminución promedio del 45%.

CUADRO N° 10 ANOVA un factor datos agrupados glicemia a los 60 minutos

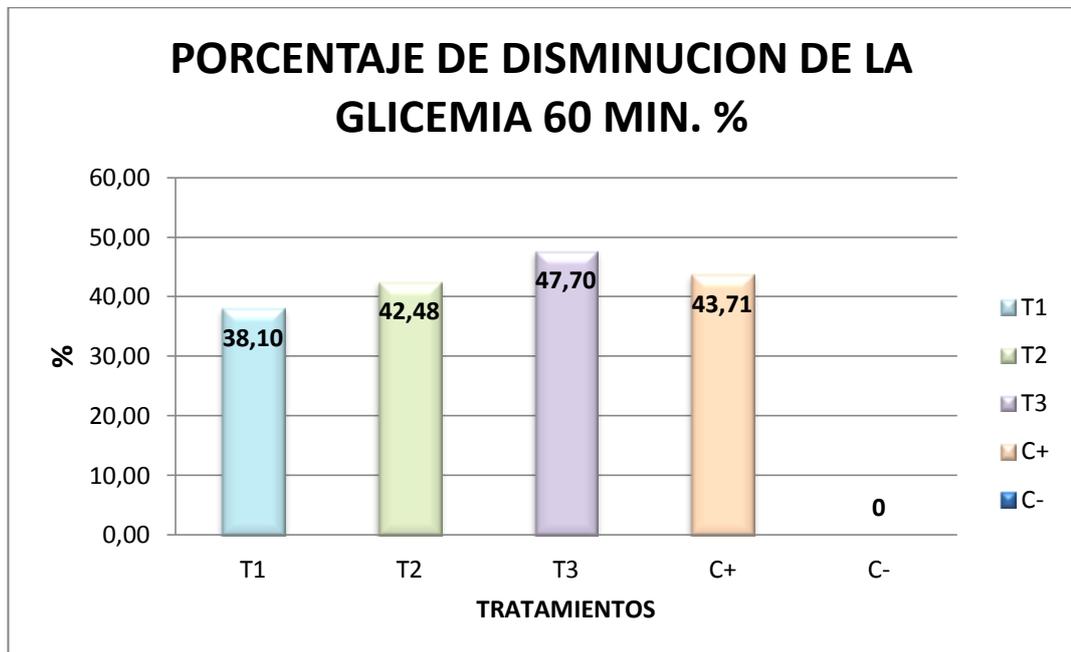
Anova Un Factor 60 minutos

Número de Casos:	24				
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	117459.3333	5	23491.8667	174.2646	0.0001E-10
Dentro Grupos	2426.5029	18	134.8057		
Total (corr.)	119885.8363	23			

CUADRO N° 11 Comparaciones múltiples Tuckey HSD 99% de confianza a los 60 minutos.

	N	Media	Grupos Homogéneos
B	4	88.2500	X
T3	4	170.5000	X
C +	4	183.5000	X
T2	4	187.5000	X
T1	4	201.7500	X
C -	4	326.0000	X

GRAFICO N° 2 Grafica de la disminución porcentual de glucosa en sangre en los grupos experimentales con los tratamientos, a los 60 minutos



ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Como lo indica el cuadro N° 10 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de las glicemias entre los diferentes grupos es menor al nivel de significancia del 1% (0.01), rechazando con ello la hipótesis nula de igualdad de varianzas. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 11, existen tres grupos estadísticamente diferentes siendo, los tratamientos T1 (16mg/Kg), T2 (32 mg/Kg), T3 (64 mg/Kg) y C + (Control Positivo con Acarbosa 0.71 mg/Kg), estadísticamente similares, y significativamente diferentes con los grupos C – (Ningún tratamiento) y Grupo Testigo o Blanco (No se indujo la sobrecarga ni se administro tratamiento alguno). Y como se observa en la Grafica N°2 los porcentajes de disminución de glucosa en sangre en los grupos experimentales con los tratamientos así como el grupo control positivo (Acarbosa), indican una disminución promedio del 43%.

CUADRO N° 12 ANOVA un factor datos agrupados glicemia a los 120 minutos

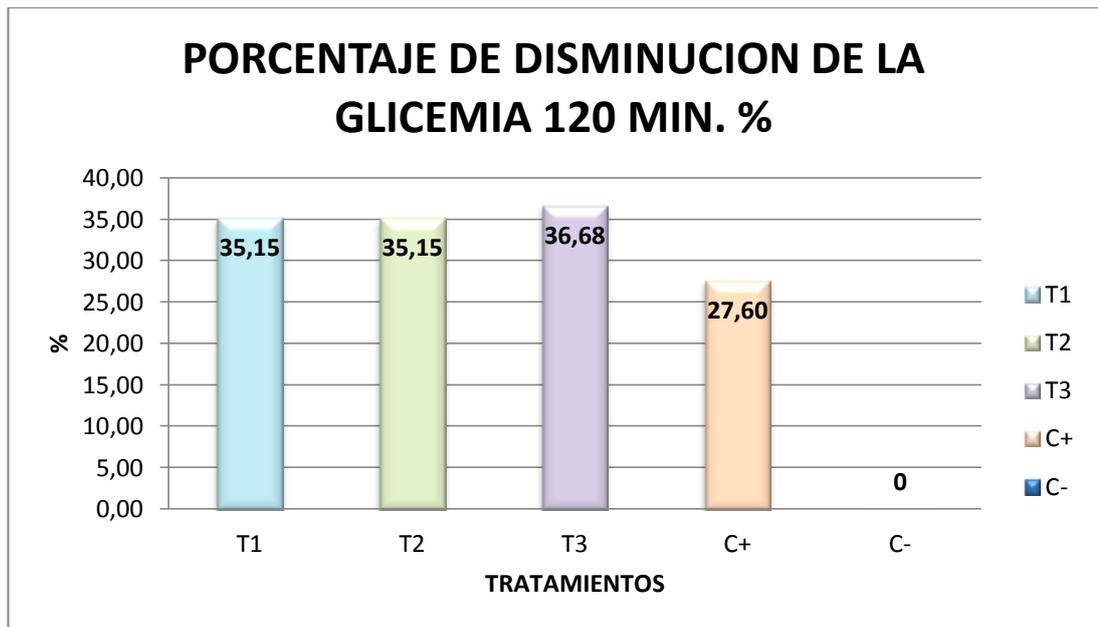
Anova Un Factor 120 min

Número de Casos:	24				
	Suma de		Cuadrado		
	Cuadrados	G.L.	Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	43629.8333	5	8725.9667	73.0034	0.0003E-7
Dentro Grupos	2151.5074	18	119.5282		
Total (corr.)	45781.3407	23			

CUADRO N° 13 Comparaciones múltiples Tuckey HSD 99% de confianza a los 120 minutos.

	Grupos		
	N	Media	Homogéneos
B	4	83.2500	X
T3	4	145.0000	X
T1	4	148.5000	X
T2	4	148.5000	X
C +	4	165.7500	X
C -	4	229.0000	X

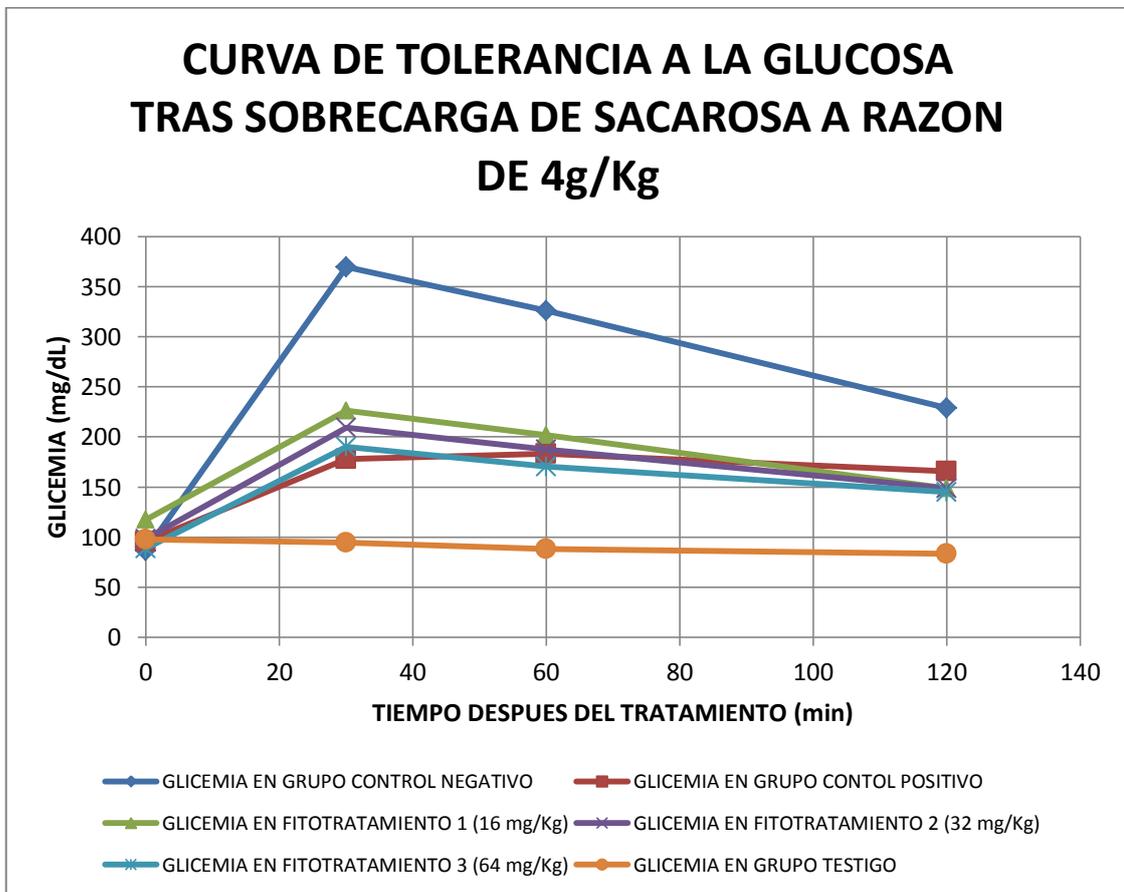
GRAFICO N° 3 Grafica de la disminución porcentual de glucosa en sangre en los grupos experimentales con los tratamientos, a los 120 minutos



ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Como lo indica el cuadro N° 12 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de las glicemias entre los diferentes grupos es menor al nivel de significancia del 1% (0.01), rechazando con ello la hipótesis nula de igualdad de varianzas. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 13, existen tres grupos estadísticamente diferentes siendo, los tratamientos T1 (16mg/Kg), T2 (32 mg/Kg), T3 (64 mg/Kg) y C + (Control Positivo con Acarbosa 0.71 mg/Kg), estadísticamente similares, y significativamente diferentes con los grupos C – (Ningún tratamiento) y Grupo Testigo o Blanco (No se indujo la sobrecarga ni se administro tratamiento alguno). Y como se observa en la Grafica N°3 los porcentajes de disminución de glucosa en sangre en los grupos experimentales con los tratamientos así como el grupo control positivo (Acarbosa), indican una disminución promedio del 32%.

