



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE
Oreocallis grandiflora EN RATAS (*Rattus norvegicus*) POR INHIBICIÓN DE
ALFA-AMILASA”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

DAVID ISRAEL GUERRERO VACA

TUTOR

Dr. FRANCISCO PORTERO

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a mis padres Neptalí y Carmita, que siempre me brindaron el apoyo incondicional para salir adelante mientras tenía resbalones durante mi formación estudiantil y por formarme como ser Humano.

A mi hermana Paola, que nunca dudó en apoyarme mientras estaba desarrollando la parte experimental de este trabajo investigativo.

A mis hermanos Danilo y Darío por siempre estar pendientes de los avances que daba mientras cursaba la etapa Politécnica, por darme palabras de aliento y ser esa, mi inspiración para no darme por vencido.

A las personas que padecen de Diabetes, para que tengan la esperanza de conocer que muchas personas están involucradas en el desarrollo de nuevos métodos para ayudarles a tener una vida normal y con tratamientos que no sean costosos y naturales.

AGRADECIMIENTO

Con sus plumas te cubrirá, Y debajo de sus alas estarás seguro. Escudo y adarga es su verdad. Caerán a tu lado mil, Y diez mil a tu diestra; Mas a ti no llegará. (Salmos 91:4 y 7)

Agradezco a Dios por darme la fuerza necesaria para seguir luchando día tras día, por bendecirme siempre y sentir su protección en cada paso que doy.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por confiar en los jóvenes que ingresan y de una u otra forma darnos el apoyo necesario para continuar adquiriendo conocimientos que en algún tiempo brindaremos a otras generaciones y así ayudar a la sociedad.

Al Dr. Francisco Portero por aceptar ser el tutor del tema de investigación y aportar con grandes conocimientos para ejecutar con responsabilidad y ética el desarrollo de la tesis.

A Fausto Contero y Diego Vinuesa por brindarme su amistad y hacer de este proyecto investigativo una realidad y ayudarme a culminar con éxito la investigación realizada

A mis amigos (Juan Carlos, Byron, Carlos, Alberto, Luis y Verito) que me otorgaron su más sincera amistad y que de aula en aula nos apoyamos incondicionalmente.

Al amor de mi vida por ser mi inspiración para cumplir mi objetivo establecido y darme la felicidad y la compañía para hacer de este trabajo algo insólito e inolvidable.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Oreocallis grandiflora* EN RATAS (*Rattus norvegicus*) POR INHIBICIÓN DE ALFA-AMILASA**”, de responsabilidad del señor egresado David Israel Guerrero Vaca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez
DECANO FAC. CIENCIAS

Dr. Francisco Portero
DIRECTOR ESCUELA
BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Dr. Francisco Portero
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Fausto Contero
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Jacinto Mera
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Eduardo Tenelanda
COORDINADOR
SISBIB – ESPOCH

NOTA DE TESIS

Yo, **David Israel Guerrero Vaca**, 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 POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

DAVID ISRAEL GUERRERO VACA

RESUMEN

En la investigación se evaluó la actividad hipoglicemiante del extracto de las hojas de *Oreocallis grandiflora*, en Ratas (*Rattus norvegicus*) por inhibición de alfa-amilasa, realizada en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Se aplicó técnicas analíticas espectrofotométrica para estimar la cantidad de flavonoides totales; métodos de extracción para purificar los componentes activos, preparación del extracto acuoso para la administración. En un lapso de 30 días, se realizó la evaluación el estudio del extracto acuoso en 6 grupos de 5 animales de Ratas machos: grupo blanco no se administró ninguna sustancia; grupo control negativo, administración solo almidón 2g/kg de peso; grupo control positivo, almidón 2g/kg y acarbosa 50 mg/Kg peso; grupo concentración baja, solución de almidón y 0.02 mg/mL del extracto; grupo concentración media, solución de almidón y 0.04 mg/mL del extracto y grupo concentración alta solución de almidón y 0.08 mg/mL del extracto. Las muestras para la medición de glucosa fueron tomadas en intervalos de días (día 1, 5, 15 y 30) y en cada día se midieron en tiempos determinados a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de los sustratos; se midieron los niveles de colesterol y triglicéridos en intervalos de tiempo (día 1, 5, 15 y 30).

La acción farmacológica empieza a producir a partir de la concentración de 0.04 mg/mL, y a una concentración de 0.08 mg/mL su acción farmacológica es similar a la del medicamento que se encuentra en el mercado (Acarbosa). No presentó niveles de toxicidad aguda, esto se pudo verificar mediante un análisis de los órganos farmacocinéticos implicados (estómago, hígado y riñón).

En conclusión la acción farmacológica del extracto de *Oreocallis grandiflora* sobre la disminución de glucosa en sangre es efectiva y segura, porque no produce ninguna toxicidad en diferentes concentraciones.

Se recomienda poder darle una forma farmacéutica del extracto con posteriores criterios de industrialización dirigida en especial a los pacientes que padezcan de Diabetes mellitus tipo 2.

SUMMARY

In this investigation the activity of the hypoglycemic extract of *Oreocallis grandiflora* was evaluated in Rats (*Rattus norvegicus*) by the inhibition of alpha amylase, the School of Biochemical and Pharmacy under the Faculty of Sciences of Superior Technical Colles of Chimborazo.

Spectrophotometric analytic techniques were applied to estimate the total amount of flavonoids through methods of extraction to purify the active components, and preparation of watery extract for administration. For a period of 30 days, an evaluation of the study of the watery extract was carried out in 6 groups of 5 male rats. The white group was not administration any substance. The negative control group was administered only a starch solution of 2 g/Kg. The positive control group was given 2 g/Kg and 50 mg/Kg of acarbose. The low concentration group was given the starch solution and 0.02 mg/mL of the extract. The medium concentration group was administered the starch solution and 0.04 mg/mL of the extract. The high concentration group was given the starch solution and 0.08 mg/mL of the extract. The samples for measurements of glucose were taken in intervals of days (day 1, 5, 15 and 30) and everyday they werw taken at set times of 30, 60, 90 and 120 minutes after the administration of the substrates. The levels of cholesterol and triglycerides were measure at intervals of times (day 1, 5, 15 and 30).

The pharmacologic scope beging to produce after the concentration amount of 0.04 mg/mL and with a concentration of 0.08 mg/mL it's pharmacologic scop is similar to that of medication found on the market (acarbose). There were no levels of acute toxicity found. This can be verified through an analysis of the implied pharmacokinetic organs (stomach, liver and kidneys).

In conclusion the pharmacologic scope of the *Oreocallis grandiflora* in relation to the decrease of glucose in blood is effective and safe because it produces no toxicity at diferent concentration levels.

It's is recommended that the extract be given in a pharmaceutical form with past criteria of industrialization direct especially for patients who suffer from type 2 Diabetes Mellitus.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial alrededor de unos 366 millones de personas presentaron diabetes en el año 2011, más de la tercera parte son del DM tipo 2, de acuerdo con datos que otorga el Atlas de la Federación Internacional de Diabetes (FID). De acuerdo con los datos obtenidos, esta organización calcula que para el año 2030 habrá un exceso de más de los 550 millones de individuos que presenten esta enfermedad. La mayoría de las personas con diabetes se encuentran en la edad de 40 y 59 años. Esta entidad alerta de que dicha enfermedad adquirió 4.6 millones de vidas en el año 2011 (FDI. 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene claro el incremento incontrolado de esta enfermedad por lo que ha creado diferentes planificaciones para tratar de ayudar a la población y mejorar su estado de vida.

El trabajo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se fomenta con varias estrategias como promulgar a una alimentación sana que esté acompañada de ejercicio físico. Con esto se piensa que se reduciría en cantidad considerable el sedentarismo, el exceso de peso y una salud estable en las personas (OMS. 2013).

La Diabetes Mellitus en el Ecuador es considerada actualmente como la epidemia del siglo, factores como la obesidad y el estilo de vida inadecuada están provocando un aumento en la prevalencia de esta patología considerada actualmente como la primera causa de muerte en nuestra población (MSP. 2013).

De acuerdo a los datos provenientes de la notificación mensual de epidemiología del Ministerio de Salud Pública, en el Ecuador la enfermedad de la Diabetes Mellitus ha experimentado un incremento sostenido en el periodo 1994-2009, ascenso notable más pronunciado en estos tres últimos años. Para el 2009, los casos notificados fueron de 68,635. La afectación de la enfermedad de DM, se encuentra con mayor nivel en la región costa y no se queda por mucho la región insular, cabe destacar que también las personas más propensas a ser afectados por esta enfermedad son las mujeres (MPS. 2013).

La utilización de remedios caseros o de plantas medicinales que son utilizados con el propósito de controlar los niveles séricos de glucosa en sangre, han tenido un gran auge en esta última década, con la finalidad de tener una gama de medicina natural.

Por otra parte debido al gran costo que implica el tratamiento de un paciente por consumir diferentes medicamentos, que llega alrededor de 465.000 millones de dólares en el año 2011, (FDI) (38), es necesario también buscar diferentes medidas que coadyuven a mejorar los síntomas de las personas afectadas con esta enfermedad crónica, y que mejor que se pueda explotar de una manera considerable lo etnobotánico de nuestro país, reduciendo ampliamente los gastos que adjudican el presentar dicha enfermedad, para con ello mejorar su estado de vida tanto personal como el de sus familiares.

A más de estas plantas medicinales también en la ciudad de Loja se ha realizado un estudio con diferentes especies de plantas entre ellas la *Oreocallis grandiflora*, cuyo resultado del experimento realizado in vitro, dedujo la actividad hipoglucemina, a través de la inactivación de enzimas amilolíticas como α -amilasa y α -glucosidasa, con el propósito de disminuir el metabolismo de los hidratos de carbono, para mantener a los pacientes normoglicémicos, y así reducir en lo más posible las afectaciones que conlleva el presentar Diabetes Mellitus. Este trabajo investigativo sirvió como base para el desarrollo de mi investigación in vivo, y concordando con las conclusiones obtenidas dando así una relevancia en la aplicación de este gran vegetal para la utilización en una enfermedad crónica que avanza con niveles de mortalidad a pasos gigantes (Alejandro-Espinoza M. 2012).

Por otro lado en lo que compete al método utilizado sobre la determinación posprandial de glucosa, se tomó como guía el estudio publicado por La Sociedad Real de Químicos publicados en el 2011, en la que utilizaron almidón soluble disuelto en solución salina para producir la hiperglicemia y cuya determinación se fundamentan en el cálculo del Área Bajo la Curva en tiempos determinados. (Ashok K. et al, 2011).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 DIABETES

La Diabetes proviene del griego *atravesar* ya que se creía que el agua pasaba a través del paciente como un tubo sin retención del organismo. El agua ingerido pasaba rápidamente a los riñones siendo excretados por la orina, es por ello los síntomas de poliuria y polidipsia (López M. et al. 2006).