GRAFICO N° 4 Grafica de la actividad hipoglicemiante de *Justicia chlorostachya*, Curva de Tolerancia a la glucosa.



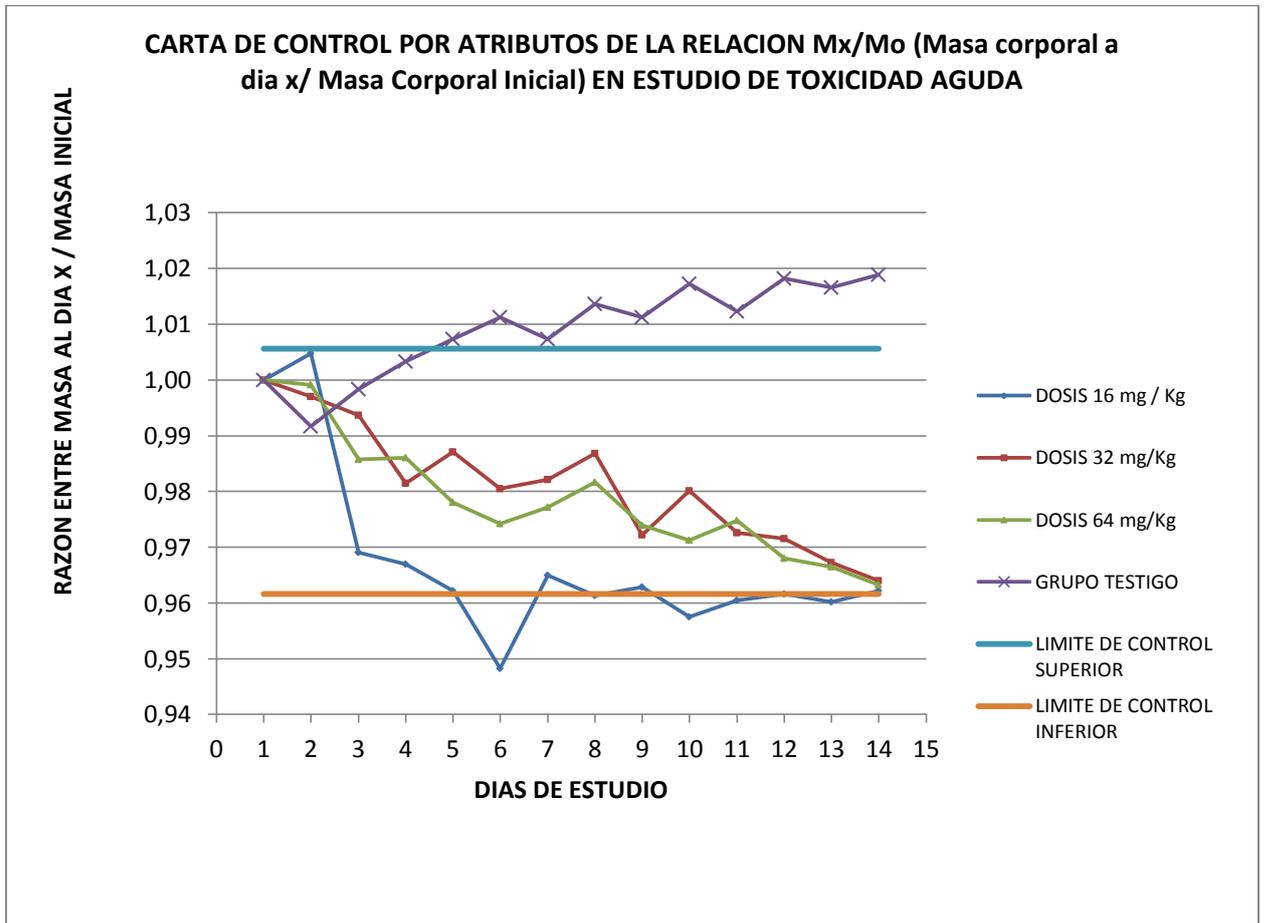
ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Como se puede observar en la grafica N° 4, existe una notable actividad hipoglicemiante del extracto de *Justicia chlorostachya* a las dosis administradas (T1 (16mg/Kg), T2 (32 mg/Kg), T3 (64 mg/Kg)) mostrando una notable eficacia comparada con el medicamento administrado (Acarbosa), resultando ser un potencial sustituto de este para el tratamiento complementario de la Hiperglicemia en el estado diabético de una persona.

3.5. TOXICIDAD AGUDA Y ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

El estudio de toxicidad aguda, no reportó ningún deceso de los animales de experimentación sometidos a las dosis administradas por vía orogastrica (16, 32, 64 mg/Kg). Así como su comportamiento fue normal a lo largo de la fase de estudio además como se puede observar en el gráfico N°5, la variación de peso de los grupos de estudio no presentó diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza entre los grupos en tratamiento, pero si con el grupo testigo en el cual se ve una elevación de la masa corporal que sobrepasa el límite de control superior estadístico, demostrándose con ello que existe una disminución de peso a partir del sexto día, con la administración de nuestro extracto desde la dosis más baja, hecho que corrobora la posible actividad inhibitoria de la α -amilasa intestinal, durante el transcurso en el estudio de toxicidad aguda. Además se evaluó la organotoxicidad a nivel histológico de los órganos farmacocinéticos más representativos (Estómago, Hígado, Riñón), resultando negativo para daño histológico (Ver Anexo N° 2) a las dosis administradas, resultado emitido por el Dr. Oswaldo Duque (Patólogo SOLCA-RIOBMABA). Con estos estudios realizados resulta ser segura y eficaz nuestra planta a las dosis establecidas.

GRAFICO N° 5 Variación de la masa corporal vs. Tiempo



CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

- 4.1.** Gracias al screening Fitoquímico realizado a *Justicia chlorostachya* se concluye, que los metabolitos potencialmente activos, responsables de la actividad farmacológica investigada y de otras más, son los compuestos fenólicos con prototipo Flavónico, los mismos que actúan en forma conjunta y sinérgica con la matriz del extracto, encontrándose los mismos en abundancia en las partes aéreas de nuestra planta. Y diferenciándose notablemente en el contenido de alcaloides con el espécimen de la selva colombiana, (Análisis fitoquímico realizado en la Universidad Tecnológica de Chocó) de cuyo estudio presentó una presencia moderada de los mismos. (53)
- 4.2.** Después de un proceso de ambientación, se logró inducir Hiperglicemia (> 250mg/dL) a ratones seleccionados aleatoriamente de cada grupo, administrándoles una sobrecarga de sacarosa a una razón de 4g/Kg de peso, excepto al grupo testigo o blanco
- 4.3.** Se demostró científicamente a nivel pre – clínico *in vivo*, la actividad hipoglicemiante del extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya*, a un nivel de significancia estadística del 99% y posterior análisis de comparaciones múltiples (Prueba de Tuckey HD), con los resultados de Glicemia obtenidos a los 30, 60 y 120 minutos después de los respectivos tratamientos, indicando que existen tres grupos estadísticamente diferentes siendo:
- El Grupo Control Positivo (Tratamiento con acarbosa 0.7 mg/Kg) y los Tratamientos 1, 2 y 3 (16, 32, 64 mg/kg de EHA de Jc) un mismo grupo estadístico, y el grupo testigo así como el grupo control negativo los otros dos grupos estadísticamente independientes.
 - Con el análisis de resultados de la sección 3.4, concluimos, que los grupos que recibieron el tratamiento con el EHA de *Justicia chlorostachya* desde la dosis más baja, presentan diferencia estadísticamente significativa con el grupo Control Negativo (Sin tratamiento), afianzando con ello,

científicamente el conocimiento etnobotánico ancestral, sobre la actividad hipoglicemiante de *Justicia chlorostachya*.

- Con el análisis de los resultados de la sección 3.4, los niveles de glucosa en sangre, se normalizan mucho más rápido en los grupos que recibieron EHA de *Justicia chlorostachya* comparado con el Grupo Control Positivo (Tratamiento con Acarbosa). Lo que indica que, *Justicia chlorostachya*, posee una capacidad potencial innata, para igualar y mejorar al tratamiento con acarbosa 0.7 mg/Kg. Concluyendo así, que el tratamiento fitoterápico con *Justicia chlorostachya* a razón de 16 mg/Kg, ejerce un efecto positivo y nivelador, en el control metabólico de los carbohidratos en el paciente diabético, resultando ser un potencial sustituyente de la acarbosa en el tratamiento crónico, y así disminuir la probabilidad de niveles altos de transaminasas provocadas por la ingesta prolongada de este oligosacarido (acarbosa).
- Gracias al método científico, empleado para la determinación de la actividad hipoglicemiante del EHA de *Justicia chlorostachya*, logramos tentativamente evidenciar uno de los posibles mecanismos de acción, siendo este, inhibidor de la actividad α -amilosítica intestinal. Recalcando además que por la representativa presencia de compuestos fenólicos tipo Flavonoides, *Justicia chlorostachya* disminuiría los problemas vasculares-degenerativos ocasionados por los EROs, provenientes de las múltiples reacciones de oxidación derivadas de un metabolismo imparcial de la Glucosa a nivel sistémico-somático, protegiendo así al paciente Diabético de forma sinérgica tanto por vía metabólica (Inhibidor de la α -amilasa) como por vía antioxidante (Capturador de Radicales Libres).
- La actividad hipoglicemiante de *Justicia chlorostachya* comparada con estudios realizados con *Malmea depressa* y *Morus alba*. nos indica que nuestra planta posee un índice terapéutico más seguro y efectivo que las mencionadas especies, ya que gracias al estudio Estadístico (ANOVA-Tuckey) realizado, los efectos hipoglucemiantes máximos se pueden observar a los 60 minutos, a diferencia de los 120 minutos observados en los estudios previos de las mencionadas plantas.