La Diabetes Mellitus (DM) es una agrupación de enfermedades o trastornos metabólicos caracterizado por el aumento de glucosa en la sangre lo que se conoce como hiperglicemia, producido por una falta de elaboración de la hormona insulina, o tal vez por una falta de interacción entre los carbohidratos metabolizados y la insulina, o también con las proteínas y los lípidos (Toumiletho J. 2001).

Los principales síntomas de la Diabetes son: poliuria (exceso de orina), polifagia (incremento de la necesidad de comer), polidipsia (aumento de la necesidad de tomar agua) y disminución en el peso corporal sin motivo (OMS. 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece tres tipos de DM: Diabetes Mellitus tipo 1, Diabetes Mellitus tipo 2 y Diabetes Gestacional (que se da en la etapa de gestación), cada una se caracteriza por diferentes tipos de síntomas cada una con diferentes causas y diferentes influencias.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el año 2002 había en el mundo, por cada 100.000 habitantes, unas 3.000 personas con DM y se producían 190 nuevos casos al año. Las previsiones de la OMS para el año 2030 son de 366 millones de diabéticos en todo el mundo. La mayoría de ellos serán DM tipo 2; esta afección alcanzará dimensiones de auténtica epidemia en los países desarrollados.

El aumento considerable se le adjudica al sobrepeso, sedentarismo, al incremento en las personas ancianas, y la mala alimentación. Cuantificar la prevalencia y el número de personas afectadas por la Diabetes es, por lo tanto, clave para la planificación y la distribución de recursos (Ruiz M. 2006).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) comunica que la enfermedad se puede dar por diferentes causas que puede incluir por influencia ambiental y trastornos genéticos, también se debe a los antecedentes familiares que hayan presentado DM, sedentarismo y sobrepeso, gestación, ansiedad o estrés (OMS 2013).

En el Ecuador, la DM es la primera causa de muerte en el año 2011 según informes de estadística de INEC; la ministra de salud, Carina Vance, aseguró que el incremento de casos de Diabetes, está siendo de manera acelerada, y ha propiciado que esta enfermedad se ubique como la primera causa de muerte en este país. Si bien en el año 2001 el síndrome metabólico en el país ocupaba el sexto lugar entre las principales causas de fallecimiento, desde el año 2011 está en la primera posición, 6 de cada 10 ecuatorianos, mayores de 19 años tienen sobrepeso y obesidad, y 3 de cada 10 en edad escolar (MSP 2013).

1.1.1 CLASIFICACIÓN

En 1997 la Asociación Americana de Diabetes (ADA), promulgó una clasificación que está en vigencia. Se basa fundamentalmente en su etiología y característica fisiopatológica. Se incluyen cuatro niveles de personas que padecen de la enfermedad. (Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2006)

1. Diabetes Mellitus tipo 1
2. Diabetes Mellitus tipo 2
3. Otros tipos específicos de Diabetes
4. Diabetes Gestacional

1.1.1.1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1)

Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1) se le conocía anteriormente como diabetes insulino dependiente o diabetes de inicio juvenil, es un trastorno autoinmune que implica la destrucción de las células por (activado células y macrófagos C04 + C08 + y T) que infiltran los islotes pancreáticos (Ahmad S. 2012).

En la DM 1 las células beta del páncreas se destruyen lo que induce a la insuficiencia de producción de insulina. El diagnóstico en los pacientes se determina en la etapa de la pubertad, y la única forma de tratamiento es la administración de insulina para que la persona pueda vivir por un período mayor de tiempo (Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2006).

1.1.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2)

Este es el tipo más común de Diabetes, que corresponde a 85-90% de los casos en el mundo. La hiperglicemia está causada por una combinación de deficiencia de secreción de insulina y su acción. Un fallo progresivo de las células beta es una característica importante de la enfermedad. Una destrucción inmunológica rara vez progresa a un punto en el que el paciente se convierte en dependiente de insulina para sobrevivir. La cetoacidosis es poco frecuente y por lo general asociada con la Diabetes Mellitus. La enfermedad es más común después de los 40 años de edad, pero hoy en día esto se encuentra aumentado en los adultos jóvenes y adolescentes debido al incremento de la obesidad. DM 2 se asocia con varios trastornos metabólicos incluyendo la obesidad, la hipertensión, el aumento de los pacientes con arterioesclerosis, dislipidemias (Ahmad; S., 2012).

No existe marcadores clínicos en los que se pueda determinar si existe alguna alteración tanto de la producción de insulina como los receptores de las células que ayudan al ingreso de la glucosa al interior de la célula, por lo que si se observa en adultos un incremento de peso (obesidad) se sugiere que existe una alteración en los receptores insulínicos, por el contrario una disminución del peso sería una alteración en la producción de la hormona. (Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2006).

La DM tipo 2 aparece por un problema de resistencia tisular a la acción de la insulina asociado a un defecto más o menos evidente de la secreción de la misma. (López M. et al. 2006).

Más del 90% de todas las DM son del tipo 2. Por sexos predomina ligeramente en la mujer. Como es el tipo de Diabetes más relacionada con el envejecimiento, la obesidad, y tiene mayor predisposición genética que la DM tipo 1, su prevalencia va en aumento. El factor hereditario es incuestionable, por cuanto casi el 100% de los hermanos gemelos univitelinos de pacientes diabéticos tipo 2 acabarán por ser también diabéticos, así como más del 40% de los hermanos y gemelos no idénticos.

Para el tratamiento al inicio de la enfermedad deberá ser hipoglucemiantes (HO) o antidiabéticos orales (ADO) (López M. et al. 2006).

1.1.1.3 Otros tipos específicos de Diabetes

1. MATURITY-ONSET DIABETES OF THE YOUNG (MODY).

Este tipo de Diabetes se caracteriza por la enfermedad de inicio temprano (por lo general antes de los 25 años) y un modo de herencia autosómico dominante. Las mutaciones en ciertos genes implicados en la regulación de la secreción de insulina han demostrado ser la causa de la hiperglicemia y la resistencia a la insulina es muy raro. MODY se pensaba que era raro, pero los datos recientes sugieren que el 2-5% de todos los casos de DM2 puede ser de tipo MODY (Ahmad S. 2012).

2. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL.-

Se presenta por un trastorno del metabolismo de los carbohidratos, que se desarrolla durante el período de gestación. De acuerdo a la severidad se determinara si requiere o no de la administración de insulina, la enfermedad puede prolongarse después de la gestación, puede aparecer de cada 10

mujeres en una por lo menos (Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2006).

1.1.2 CUADRO CLÍNICO

En el caso de que todavía no se haya diagnosticado la DM ni comenzado su tratamiento, o que no esté bien tratada, se pueden encontrar los siguientes signos (Corel V. 2000)

1. Poliuria, polidipsia y polifagia.
2. Disminución de peso.
3. Cansancio y debilidad.
4. Disminución de la visión o cetonuria.
5. Glucosuria (presencia de glucosa en la orina).
6. Dolor a nivel abdominal.
7. Hormigueo o entumecimiento de pies y manos, ulceraciones, o heridas que cicatrizan lentamente, piel seca.
8. Irritabilidad y cambios de ánimo.
9. Náuseas y vómitos.
10. Mal aliento

1.1.3 DIAGNÓSTICO

Se fundamenta en la revisión de los niveles de glicemia en una sola toma o en varias. La OMS presentó diferentes pautas para poder diagnosticar con precisión la Diabetes.

1. Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia o pérdida inexplicada de peso) en conjunto con glicemia igual o superior a 200 mg/dl (11.1 mmol/L) en cualquier instante del día.
2. Glicemia basal igual o superior a 126 mg/dl (7.0 mmol/L)
3. Glicemia igual o superior a 200 mg/dl (11.1 mmol/L) a las dos horas durante la realización de un test de tolerancia oral a la glucosa (Curva de glucemia con 75 g de glucosa en 375 ml de agua) (Corel V. 2000).

1.1.4 TRATAMIENTO

En cualquier tipo de Diabetes que presente el paciente, el único objetivo es mantener los niveles de glicemia normales y es así que para cada tipo, existen diferentes métodos para tratar de evitar el desequilibrio de glucosa en el organismo (Ahmad S. 2012).

1.1.4.1 Diabetes Mellitus tipo 1 y Diabetes Gestacional.

El tratamiento es mediante la aplicación de insulina regular por vía intravenosa e infusión de solución salina (Ahmad S. 2012).

1.1.4.2 Diabetes tipo 2.

Debido a los trastornos del metabolismo que implican la enfermedad, es necesario administrar diferentes medicamentos con la finalidad de mantener el nivel de glicemia. Por esta razón a más de administrar insulina al enfermo hay que coadyuvar de algunos antidiabéticos orales como: Metformina (biguanidas), Sulfonilureas (glibenclamida), inhibidores de la alfa-glucosidasa (acarbosea y miglitol), tiazolidinediones, mitiglinida, inhibidores de dipeptidil peptidasa IV, y las dosis van en dependencia de acuerdo a las necesidades del paciente. (Ahmad S. 2012).

1. Biguaninas (Metformina).

Actúa por medio de funciones extra pancreáticas, especialmente reduciendo la liberación de la glucosa almacenada en el hígado, pero también se cree que incrementa la especificidad de los receptores de insulina de las células. Contiene actividades favorables en los lípidos (en lo que respecta a la disminución de los niveles de colesterol total, triglicéridos y LDL), y también no ejerce un incremento en el peso corporal. La metformina efectúa esta acción de disminuir los niveles de glicemia y por ello es el medicamento de primera elección para pacientes que presentan sobrepeso en DM 2 (Ávila L. 2010).

2. Sulfonilureas (Glibenclamida).

Presenta una forma de acción que disminuye los niveles de glicemia de forma aguda, es decir ejecuta su acción a nivel de las células beta del páncreas para que exista una mayor liberación de insulina. También presenta una acción crónica porque potencializa la acción insulínica debido a su incremento en los receptores de insulina que presentan cada célula. El último mecanismo de acción se encuentra en discusión y se cree que mejor inhibe la actividad tóxica de la hiperglicemia (Ávila L. 2010).

3. Inhibidores de alfa-glucosidasa (acarbose).

Su mecanismo en donde ejerce su acción es a través de la inhibición de la alfa-amilasa y alfa glucosidasa que se localiza a nivel intestinal específicamente en las microvellosidades intestinales (sacarasa, maltasas, glucoamilasa, dextrinasas). Estas enzimas son las que actúan en la ruptura de los enlaces de oligosacáridos (sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa). El resultado de dicha inhibición es una demora en la digestión de los hidratos de carbono con reducción de los picos glucémicos postprandiales. Su utilidad clínica es la corrección de hiperglucemias postprandiales. Se puede utilizar sola o en combinación con insulina o sulfonilureas (Ávila, L., 2010).

4. Insulina.-

La insulina es un polipéptido de peso molecular 5800, compuesto por dos cadenas de aminoácidos, que en total tienen 51 aminoácidos. Las acciones de la insulina son complejas, entre ellas se destaca la oxidación de la glucosa y sirve como transporte para el ingreso de la glucosa al interior de la célula, en solo algunos minutos, mientras que otras acciones necesitan varias horas, como la incorporación de la timidina al DNA, estímulo de la síntesis proteica (Valsecia M. 2000).