4.4. Los grupos experimentales que recibieron el fitotratamiento, fueron sometidos al estudio de Toxicidad aguda durante 14 días (Método de Reed munch), gracias a este estudio se determinó que a las dosis analizadas por vía oral (16, 32, 64 mg/Kg), el EHA de *Justicia chlorostachya*, no resultó ser tóxico, confirmándolo posteriormente con el estudio histopatológico donde los órganos farmacocinéticos involucrados (Hígado, Riñón, Estómago) no presentaron daño en su parénquima (resultado emitido por el Dr. Oswaldo Duque patólogo SOLCA-Riobamba), con lo cual se finiquita que el fitotratamiento administrado es seguro y eficaz.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

5.1. No se recomienda la muerte por asfixia con éter etílico, ya que el mismo provoca vaso-congestión hecho que se lo evidencia al realizar la disección y cortes histológicos.

5.2. Es menester motivar la realización de experiencias posteriores que fortalezcan el presente trabajo de investigación, para determinar otros mecanismos de acción sobre la actividad hipoglicemiante, ya que muchas plantas con dicha actividad no actúan solo por una vía metabólica sino por varias.

5.3. Se recomienda que se afine las investigaciones a nivel de estudio por fracciones (fenólica), con el objetivo de analizar si en las mismas persiste o no la actividad farmacológica demostrada en el presente trabajo.

5.4. Establecer un método analítico para el aislamiento y cuantificación de los flavonoides presentes, los cuales mostraron una buena separación en TLC. Lo que serviría posteriormente, en la elaboración de protocolos de calidad vinculados a marcadores químicos a nivel cuantitativo.

5.5. Usar el extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* como materia prima para la elaboración de formas farmacéuticas solidas, constituyendo así un fitomedicamento o medicamento híbrido (natural y sintético), que permitan mejorar la calidad de vida del paciente diabético de forma sinérgica y segura.

5.6. Debería estudiarse además, otras actividades farmacológicas derivadas del presente trabajo vinculándose a la riqueza de compuestos fenólicos de nuestra planta.

CAPITULO VI

6. RESUMEN

Determinación de la actividad hipoglicemiante de la Insulina vegetal (*Justicia chlorostachya Leonard*). En ratones con hiperglicemia inducida (por sobrecarga de sacarosa a una relación de 4 g/Kg de peso), la misma que se realizó en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH.

Con la aplicación del método Empírico-Analítico, el material biológico (ratones albinos de 30-40 g de peso) se dividió en 6 grupos denominados RG1: Control negativo, RG2: Control Positivo (Acarbosa 0.7mg/Kg), RG3: Dosis 1 (16 mg de Jc/Kg), RG4: Dosis 2 (32 mg de Jc/Kg), RG5: Dosis 3 (64 mg de Jc/Kg), RG6: Testigo. Evaluándose la glicemia a los 0, 30, 60 y 120 minutos después de la sobrecarga de sacarosa, mediante tiras reactivas empleando el Glucómetro Prodiges.

Los datos así obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA un factor con datos agrupados y prueba de Tuckey HSD (Honestly Significant Difference) a un intervalo de confianza del 99%. Los resultados muestran claramente el efecto hipoglicemiante del extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya*, recalando que desde la dosis más baja administrada 16 mg/Kg de peso, resultó ser un potencial sustituyente e igualmente eficiente que el tratamiento con Acarbosa (0.7mg/Kg de peso) con un p-valor de 1×10^{-14} . Además se evidenció con el estudio toxicológico e histopatológico que las dosis administradas resultaron ser atóxicas, e histológicamente seguras sobre los órganos farmacocinéticos involucrados (Estomago, Hígado, Riñón).

Concluyo de esta manera que, el uso etnobotánico que se le ha dado a la Insulina vegetal, como agente hipoglicemiante, queda científicamente comprobado con la presente investigación, y además que los metabolitos secundarios protagonistas en dicha capacidad farmacológica son compuestos Fenólicos con prototipo Flavónico.

Recomiendo que a partir de este trabajo científico, se prosigan futuras investigaciones sobre *Justicia chlorostachya*, que contribuyan a mejorar el estilo de vida del paciente diabético.

SUMMARY

This thesis deals with the determination of the hypoglycemic activity of the vegetal insulin (*Justicia chlorostachya Leonard*) in mice with induced hyperglycemia (because of overload of sucrose at 4 g / kg weight relationship), carried out at the Bioterio of the Biochemistry and Pharmacy School of the ESPOCH.

With the application of the empiric-analytical method, the biological material (30-40 g albino mice weight) was divided into 6 groups named RG1: Negative control, RG2: Positive Control (Acarbose 0.7mg/Kg), RG3: Dose 1 (Jc 16 mg / kg), RG4: Dose 2 (32 mg of Jc / kg), RG5: Dose 3 (64 mg of Jc / kg), RG6: Witness. Evaluating Glycaemia at 0, 30, 60 and 120 minutes after sucrose overload, through reactive strips using Glucometer Prodigé.

Data obtained this way were analyzed statistically through ANOVA a factor with grouped data and the Tukey test HSD (Honestly Significant Difference) at 99% reliability interval. The results clearly show the hypoglycemic effect of the hydro alcoholic extract of *Justice chlorostachya*, stressing that from the lowest dosage 16 mg / kg weight, it proved to be a substituting potential as efficient as the treatment with acarbose (0.7mg/Kg weight) with 1×10^{-14} p-value. Moreover it was evident that with the toxicological and hystopathological study the administered dosages proved to be atoxic, and histologically safe over the pharmacokinetic organs involved (Stomach, Liver, Kidney).

It is concluded that the ethnobotanic use given to vegetal insulin, as a hypoglycemic agent, is scientifically testes with the present investigation, and that the protagonistic secondary metabolites in such a pharmacological capacity are phenolic compounds with flavonoid prototype.

It is Recommended from this scientific work, to continue further investigations on *Justicia chlorostahya*, so as to contribute to improve the lifestyle of the diabetic patient,

CAPITULO VII

7. BIBLIOGRAFIA

- (1). **ARANGO M**, Plantas Medicinales-Botánica de Interés Médico; 2da ed; Bogotá-Colombia, Editorial Universitaria; 2006; pp. 105-106.
- (2). **ARNO A, y otros**, Criterios y pautas de terapia combinada en la diabetes tipo 2; 17va ed; Barcelona- España; Editorial Andaluza; 2001; pp 82-97.
- (3). **BAILEY J**, Model for texting now hypoglicaemia drugs; Londres-Inglaterra; Editorial. London Smith Gordon; 1990 pp. 65-82.
- (4). **BALKAN B**, Hyperinsulinemia and glucose tolerance in obese raton food.; Illinois-USA; Editorial Universitaria; 1991 pp. 40-50.
- (5). **BARCELÓ A**, La diabetes en las Américas; 2da ed; Washington-USA; Editorial Trillas; 2009 pp. 1-3.
- (6). **BARCELOUX D**, Medical Toxicology of Natural Substances; 3ra ed; New Jersey-USA; Editorial Wiley; 2008 pp. 43.
- (7). **BONNER, y otros**, Induced rat models of non-insulin dependent diabetes; London-England; Editorial London Libbey. 1998 pp. 295-320.
- (8). **CLIFFORD J**, Animals syndromes of non-insulin-dependent Diabetes Mellitus; 2da ed; Washington-USA; Editorial Blackwell Science; 1998. pp. 23 -25.

- (9). **CYTED**, Manual de técnicas de Investigación; 2da ed; Sao Paulo-Brasil; Editorial Convenio Andrés Bello; 2006. pp. 140- 141.
- (10). **CYTED**, Directorio de la red Iberoamericana de productos Fitofarmacéuticos.; Salvador-Guatemala; Editorial Convenio Andrés Bello; 2002. pp. 35-37.
- (11). **CHEMPAKAM B, y otros**, Chemistry of Spices; 5ta ed; Bangladesh-India; Editorial CAB International; 2008. pp. 137-139.
- (12). **FIGUEROLA D**, Diabetes mellitus; 13va ed; Madrid-España; Editoriales Harcourt Brace, 2009. pp. 1933-1969
- (13). **FLOREZ J**, Farmacología humana; 3era ed; Barcelona-España; Editorial Masson; 1996. pp. 927-943.
- (14). **FREIRE A**, Botánica Sistemática Ecuatoriana; 2da ed; Quito-Ecuador; Editorial Saint Louis; 2002. pp. 76.
- (15). **GOODMAN A**, Las bases farmacológicas de la terapéutica; 9na ed; México DF; Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1996; pp 1603-1607.
- (16). **LUCK O**, Investigación Fitoquímica métodos de estudio de productos naturales; Lima- Perú; Editorial Universitaria Pontificia Universidad Católica; 1988. pp. 213
- (17). **MARTÍ M**, Historia de la diabetes. Diabetes mellitus; 2da ed; Asunción-Paraguay; Editorial Akadia; 1996. pp 1-6.
- (18). **MALGOR L**, Farmacología de la diabetes. Farmacología médica; 2da ed; Bogotá-Colombia; Ediciones Donato/FARM.; 1995. pp 174-191.
- (19). **PASCOE WS**, Insulin action and determinants of glycaemia in a rat model of type II (non-insulin dependent) diabetes mellitus.; Cansas – USA; Editorial Apolo; 1995. pp. 35, 208, 15.
- (20). **PEREIRA J**, The Elements of materia medica and therapeutics; 4ta ed. Philadelphia-USA; Editorial Pearson Student; 1995. pp. 388- 390.
- (21). **PORETSKY L**, Principles of Diabetes Mellitus. 2da ed, New York-USA; Editorial Medical ED; 2008. Pp 378