1.1.5 COMPLICACIONES

1 La retinopatía diabética.

La retinopatía diabética, causado por el daño a la vascularidad de la retina, es una causa común de la ceguera y la discapacidad visual en la población en edad de trabajar. La ocurrencia de retinopatía diabética se puede reducir y/o prevenirse mediante el tratamiento adecuado y oportuno (Ahmad S. 2012).

2 La neuropatía diabética.

La neuropatía diabética clasificado como periférica, proximal, focal y autonómica, es la más común de todas las complicaciones de diabetes a largo plazo, con casi el 60% de los pacientes que suelen tener algún tipo de daño en los nervios. Es una enfermedad progresiva que supone la pérdida de sensación, así como el dolor y la debilidad, y puede conducir a la amputación de extremidades (Ahmad S. 2012).

3 Nefropatía diabética.

La nefropatía diabética es la principal causa de enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) y la causa más frecuente de trasplante renal en el mundo desarrollado. La presencia y aumento progresivo de la albúmina en la orina, junto con la presión arterial elevada son los biomarcadores glomerular de la nefropatía. En ausencia de una intervención adecuada, la condición persiste y conduce a la pérdida de proteína en la orina y una disminución en la función renal en la forma de la menor tasa de filtración glomerular (Ahmad S. 2012).

4 El pie diabético.

La principal causa de mortalidad en los enfermos diabéticos se debe al pie diabético, que se presenta en el 15-20% de estos enfermos. El pie diabético constituye un grave problema de salud pública, tanto por su alta frecuencia como

por los elevados costes sanitarios y sociales derivados de los continuos ingresos hospitalarios y de la incapacidad laboral que ocasiona (García F. 2011).

En el Ecuador, el Ministerio de Salud brinda atención integral y sin previa cita a pacientes con úlcera de pie diabético, con el objetivo de prevenir y evitar la discapacidad por amputación de miembros inferiores. En 2012 se adquirieron 9 mil dosis del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Recombinante, por un costo superior a \$3 millones. Este fármaco biológico incide en la recuperación del tejido y se encuentra disponible en doce hospitales públicos del país. Con el uso de este medicamento se han beneficiado hasta el momento 515 pacientes (MSP 2014).

1.2 ALFA – AMILASA

La alfa amilasa es una enzima liberada por el órgano llamado páncreas, su función implica una reacción metabólica sobre los carbohidratos hidrolizando en moléculas complejas de almidón (amilasa y amilopectina), y a su vez en elementos un poco más simples como es maltosa, isomaltosa y glucosa (Rojo R. et al. 2007).

Su mecanismo de acción inicia a nivel de la boca, excepto en neonatos, pero es limitada debido al corto tiempo que permanece en la cavidad bucal, al pasar al estómago esta enzima se inactiva por el pH ácido gástrico. Por ello, la mayor cantidad de almidón alcanza el duodeno sin hidrolizar y por acción de la alfa-amilasa del páncreas inicia la casi total digestión de las molécula. La enzima alfa amilasa funciona como endoamilasa, que hidroliza los enlaces alfa (1-4) de las cadenas glucosídicas de la amilasa y la amilopectina que se sitúan alejados de los extremos y de los puntos de ramificación. Por su acción se liberan:

1. Maltosa y maltotriosa (representan el 70% de los hidratos de carbono intraluminales).
2. Residuos de más alto peso molecular: dextrinas límite (formadas por 5-10 unidades de glucosa, ramificadas si el sustrato es la amilopectina). La cantidad de glucosa libre que originan es muy escasa debido a que no actúan en los extremos (Serrano M. et al. 1998).

La inactivación de la función de la enzima alfa-amilasa es una estrategia coherente para el control de la DM 2, para impedir o retrasar la absorción de carbohidratos ingeridos. Consiguiendo efectos favorables como impedir el incremento postprandial de la glicemia y disminuir los efectos de la hiperglucemia. Un efecto desfavorable de la inhibición excesiva de la alfa-amilasa puede ser (diarrea posible, hinchazón, flatulencia y distensión abdominal) esto se debe a la fermentación anormal de los hidratos de carbono no digeridos, porque existe una flora normal de microorganismos en el colon. Los inhibidores naturales de la α -amilasa y α -glucosidasa derivados de plantas tienen actividad inhibidora contra la α -amilasa (Ojeda R. et al. 2008).

1.3 MEDICAMENTOS NATURALES COADYUVANTES EN EL TRATAMIENTO

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de la hiperglucemia tiene una larga historia folklórica. Cada cultura étnica tiene una relación propia y característica con su medio ambiente, de la cual surge el conocimiento empírico de los usos medicinales de las diversas especies vegetales propias. En este aspecto, sólo unas pocas especies han sido científicamente estudiadas y por lo tanto debidamente validadas. De esto se deduce que se requieren estudios farmacológicos más exhaustivos que permitan demostrar la efectividad de las plantas medicinales en el manejo de la diabetes mellitus, para brindar una explicación científica que justifique su uso empírico (Sara S. et al. 2007).

Estudios realizados en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en la búsqueda de encontrar principios activos provenientes de plantas que existen en el Ecuador, con la finalidad de demostrar que pueden de una u otra manera ayudar en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. Los resultados de las investigaciones realizadas han demostrado, de alguna forma que las plantas presentan un apoyo en la forma de vivir para mantener los niveles de glucosa normales en la sangre. Entre las plantas estudiadas tenemos:

1. Tuna (*Opuntia ficus-indica*).

Se ha demostrado la actividad hipoglicemia en conejo de un extracto acuoso del tallo y de las de las hojas cuando se administró por vía intragástrica. Se ha observado una acción antiviral del extracto acuoso de la planta sobre el fago T4 de *Escherichia coli* el cual causa la ruptura de las células (Carrasco N. 2012).

2. Fruto de Noni (*Morinda citrifolia*).

El fruto se usa para ayudar en el tratamiento de la diabetes, para problemas del corazón y presión alta, así como para tratar la tuberculosis, artritis y reumatismo, menstruación dolorosa, úlceras gástricas, infecciones e incluso depresiones (Carrillo P. 2012).

3. *Justicia chlorostachya* Leonard (Insulina).

La actividad hipoglicemiante de *Justicia chlorostachya* es muy alta comparada con estudios realizados con otro tipos de plantas. 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 (Pazmiño C. 2012).

1.4 *Oreocallis grandiflora*



FUENTE: UTUANA RESERVE, ECUADOR
FOTOGRAFIA No. 1.- (*Oreocallis grandiflora*)

El estudio de *Oreocallis grandiflora*, se ha considerado por las investigaciones realizadas en la Universidad Particular de Loja, y debido a sus propiedades farmacéuticas que ejerce empíricamente, se emplean la parte aérea de la planta, para tratar enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal, Diabetes, colesterol, problemas del ojo, gripe, dolencias hepáticas etc. La investigación científica realizada en la UTPL sobre la inhibición de la alfa amilasa in vitro, que se puede emplear como una estrategia para controlar los niveles glicémicos en pacientes con DM 2, puede proporcionar características inhibitorias y farmacológicas, favorezcan con el nivel de vida de los pacientes, es por esta razón que se ha planteado el estudio para evaluar la actividad hipoglucemiante de la planta *Oreocallis grandiflora* (Alejandro-Espinoza M et al. 2012).

1.4.1 TAXONOMÍA

TABLA No. 1 TAXONOMÍA DE *Oreocallis grandiflora*. MINISTERIO DEL AMBIENTE DE LA REPÚBLICA DEL PERÚ. NOVIEMBRE DEL 2013.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Proteales
Familia	Proteaceae
Género	<i>Oreocallis</i>
Especie	<i>Grandiflora</i>

FUENTE: MINISTERIO DEL AMBIENTE DE LA REPUBLICA DEL PERU

La especie tipo es: *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br.

1.4.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

Árboles y arbustos de hojas normalmente alternas, a veces opuestas o verticiladas. Estas son coriáceas, simples o compuestas, enteras, dentadas o lobuladas, sin estípulas. Inflorescencias axilares o terminales, frecuentemente en racimos, espigas o cabezuelas. Fruto en folículo, a veces leñoso. Las semillas son aladas en muchas ocasiones (Sarango, V., 2008).

Presenta una corteza agrietada de color grisáceo.

Sus hojas son alternas y simples, de forma elíptica cuyos nervios secundarios son de 10 a 15 pares, no presentan pelos en su parte superior ni inferior.

Las flores son en forma de racimos erguidos con una gran cantidad de flores. Son de tamaño grande, de un color grisáceo. Los pétalos están unidos formando un tubo largo

Los frutos tienen forma alargada y cilíndrica, contienen muchas semillas.

Para poder reconocer una especie de otra se fundamenta específicamente en los frutos y las flores que son característicos de cada especie. No presenta peligro de extinción esta especie. (Reynel C et al. 2010).

1.4.3 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

La especie vegetal se localiza en la zona andina del Perú y Ecuador, cuyo rango altitudinal se presenta entre 1.500 a 4.000 msnm (Reynel, C et al., 2010).

1.4.4 USOS

Las ramitas y rebrotes son flexibles y se usan en cestería, para confeccionar canastos.

Las semillas suelen ser consumidas en el sur de Ecuador y se le han descrito propiedades medicinales como antioxidantes.

Se emplea la parte aérea para tratar problemas como: Diabetes, fiebre, trastornos intestinales, afecciones renales etc (Reynel, C et al., 2010).

1.4.5 HISTORIA DE *Oreocallis grandiflora*

Su nombre proviene del vocablo griego oreos que significa (montaña), y kalli (bella) es decir es la bella de la montaña. Descrita en el año 1786 por el naturalista francés St Jean Baptiste Lamarck como *Embothrium grandiflora*. Luego el botánico holandés Herman Otto Sleumer cambia al género *Oreocallis*. De esta forma es como se la conoce hoy en día, solo existe dos especies *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br., y *Oreocallis mucronata* (Willd) Sleumer. Estas dos se localizan en el andino de Perú y Ecuador (Reynel, C et al., 2010).

1.5 REACTIVO BIOLÓGICO

1.5.1 RATA DE LABORATORIO



FUENTE: DAVID I. GUERRERO V.
FOTOGRAFIA No. 2.- Rata (*Rattus norvegicus*)

1.5.1.1 Introducción

Los experimentos científicos se realiza en animales (ratas) de laboratorio, esto se debe a que existe una gran semejanza en su fisiología con el ser humano y también a su manipulación que es fácil, y no son agresivos, si no se les tiene en un ambiente que ellos sienten peligro. Las ratas se han utilizado ya desde hace algún tiempo atrás, se han realizado pruebas para determinar la efectividad de medicamentos en estos animalitos y que luego se aplica en las personas (Quezada A. 1997).