- (22). **STOJANONSKA L**, Evolution of dexamethasone – induced insulin resistant in rat; Oklahoma-USA; Editorial Omega; 2005; pp. 748-56.
- (23). **BLACPMA** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas; Bogotá-Colombia; Editorial Universitaria; 2001; pp. 95-105

REVISIÓN INTERNET

- (24). **ACTUALIDAD EN LA FITOTERAPIA CONTRA LA DIABETES**
<http://www.plantasquecuran.com/documentos/diabetes-y-plantas-medicinales.html>
2011/07/29
- (25). **BIOMODELOS DE INDUCCION HIPERGLICEMICA.**
http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol13_2_02/end09202.pdf
2011/07/28
- (26). **CARACTERISTICAS DE LA DIABETES ASOCIADOS A LA GLICEMIA**
<http://www.misrespuestas.com/que-es-la-glicemia.html>
2011/07/26
- (27). **CATARATA DIABETICA**
http://www.iqb.es/d_mellitus/medico/complica/catarata/cat01.htm
2011/07/27
- (28). **COMPLICACIONES CARDIVASCULARES DE LA DIABETES**
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/coronaryarterydisease.html>
2011/07/28
- (29). **DIABETES MELLITUS. Historia de la Diabetes Mellitus.**
<http://www.endocrinologist.com/Espanol/diabetes.htm>
2011-05-03

(30). DIABETES GENERALIDADES

http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/diabetes_mellitus.htm

2011/07/26

(31). DIABETES ESTADISTICAS EN AMERICA LATINA

<http://www.msda.com.ar/msdar/corporate/press/diabetes/noticia2.html>

2011/07/26

(32). EL COMERCIO. Día Internacional de la Diabetes.

[http://www.elcomercio.com/noticiaEC.asp?id_noticia=150707&id_seccion=8.](http://www.elcomercio.com/noticiaEC.asp?id_noticia=150707&id_seccion=8)

2011/06/14

(33). EL MERCURIO. Día Internacional de la Diabetes.

<http://www.elmercurio.com.ec/web/titulares.php?seccion=xJoURM>

2011/06/14

(34). ENFERMEDADES DERIVADAS DE LA DIABETES.

<http://www.monografias.com/trabajos11/diabe/diabe.shtml>

2011/07/10

(35). ESTUDIOS COMPARATIVOS HIPOGLICEMIANTES

http://www.elsevier.com/wps/find/homepage.cws_home

2011/10/03

(36). IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

<http://www.cientec.or.cr/ciencias/articulos.html>

2011/07/28

(37). *Justicia chlorostachya*

<http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/19142387-390.pdf>

2011/07/30

(38). OMS SOBRE LA DIABETES

http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_diabetes_day/es/index.html

2011/07/25

(39). NEFROPATIA DIABETICA

http://es.wikipedia.org/wiki/Nefropat%C3%ADa_diab%C3%A9tica

2011/07/27

(40). NEFROPATIA DIABETICA

<http://www.cun.es/areadesalud/enfermedades/endocrinologicas/nefropatia-diabetica/>

2011/07/28

(41). NEUROPATIA DIABETICA

http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/neuropatia_periferica.htm

2011/07/28

(42). PLANTAS DEL GENERO JUSTICIA

<http://ara.inbio.ac.cr/SSTN/species/browse/resource/35/taxon/259>

2011/07/17

(43). PROPIEDADES MEDICINALES DE PLANTAS DEL GENERO JUSTICIA

<http://www.planthogar.net/enciclopedia/fichas/566/justicia-justicia-pauciflora.html>

2011/07/21

(44). PROPIEDADES MEDICINALES DE LA FAMILIA ACANTACEAE

<http://www.siamazonia.org.pe/archivos/publicaciones/amazonia/libros/28/28000007.htm>

2011/07/25

(45). PROBLEMAS DE LA DIABETES EN EL ECUADOR

<http://www.expreso.ec/html/salud1.asp>

2011/07/25

- (46). **PLANTAS MEDICINALES Y DIABETES**
http://www.iqb.es/d_mellitus/medicinas/plantas01.htm
2011/07/29
- (47). **PLANTAS UTILIZADAS EN LA DIABETES.**
<http://www.plantasquecuran.com/documentos/diabetes-y-plantas-medicinales.html>
2011/07/29
- (48). **PLANTAS HIPOGLICEMIANTES CARACTERIZADAS**
http://www.iqb.es/d_mellitus/medicinas/tabla1.htm
2011/07/29
- (49). **PLANTAS HIPOGLICEMIANTES NO CARACTERIZADAS**
http://www.iqb.es/d_mellitus/medicinas/plantas05.htm
2011/07/30
- (50). **PLANTAS SUPUESTAMENTE HIPOLGLICEMIANTES**
http://www.iqb.es/d_mellitus/medicinas/plantas06.htm
2011/07/30
- (51). **RETINOPATIA DIABETICA**
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001212.htm>
2011/07/26
- (52). **TRATAMIENTOS PARA LA DIABETES**
http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_13/seccion_13_148.html
2011/07/10
- (53). **TRATAMIENTO FITOTERAPICO PARA LA DIABETES**
<http://www.plantasquecuran.com/plantas-edicinales/justicia.html>
2011/07/15
- (54). **USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES**
<http://www.mtplantas.com/>
2011/07/28

CAPITULO VII

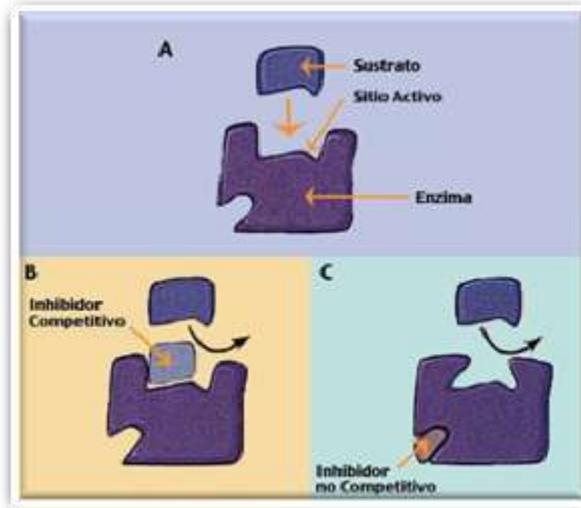
ANEXOS

ANEXO 1: CAUSAS DE MORTALIDAD EN EL ECUADOR SEGÚN INEC

Orden	CÓD CIE-10	Enfermedad o condición	Número de personas	%	Tasa
1	E10-E14	DIABETES MELLITUS	3510	5.8	25.4
2	I60-I69	ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES	3408	5.7	24.7
3	I10-I15	ENFERMEDADES HIPERTENSIVAS	3265	5.4	23.7
4	J10-J18	INFLUENZA Y NEUMONÍA	3187	5.3	23.1
5	I20-I25	ENFERMEDADES ISQUÉMICAS DEL CORAZÓN	2760	4.6	20
6	V00-V89	ACCIDENTES DE TRANSPORTE TERRESTRE	2691	4.5	19.5
7	X85-Y09	AGRESIONES (HOMICIDIOS)	2479	4.1	18
8	I50-I51	INSUFICIENCIA CARDÍACA, COMPLICACIONES Y ENFERMEDADES MAL DEFINIDAS	2317	3.9	16.8
9	K70-K76	CIRROSIS Y OTRAS ENFERMEDADES DEL HÍGADO	1792	3	13
10	N00-N39	ENFERMEDADES DEL SISTEMA URINARIO	1761	2.9	12.8
11	C16	NEOPLASIA MALIGNA DEL ESTÓMAGO	1664	2.8	12.1
12	P00-P96	CIERTAS AFECCIONES ORIGINADAS EN EL PERÍODO PRENATAL	1616	2.7	11.7
13	J40-J47	ENFERMEDADES CRÓNICAS DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS INFERIORES	1170	1.9	8.5
14	X60-X84	LESIONES AUTOINFLINGIDAS INTENCIONALMENTE (SUICIDIO)	929	1.5	6.7
15	C81-C96	NEOPLASIA MALIGNA DEL TEJIDO LINFÁTICO, ÓRGANOS HEMATOPOYÉTICOS Y TEJIDO	847	1.4	6.1
16	I46	PARO CARDÍACO	811	1.4	5.9
17	A40-A41	SEPTICEMIA	768	1.3	5.6
18	C61	NEOPLASIA MALIGNA DE LA PRÓSTATA	767	1.3	5.6
19	C53-C55	NEOPLASIA MALIGNA DEL ÚTERO	708	1.2	5.1
20	B20-B24	ENFERMEDAD POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA (VIH)	679	1.1	4.9
21	A15-A19	TUBERCULOSIS	668	1.1	4.8
22	D50-D53	E40-E64 DESNUTRICIÓN Y ANEMIAS NUTRICIONALES	647	1.1	4.7
23	Q00-Q99	MALFORMACIONES CONGÉNITAS, DEFORMIDADES Y ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS	644	1.1	4.7
24	C33 C34	NEOPLASIA MALIGNA DE LA TRÁQUEA, BRONQUIOS Y PULMÓN	634	1.1	4.6
25	C22	NEOPLASIA MALIGNA DEL HÍGADO Y DE LAS VÍAS BILIARES	624	1	4.5