El habitat de la rata del laboratorio debe presentar un tamaño acorde para que puedan vivir con tranquilidad, para que su reproducción y crianza sea optima, y al mismo tiempo que se pueda realizar procesos de experimentación. La temperatura y humedad deben ser acondicionados de acuerdo a las necesidades que requiera el experimento, tomando en cuenta que estos animales son sensibles a cualquier variación brusca de temperatura, lo que puede provocar afectación en las condiciones fisiológicas normales como: incremento en la actividad metabólica de los carbohidratos, que puede inducir a la pérdida de peso, también puede ocasionar una inducción periférica vascular.

Debe presentar una buena ventilación para mantener los niveles de oxígeno de acuerdo a las necesidades de la rata. La cantidad de luz presente debe ser de 12 horas en el día y

12 horas de oscuridad. La comida y el agua debe ser la correcta, libre de microorganismos, para que los animales de experimentación puedan ejercer sus funciones fisiológicas correctas. Debe ser proporcional al peso corporal del animal (Allmann-Isalin I. 2007).

1.5.1.2 Digestión y metabolismo

Los componentes principales en la dieta son los carbohidratos, y el que mayor representación tiene es el almidón. En la cavidad bucal se encuentra la alfa amilasa que degrada esta enzima y convierte en polímeros de glucosa. El pH óptimo para que la enzima ejerza sus funciones es de 6.7, de aquí que al llegar al estómago es degradado por los jugos gástricos. A nivel de intestino el páncreas segrega la enzima alfa amilasa y es por ello que inicia la hidrólisis de los carbohidratos. Las enzimas responsables de la digestión adicional de los derivados de almidón se encuentran en la parte exterior del intestino delgado, en la membrana de las microvellosidades del intestino delgado (Senoo, K., 2000).

1.5.1.3 Clasificación taxonómica *Rattus norvegicus*

TABLA No. 2 TAXONOMÍA DE *Rattus norvegicus*. HENDRICH, H. NOVIEMBRE DEL 2013.

Reino	Animalia
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Suborden	Myomorpha
Familia	Muridae
Subfamilia	Murinae
Género	<i>Rattus</i>
Especie	<i>norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)

FUENTE: HENDRICH, H

1.5.1.4 Vías de administración

- **Vía oral.-** Se sujeta directamente detrás los oídos este método ofrece un control suficiente de la cabeza del animal para permitir la introducción de un sistema flexible plástico o catéter de goma. Si se va a utilizar una cánula de metal, debe ser necesaria la inmovilización de la cabeza y parte superior del cuerpo así la lesión de la cavidad bucal y esofágica puede ser evitada. De esta manera los medicamentos a administrar, dependiendo del experimento, puede tener una mayor biodisponibilidad y los resultados serán acorde a lo que se desea estudiar (Kemp R. et al. 2013).

- **Vía intraperitoneal.-** La rata se coloca de lado ventral hacia arriba con la cabeza ligeramente menor que el cuerpo, lo que permite a las vísceras caer ligeramente hacia adelante hacia el diafragma y reducir el riesgo de que la aguja penetre el ciego o los intestinos. Es una buena práctica al dar una inyección intraperitoneal para insertar la aguja por vía subcutánea en el abdomen en un ángulo de 20 a 30° y luego levantar la jeringa a 45°, empujando suavemente a través de la capa muscular y en la cavidad peritoneal. Aunque es aceptable para llevar a cabo esta técnica sin ayuda de nadie para los animales jóvenes, el grado de moderación logrado puede no ser suficiente para la mayor y ratas más grandes. Es aconsejable con estos animales para utilizar un asistente para restringir el animal, eliminando así la riesgo de lesiones accidentales a la rata y / o un fuera de lugar inyección (Kemp R. et al. 2013).

- **Vía subcutánea.-** Es posible deslizar la aguja entre el pulgar y el dedo índice y en el espacio subcutáneo en el cuello del animal. Se debe tener cuidado para evitar perforar ya sea dígitos con la aguja, que puede ser encontrado a ser más seguro y más conveniente si el animal se coloca en una superficie horizontal y una suave presión ejercida desde arriba mientras se lleva a cabo la inyección (Kemp R. et al. 2013).

- **Vía Intramuscular.-** Aunque el tipo de sistema de retención será similar a los métodos descritos anteriormente, la administración por esta ruta se requieren dos personas, uno para contener el animal, mientras que la segunda persona se extiende la pata trasera de la rata con una mano para exponer la masa muscular y utiliza la otra mano para introducir la inyección (Kemp R. et al. 2013).

CAPÍTULO II

2.- PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en:

- Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Bioterio de la Facultad de Ciencias, de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Química Instrumental de la Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

2.2.1 Materia Prima Vegetal

El vegetal conocido como Cucharilla (*Oreocallis grandiflora*) fue recolectado en la provincia de Chimborazo, en la ciudad de Riobamba a 2750 msnm, cuya temperatura del lugar oscila entre 10 a 18 °C.