<http://www.panassessor.com/10mortECU.html>

ANEXO 2: ESQUEMA DIDACTICO DE LA INHIBICION DE LA α -AMILASA



ANEXO 3: CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA VEGETAL



FOTOGRAFIA N°12 *Control de calidad de la materia vegetal*

ANEXO 4: TAMIZAJE FITOQUIMICO



FOTOGRAFIA N°13 *Obtención de los extractos hidroalcohólico de Jc.*



FOTOGRAFIA N°14 *Condiciones concentración del extracto.*



FOTOGRAFIA N°15 *Obtención de los subextractos*



FOTOGRAFIA N°16 *Materiales para el tamizaje*



FOTOGRAFIA N°17 *Reactivos para el tamizaje*



FOTOGRAFIA N°18 *Reacción positiva para Flavonoides Shinoda.*



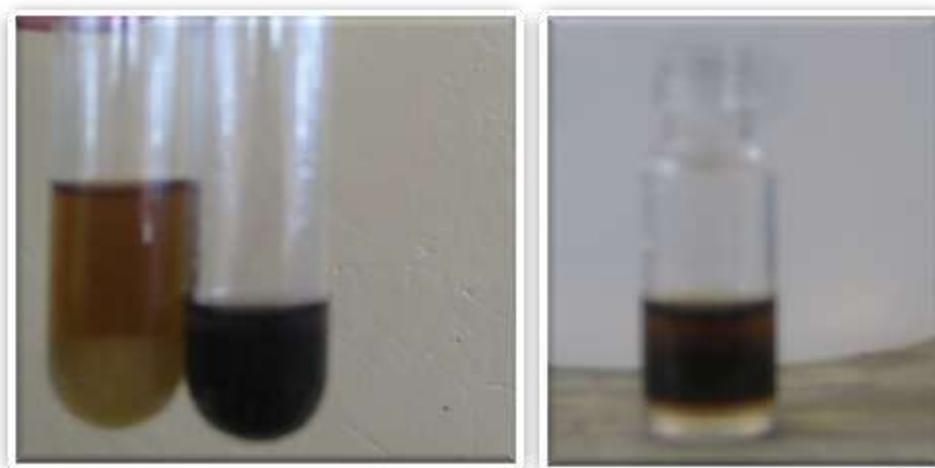
FOTOGRAFIA N°19 *Reacción positiva para Cianidinas*



FOTOGRAFIA N°20 *Reacción positiva para compuestos Fenólicos*



FOTOGRAFIA N° 21 *Reacciones para alcaloides*



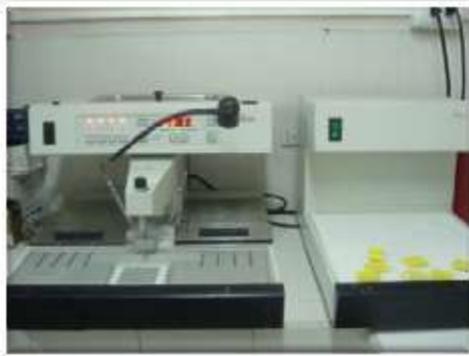
FOTOGRAFIA N°22 *Reacción positiva para Terpenos esteroideos*



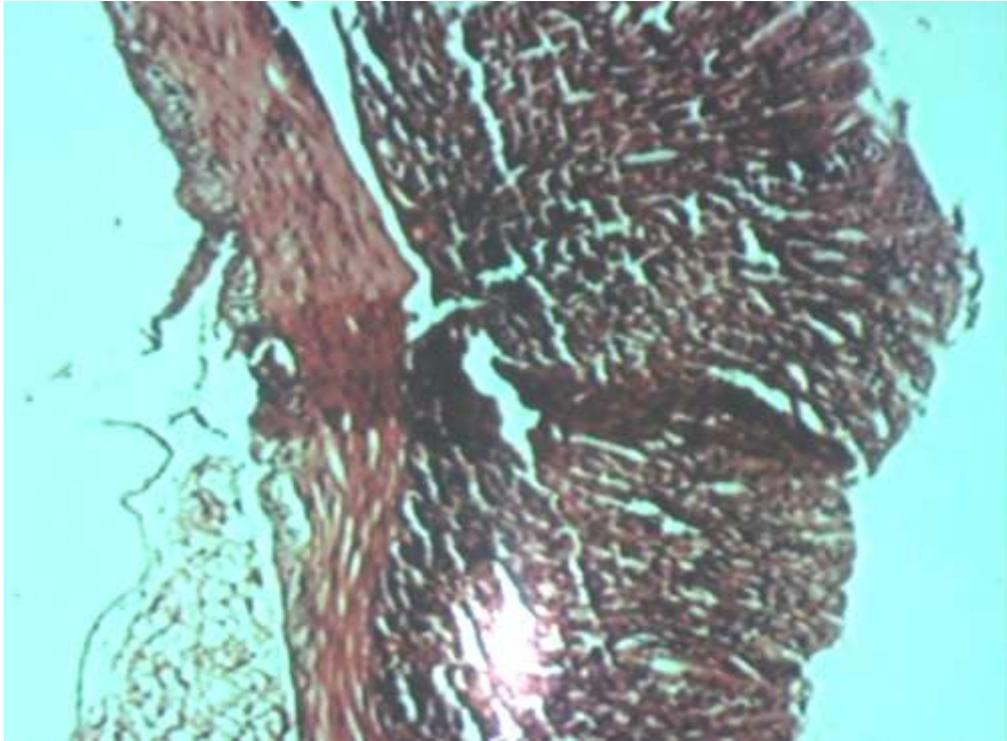
FOTOGRAFIA N°23 *Reacción positiva para Saponinas*

ANEXO 5. VARIAS FOTOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACION

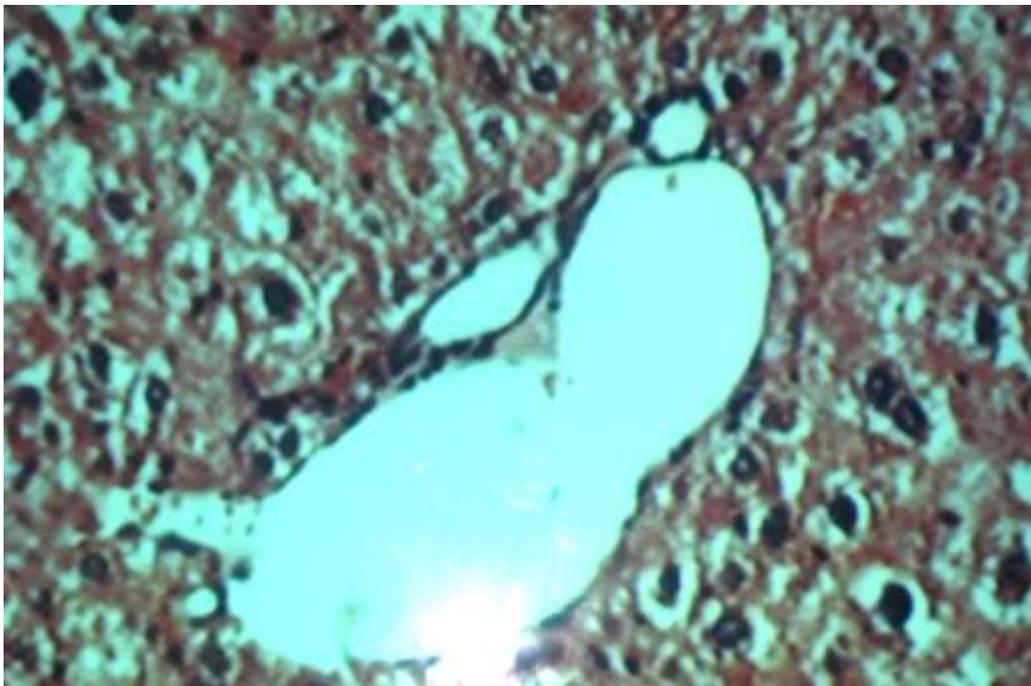




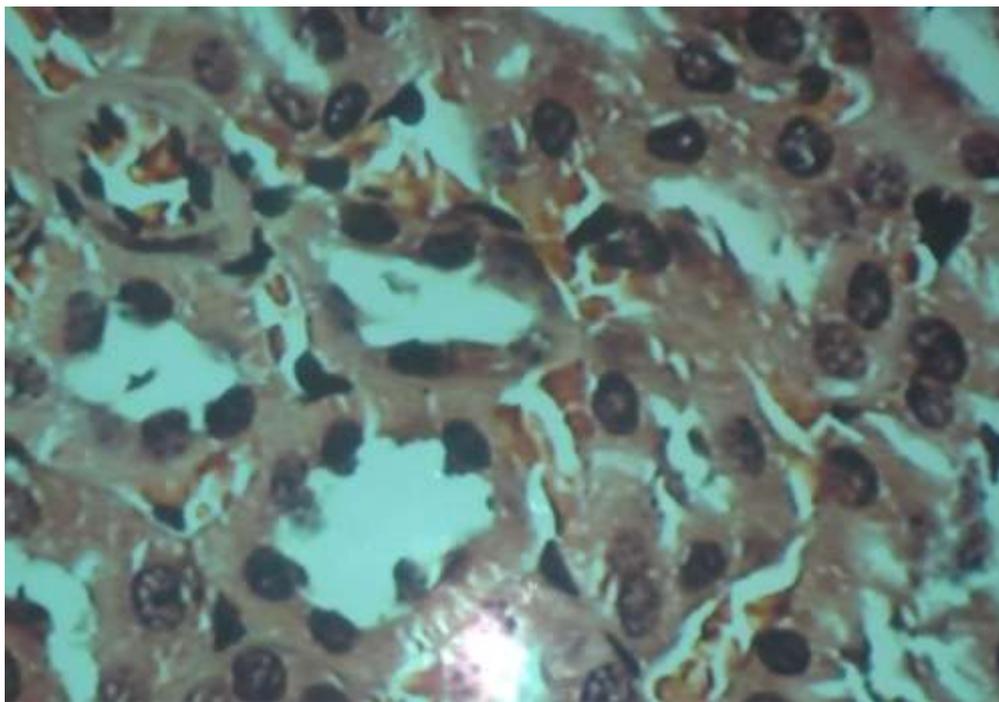
ANEXO 6. LECTURAS HISTOPATOLÓGICAS DE ORGANOS FARMACOCINETICOS.



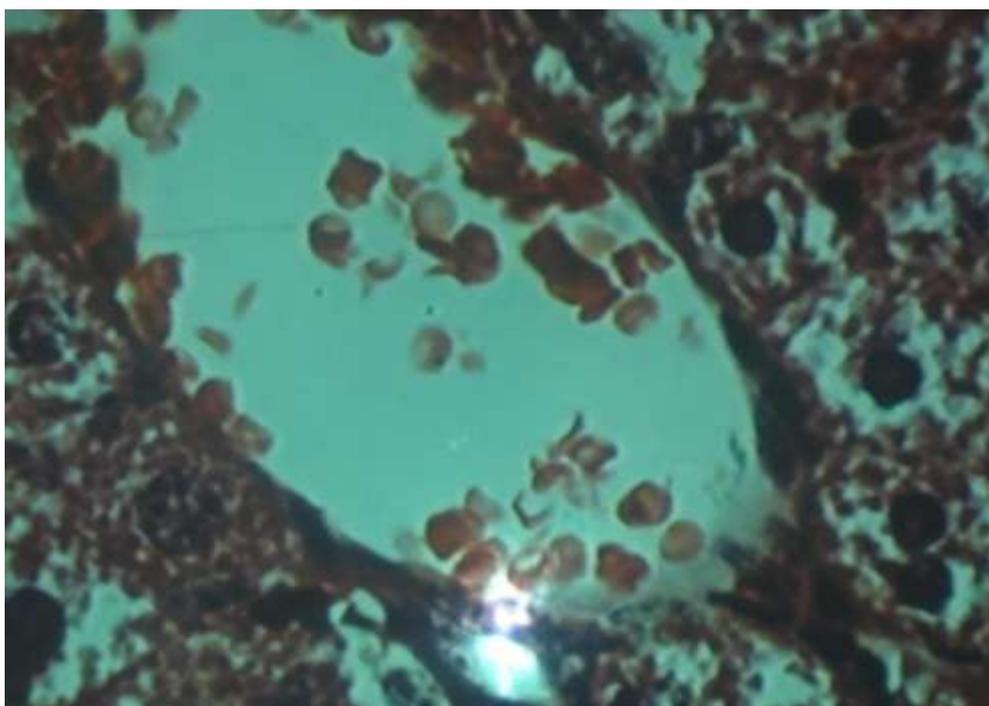
FOTOGRAFIA N°24 *Corte Histológico de estomago RG1, HE 10X*



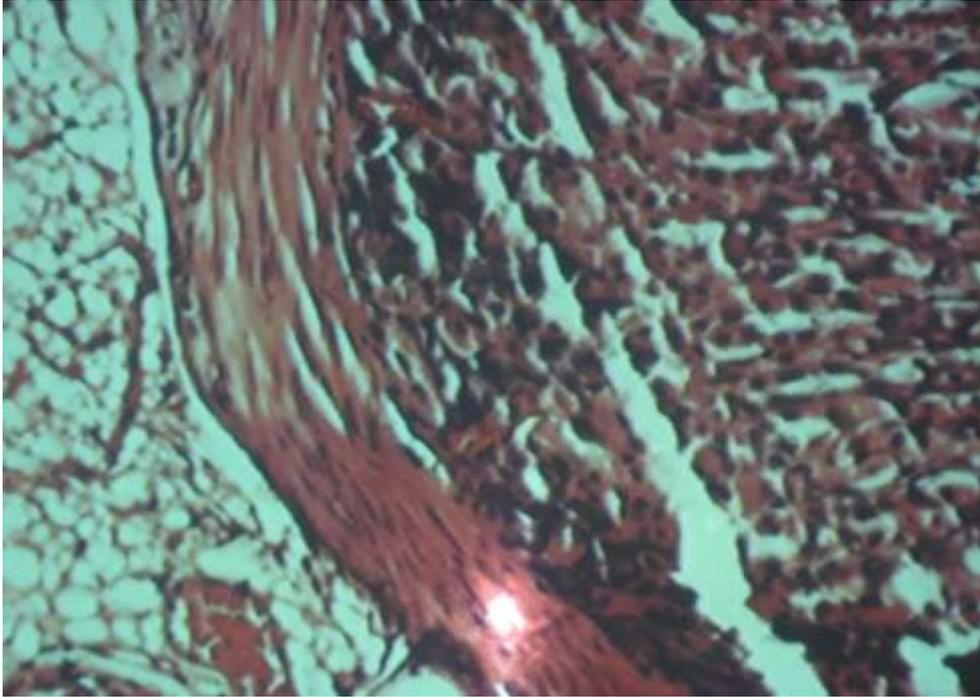
FOTOGRAFIA N°25 *Corte Histológico de Hígado, Parénquima Hepático RG1, HE 40X*



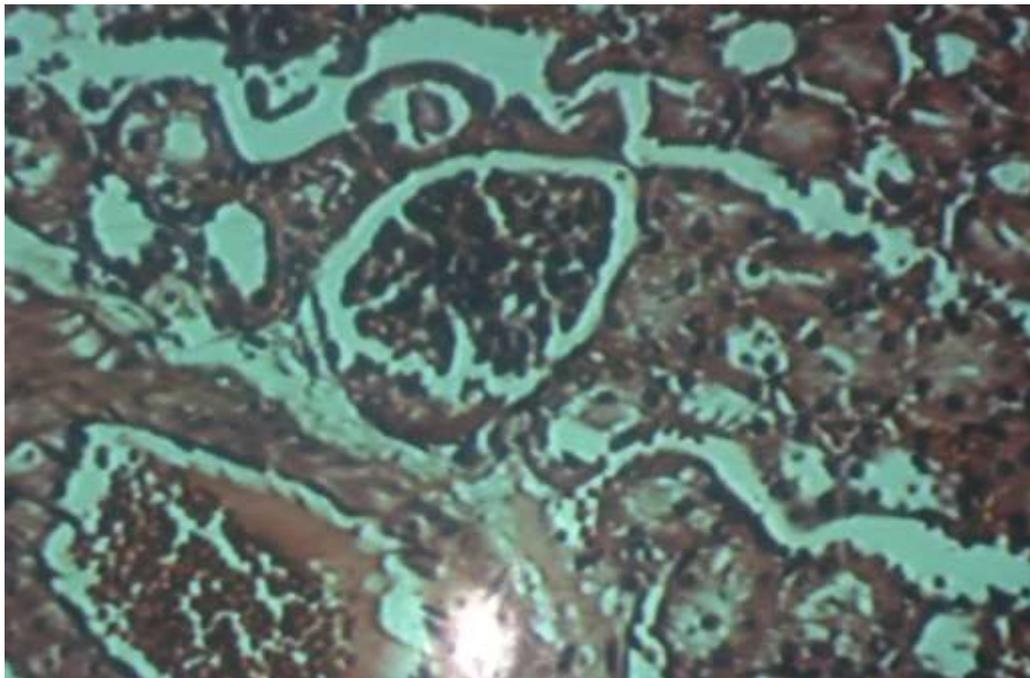
FOTOGRAFIA N°26 *Corte Histológico de Riñón, Túbulos renales RG1, HE 40X*



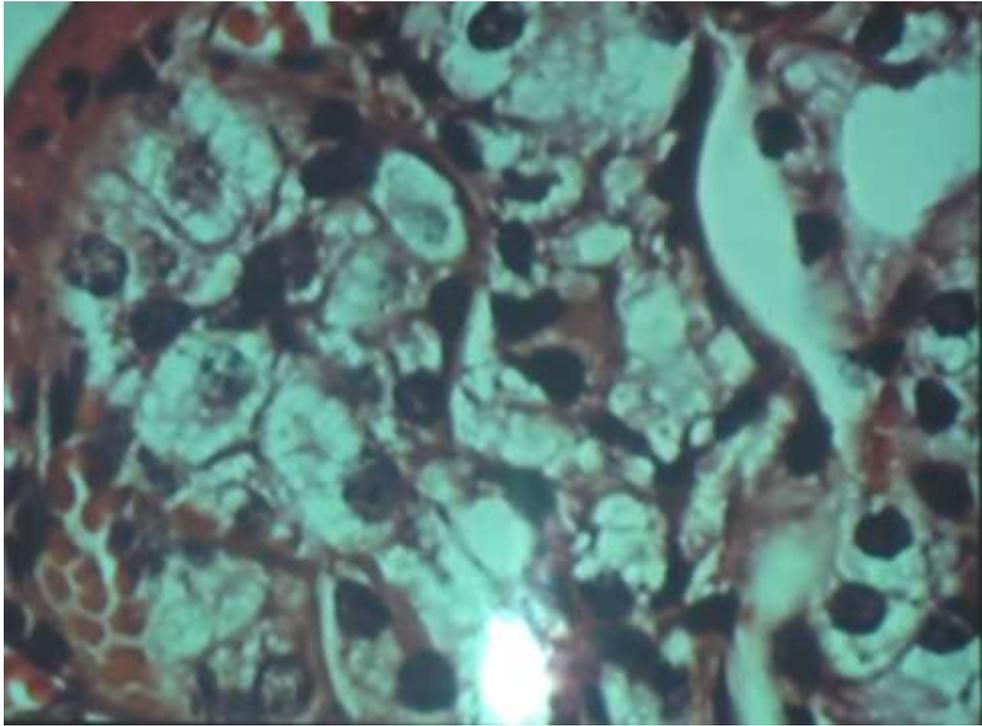
FOTOGRAFIA N°27 *Corte Histológico de hígado, Parénquima hepático RG2, HE 40X*



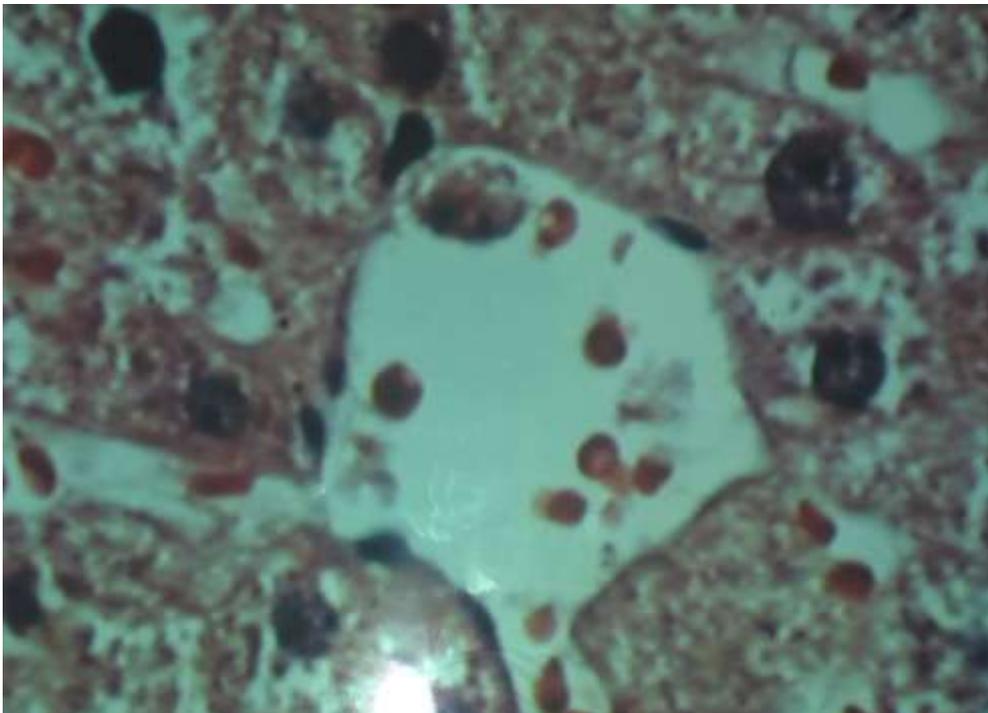
FOTOGRAFIA N°28 *Corte Histológico de estomago RG2, HE 40X*



FOTOGRAFIA N°29 *Corte Histológico de Riñón, Túbulos renales, Glomérulo, capsula de Bowman RG2, HE 40X.*



FOTOGRAFIA N°30 *Corte Histológico de Estomago, mucosa gástrica glándulas mucosecretoras RG3 HE 40X.*



FOTOGRAFIA N°31 *Corte Histológico de Estomago, mucosa gástrica glándulas mucosecretoras RG3 HE 40X.*



FOTOGRAFIA N°32 *Corte Histológico de Riñón, glomérulo renal, capsula de Bowman. RG3 HE 40X*

ANEXO 7. BASE DE DATOS PARA EL ANALISIS ESTADISTICO DE LA VARIACION DE LA MASA CORPORAL DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION DURANTE EL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA.

DOSIS 16 mg/Kg			GRUPO 32 mg/Kg			GRUPO 64 mg/Kg			GRUPO TESTIGO		
DI A	PESO PROM	RELACION	DI A	PESO PROM	RELACION	DI A	PESO PROM	RELACION	DI A	PESO PROM	RELACION
1	33,62	1,00	1	30,24	1,00	1	33,72	1,00	1	30,15	1,00
2	33,78	1,00	2	30,15	1,00	2	33,69	1,00	2	29,9	0,99
3	32,58	0,97	3	30,05	0,99	3	33,24	0,99	3	30,1	1,00
4	32,51	0,97	4	29,68	0,98	4	33,25	0,99	4	30,25	1,00
5	32,35	0,96	5	29,85	0,99	5	32,98	0,98	5	30,37	1,01
6	31,88	0,95	6	29,65	0,98	6	32,85	0,97	6	30,49	1,01
7	32,44	0,96	7	29,7	0,98	7	32,95	0,98	7	30,37	1,01
8	32,32	0,96	8	29,84	0,99	8	33,1	0,98	8	30,56	1,01
9	32,37	0,96	9	29,4	0,97	9	32,84	0,97	9	30,49	1,01
10	32,19	0,96	10	29,64	0,98	10	32,75	0,97	10	30,67	1,02
11	32,29	0,96	11	29,41	0,97	11	32,87	0,97	11	30,52	1,01
12	32,33	0,96	12	29,38	0,97	12	32,64	0,97	12	30,7	1,02
13	32,28	0,96	13	29,25	0,97	13	32,59	0,97	13	30,65	1,02
14	32,35	0,96	14	29,15	0,96	14	32,48	0,96	14	30,72	1,02

CONTROL ESTADISTICO POR ATRIBUTOS		
LCS	LCI	Peso Medio
1,01	0,96	0,98

ANEXO 8. REPORTE DE RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS EMITIDO POR EL DR. OSWALDO DUQUE (ANATOMO-PATOLOGO SOLCA-CHIMBORAZO)

Riobamba 23 de octubre 2011

REPORTE HISTOPATOLOGICO

Se analizó los cortes histológicos correspondientes a Estómago, Hígado y Riñón pertenecientes a ratones de experimentación, cuales recibieron distintos tratamientos conforme a Dosis administradas por vía orogástrica, encontrándose los siguientes resultados a nivel de parénquima gástrico, hepático y renal respectivamente.

Tratamiento (mg/Kg)	P. Gástrico	P. Hepático	P. Renal
16	S.D	S.D	S.D
32	S.D	S.D	S.D
64	S.D	S.D	S.D

*S.D= Sin daño al parénquima

Recalcando que se encontró en todos los casos congestión vascular debida a la forma de muerte.


Dr. Oswaldo Duque
ANATOMOPATÓLOGO

ANEXO 9. DATOS DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE DE ESTUDIOS REALIZADOS DE *Malmea depressa* y *Morus alba*

322

A. Andrade-Cetto et al. / Journal of Ethnopharmacology 100 (2005) 319–322

Table 1
Effect of oral administration of extracts of *Malmea depressa* root on plasma glucose concentration in diabetic rats

Treatments	Blood glucose levels (mg/dl) ± standard error			
	T0	T60	T120	T180
Control (+) no diabetic (vehicle)	131 ± 6a	143 ± 2a	137 ± 3a	132 ± 5a
Control (-) (vehicle)	410 ± 10a ¹	408 ± 25a ¹	413 ± 19a ¹	442 ± 12a ²
Glibenclamide (3 mg/Kg bw)	418 ± 11a ¹	349 ± 26a ¹	317 ± 28b ²	318 ± 19b ²
Metformin (14.16 mg/Kg bw)	390 ± 20a ¹	308 ± 19a ¹	260 ± 16b ²	239 ± 23b ²
<i>Malmea depressa</i> aqueous extract (40 mg/Kg bw)	411 ± 11a ¹	344 ± 16a ¹	268 ± 21b ²	296 ± 28b ²
<i>Malmea depressa</i> aqueous extract (80 mg/Kg bw)	408 ± 17a ¹	328 ± 7a ¹	329 ± 14a ¹	306 ± 17b ²
<i>Malmea depressa</i> etanolic extract (113 mg/Kg bw)	407 ± 12a ¹	324 ± 14a ¹	277 ± 14b ²	248 ± 11b ²
<i>Malmea depressa</i> butanolic extract (80 mg/Kg bw)	397 ± 17a ¹	347 ± 17b ²	313 ± 20b ²	316 ± 12b ²

The values represent the mean ± S.E.M. as compared with control time intervals. Different letters in the same row, indicate statistical differences as compared to time 0, different numbers on the same column indicate statistical difference against the control group, all significances at least $p < 0.05$.

4. Discussion

Our ethnopharmacological studies as well as our experimental pharmacological data confirm that *Malmea depressa* shows clear hypoglycemic activity which is in accordance to the traditional use in Yucatan state as an infusion of the root for the treatment of diabetes type 2.

The diabetes induction by STZ and the use of glibenclamide and metformin in this animal model were discussed previously (Andrade-Cetto et al., 2000; Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2001; Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2004).

All three extracts (aqueous, ethanolic, butanolic) of *Malmea depressa* root produce a hypoglycemic effect in rats. The water extracts show a significant activity after 120 min; the higher dosage shows a higher activity compared with the lower one at 60 min. The maximum effect of both water extracts was observed after 180 min of treatment.

Our preparations given in the animal model is equivalent to the usage given daily traditionally to man (dosage of 80 mg/kg WE in rat = 36 g/l WE in man). Besides the already discussed administration as an "agua de uso" we tested the acute effect of *Malmea*-extracts, too.

Therefore we included as a single-dose the application of 40 mg/kg (in rat = 18 g/l in man) in our study. Similarly, the ethanolic extract was administered. The results of our testings are shown in Table 1.

As we could determine in all extracts the same compounds contained we may assume that those components are connected with the pharmacological activity.

Further studies will be done to determine the mechanisms of the activity of the extracts as well as for isolated compound.

and ethnopharmacological aspects, to M.V.Z. Mario Soriano-Bautista, Biol. Dora Saizar and Biol. Isabel Antunez for housing the animals. This work was partially supported by DGAPA, PAPIIT project IN204703.

References

- Argueta, V.A. (Coordinador) 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. II. Instituto Nacional Indigenista, Mexico, p. 611.
- Ankli, A. 2000. Yucatec Mayan Medicinal Plants: Ethnobotany, Biological Evaluation and Phytochemical Study of *Crossopetalum gaumeri*. Ph. D. Dissertation ETH Zürich, Nr. 13555, p. 289.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., Revilla-Monsaive, M.C., Islas, S., 2000. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 129–133.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 78, 145–149.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2004. Hypoglycemic effect of *Acosmium panamense* bark on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 217–220.
- Gutiérrez-Lugo, M.T., Barrientos-Benitez, T., Luna, B., Ramirez-Gama, R.M., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine* 2, 341–347.
- Heinrich, M., Ankli, A., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Bran, R., Schmid, C., Weiss, C., Brugisser, C., Gertsch, J., Wasescha, M., Stecher, O., 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 43–52.
- Holmsted, B., 1991. Historical perspective and future of Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 1, 7–24.
- Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), 1999. Guideline of Selected Techniques for Rat and Mouse Blood Collection, Guideline 9, USA, p. 6.

Table 1

Effect of *Morus alba* (MRBF-3) oral administration on body weight (g), serum glucose (mg/dl), serum insulin hormone (μ U/ml) and lipid peroxides production, described as nmol TBARS/ml serum in STZ-diabetic treated rats

	Control (untreated)	STZ-diabetic rats	STZ-diabetic rats fed on MRBF-3
Body weight (g)	230 \pm 3.77	207 \pm 2.49*	225.98 \pm 2.06 [†]
Serum glucose (mg/dl)	143.45 \pm 7.84	378.77 \pm 8.72*	155.07 \pm 8.35 [†]
Serum insulin (μ U/ml)	17.18 \pm 1.49	10.75 \pm 0.28*	15.58 \pm 0.25 [†]
Lipid peroxides	5.29 \pm 0.72	6.26 \pm 0.81*	5.13 \pm 0.67 [†]

Results are expressed as means \pm S.E.M. (n = 10).

* Significantly different from controls ($P < 0.05$).

[†] Significantly different from diabetic control ($P < 0.05$).

to the normal control rats (Table 1). On the contrary, the STZ-diabetic rats fed on MRBF-3 showed a significant decline in serum glucose level to a value of 155 mg/dl, $P < 0.05$ (which was nearly similar to those of normal control group) as compared to STZ-diabetic rats (Table 1). Consequently, serum insulin level had been significantly improved after administration of MRBF-3 to STZ-diabetic rats (15.6 μ U/ml; $P < 0.05$), as compared with STZ-induced diabetic rats (10.8 μ U/ml; $P < 0.05$) (Table 1).

The production of lipid peroxides was significantly decreased in MRBF-3 treated STZ-diabetic rats from 6.3 to 5.1 nmol TBARS/ml serum; $P < 0.05$. The lipid peroxides was 5.3 nmol TBARS/ml serum for normal control rats, $P < 0.05$ (Table 1).

4. Discussion

Asian and Egyptian mulberry tree (*Morus alba*, *Morus australis*, *Morus bombycis*, *Morus mongolica* and *Morus lhou*) is a candidate of promising drugs, because the plant has been widely cultivated in many countries and has been traditionally used in treatment of several diseases (Nomura, 1988; Chen et al., 1995).

Fractionation of 70% alcohol extract of *Morus alba* root bark over cellulose column chromatography using H₂O, 50% MeOH and MeOH yielded three fractions, F-1, F-2 and F-3, respectively. TLC investigations of the three fractions indicated that F-3 was the richest one of flavonoids and was moranoline free. Therefore, this fraction (MRBF-3) was subjected to in vivo screening. It showed a promising hypoglycemic and inhibition of lipid peroxidation activities. So, it was subjected to chromatographic purification using different techniques in order to isolate its main constituents.

Four main flavonoids with one or two isoprenoid groups ($\log P = 5-9$)⁴ as well as a 2-arylbenzofuran ($\log P = 2.4$) were isolated and identified. These compounds may be attributed to the fact that the phenolic contents of *Morus alba* root bark extract act as free radical scavengers (Fukai et al.,

2003; Nomura et al., 1977, 1980; Sharma et al., 2001)⁵ that arise as a result of STZ-intoxication, resulting in alleviating the state of diabetes mellitus found in the STZ-induced diabetic rats (Furusho et al., 2002). Similar antihyperglycemic fraction containing 2-arylbenzofurans (moracin M and glycosides of 2-arylbenzofuran with an isoprenoid group) was prepared from the leaves of Argentine mulberry tree, *Morus insignis* (Basnet et al., 1993). Furthermore, some *Morus* flavones with a prenyl group at C-3 position have inhibitory potency against aldose reductase (Yamaguchi et al., 1991). It could be considered that hypoglycemic action of *Morus* root bark (Chen et al., 1989, 1995) is due to synergistic or additive action of moranoline (1-deoxynojirimycin), morans (glycopeptides), hydrophobic flavonoids (flavones and flavanones) and 2-arylbenzofurans.

The i.p. injection of streptozotocin in a dose of 60 mg/kg b.wt. into rats resulted in a state of type 1 diabetes mellitus (Sharifi et al., 2004). Ten days after STZ treatment, the diabetic rats exhibited a state of severe hyperglycemia as compared with normal control group as shown in Table 1.

Poor general conditions of the STZ-diabetic treated rats were observed. A significant decrease in body weight ($\downarrow -11\%$) was observed 10 days after STZ treatment when compared with intact normal control rats. It was observed that oral administration of MRBF-3 for 10 days normalized the body weight loss ($\uparrow +9\%$) elicited by STZ. The MRBF-3 treated STZ-diabetic rats showed significant rise in body weight to a value that was nearly similar to the intact control rats. This finding was in close agreement with that of other investigators (Junod et al., 1969; Craft and Failla, 1983; Failla and Kiser, 1981; Schwechter et al., 2003), who noticed a body weight gain upon improvement of the diabetes status.

The metabolism of glucose, proteins and lipids is abnormal in diabetes due to insulin secretion defect, leading to various metabolic disorders (Genuth, 1973; Goldstein et al., 2004) and complications (Saudek and Eder, 1979; Kannel and McGee, 1979). The STZ-diabetic rats elicited a signifi-

⁴ 1-Octanol-water partition coefficient ($\log P$): data from database of Chemical Abstract Service (SciFinder Scholar). These $\log P$ were calculated using Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris v.4.67.

⁵ The main flavonoid of MRBF-3, morusin (1), gives a minor pyranoflavone (\pm)-neocyclomorusin (3) by a radical reaction via a hydroperoxide with same skeletal structure of 3. On the other hand, (\pm)-cyclomorusin (2) is derived from 1 by the radical reaction under oxygen-free conditions. One of the roles of morusin (1) in the plants is presumably an antioxidant, a quencher of radical chain reactions.

cant elevation of serum glucose by $\uparrow+265\%$ associated with a decrease in serum insulin by $\downarrow-58\%$, indicating that their pancreatic β cells were irreversibly damaged.

Our data indicated that the oral administration of MRBF-3 for 10 days ($600 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) to the STZ-diabetic rats showed a significant reduction in serum glucose by $\downarrow-41\%$ and an increase in serum insulin level by $+44\%$ as compared to STZ-diabetic rats.

Lipid peroxidation is a marker of cellular oxidative damage initiated by reactive oxygen species (Farber et al., 1990). It was reported that diabetics are highly sensitive to oxidative stress (Pritchard et al., 1986; Baynes, 1991; Urano et al., 1991). In STZ-diabetic animals, the STZ generates nitric oxide, which is a powerful free radical oxidant (Kwon et al., 1994) results in an increase in serum level of lipid peroxides due to oxidation of cells (Wakame, 1999). The STZ-diabetic rats exerted a significant elevation of lipid peroxides (expressed as nmol TBARS/ml serum) by $\uparrow+15\%$ as compared to the normal control. The production of lipid peroxides was significantly decreased in MRBF-3 treated STZ-diabetic rats by $\downarrow-22\%$ as compared to STZ-diabetic rats (Table 1). In this experiment, the oral administration of the extract of *Morus alba* root bark (MRBF-3) suppresses the elevation of lipid peroxides in STZ-diabetic rats compared with control. The data included in this work suggested that MRBF-3 prevents cellular damage induced by STZ via inhibition of lipid peroxidation possibly through antioxidant mechanisms due to its high flavonoids content, which is in accordance with the reported data on this kind of compounds (Oh et al., 2002), as well as it preserves the capability of insulin secretion. Also, this finding was in accordance with the work done by Coskun et al. (2005) who reported that a natural antioxidant flavonol (quercetin) has protective effect in diabetes by decreasing oxidative stress and preservation of pancreatic β cell integrity. In our study however, we demonstrated the presence of five phenolic compounds in the active extract; the data of these compounds as hypoglycemic agents are not reported here. So, further detail experiments are required to clarify the role of these flavonoids and 2-arylbenzofuran as hypoglycemic agents.

5. Conclusions

The present study indicated that the flavonoids-rich fraction of 70% alcohol extract of the *Morus alba* root bark can recover from STZ-induced diabetes in rats. The fraction may protect pancreatic β cells from degeneration and diminish lipid peroxidation of cells. However, further merit investigations including clinical study are necessary in the future to confirm this hypothesis.

References

Basnet, P., Kadota, S., Terashima, S., Shimizu, M., Namba, T., 1993. Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing

- fractions of *Morus insignis*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 41, 1238-1243.
- Baynes, J.W., 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 40, 405-412.
- Chen, F.-J., Nakashima, N., Kimura, I., Kimura, M., 1989. Hypoglycemic activity of mulberry leaves (*Folium Mori*) and *Cortex Mori radices* in streptozotocin-induced diabetic mice fasted and none fasted. Wakan Iyaku Gaku Kaishi 6, 374-375.
- Chen, F.-J., Nakashima, N., Kimura, I., Kimura, M., 1995. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium Mori*) and *Cortex Mori radices* in streptozotocin-induced diabetic mice. Yakugaku Zasshi 115, 476-482.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. Pharmacological Research 51, 117-123.
- Craft, N.E., Failla, M.L., 1983. Zinc, iron, and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rat. American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism 244, E122-E128.
- Failla, M.L., Kiser, R.A., 1981. Altered tissue content and cytosol distribution of trace metals in experimental diabetes. The Journal of Nutrition 111, 1900-1909.
- Farber, J.L., Kyle, M.E., Coleman, J.B., 1990. Biology of disease: mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Laboratory Investigation 62, 670-679.
- Fukai, T., Nomura, T., 1998. Proof against $2'$ -hydroxy-3-prenylflavone-oxygen complex by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 12, 1945-1951, and references cited therein.
- Fukai, T., Satoh, K., Nomura, T., Sakagami, H., 2003. Antinephritis and radical scavenging activities of prenylflavonoids. Fitoterapia 74, 720-724.
- Furusko, T., Kataoka, E., Yasuhara, T., Wada, M., Innami, S., 2002. Administration of β -carotene suppresses lipid peroxidation in tissues and improves the glucose tolerance ability of streptozotocin-induced diabetic rats. International Journal for Vitamin and Nutrition Research 72, 71-76.
- Genuth, S.M., 1973. Plasma insulin and glucose profiles in normal, obese, and diabetic persons. Annals of Internal Medicine 79, 812-822.
- Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D., Peterson, C.M., Sacks, D.B., 2004. Test of glycemia in diabetes. Diabetes Care 27, 1761-1773.
- Gordon, C., Yates, A.P., Davies, D., 1985. Evidence for a direct action of exogenous insulin on the pancreatic islets of diabetic mice: islet response to insulin pre-incubation. Diabetologia 28, 291-294.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology 186, 1-85.
- Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y., Konno, C., 1985. Validity of the oriental medicines. 80. Antidiabetes drugs. 4. Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root bark. Planta Medica, 159-160.
- Jin, W.Y., Na, M.K., An, R.B., Lee, H.Y., Bae, K.H., Kang, S.S., 2002. Antioxidant compounds from twig of *Morus alba*. Natural Product Sciences 8, 129-132 (Chemical abstracts 139, 106237).
- Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E., 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. The Journal of Clinical Investigation 48, 2129-2139.
- Kannel, W.B., McGee, D.L., 1979. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. The Journal of the American Medical Association 241, 2035-2038.
- Kappus, H., 1987. Oxidative stress in chemical toxicity. Archives of Toxicology 60, 144-149.
- Kim, E.S., Park, S.J., Lee, E.J., Kim, B.K., Huh, H., Lee, B.J., 1999. Purification and characterization of Moran 20K from *Morus alba*. Archives of Pharmacal Research 22, 9-12.