2.2.2 Material Biológico

Ratas (*Rattus norvegicus*) pertenecientes al Bioterio de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.3 Materiales de laboratorio

- Balón de aforo de 100 ml
- Balón de aforo de 25 ml
- Balón de aforo de 10 ml
- Balón esmerilado de 500ml
- Cánula
- Capsula de Porcelana
- Cofia
- Crisol
- Desecador
- Embudo simple
- Embudo Buchner
- Equipo de reflujo
- Equipo de disección
- Erlenmeyer de 250 ml
- Espátula
- Gradilla
- Guantes
- Jaulas para ratas
- Jeringuilla de 5ml
- Jeringuilla de insulina
- Mandil
- Mascarilla
- Mortero con pistilo
- Olla de acero inoxidable
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Pera de succión
- Picnómetro de 10 ml
- Pinzas para capsula
- Pinzas para cápsula
- Pipeta graduada de 1ml
- Pipeta graduada de 5ml

- Pizeta
- Probeta de 50ml
- Recipientes ámbar
- Reverbero
- Termómetro
- Trípode
- 20 tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vaso de precipitación de 1000ml
- Vaso de precipitación de 250ml
- Vidrio reloj

2.2.4 Equipos

- Balanza analítica (ADAM Y BOECO)
- Bomba al vacío
- Calculadora (CASIO SCIENTIFIC CALCULATOR fx-570 ES)
- Cámara fotográfica (NOKIA E-70)
- Cámara de CO₂
- Espectrofotómetro (PERKIN ELMER LAMDA EZ 201 Y HELYOS β)
- Estufa (MEMMERT)
- Glucómetro
- Medidor del perfil lipídico (ACCUTREND PLUS COBAS GCTL DE ROCHE)
- Mufla (BAUSH Y LOMB)
- Ph metro (HANNA INSTRUMENT Y HANNA WATERPROOF)
- Refractómetro (BAUSCH Y LOMB)
- Rotavapor (HEIDOLPHHEI- VAP ADVANTAGE)
- Sorbona (MEMMERT)
- UV

2.2.5 Reactivos

- Acarbosa
- Acetona
- Ácido clorhídrico al 10%
- Ácido fórmico
- Ácido nítrico.
- Acido pícrico
- Ácido sulfúrico
- Agua
- Alcohol amílico
- Alcohol potable al 96%
- Almidón de maíz.
- Anhídrido acético
- Cloroformo
- CO₂
- Etanol al 96 % y al 50%
- Éter etílico
- Etilo de acetato
- Extracto de *Oreocallis grandiflora*
- Férrico cloruro
- Magnesio Metálico
- Metanol
- Peróxido de hidrogeno
- Plata nitrato 0,1 M
- Potasio hidróxido
- Rutina
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo de Fehling
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Sudan III
- Reactivo de Wagner
- Sodio carbonato
- Sodio cloruro

- Solución de amonio de nitrato 10g/100mL.
- Tiras reactivas de glucosa
- Tiras reactivas para triglicéridos y colesterol
- Vaselina

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA

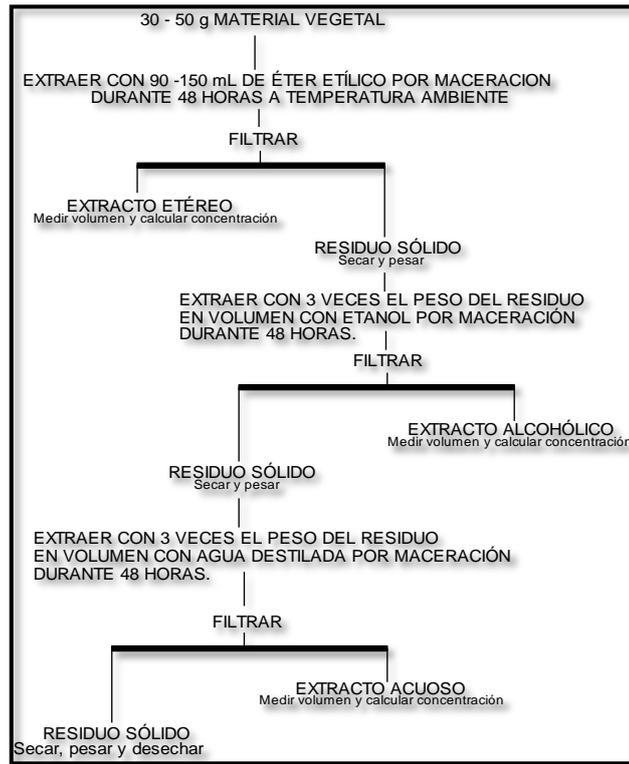
Valorar o evaluar las drogas vegetales, significa identificarlas y determinar su calidad o pureza. La calidad de una droga se traduce en su valor intrínseco o lo que es lo mismo la cantidad de principios activos presentes en ella.

La evaluación de las drogas se realiza por varios métodos como son: La percepción, la microscopia, el análisis físico-químico, y el análisis biológico. En este caso se iniciara en análisis de la droga cruda con los métodos Físico-Químicos (Miranda M. 2006).

Los métodos utilizados para el control de calidad de la droga cruda fueron los siguientes:

- Determinación de cenizas totales a través del método gravimétrico. (Normas Ramales para drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).
- Determinación de cenizas solubles en agua a través del método gravimétrico. (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).
- Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico a través del método gravimétrico. (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).
- Determinación del contenido de humedad a través del método gravimétrico. (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

2.3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO



FUENTE: MIRANDA, M. FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES
Fig No 1 ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Para la obtención del extracto se procedió de la siguiente manera.

Las hojas se trituró y pulverizó hasta obtener un tamaño de un cm, luego se pesó una cantidad de 50 g y se le sometió en un recipiente ámbar con un volumen que sea 3 veces superior de éter. Se dejó en maceración por 48 horas con una agitación esporádica. Al finalizar las 48 horas se procedió a filtrar y el filtrado se coloca en un envase ámbar teniendo así el extracto etéreo.

El filtrado sólido se somete a un solvente alcohólico al 96% de la misma manera que se realizó en el proceso anterior, se filtró y el filtrado líquido se colocó en un recipiente ámbar. Se procedió al control de calidad del extracto.

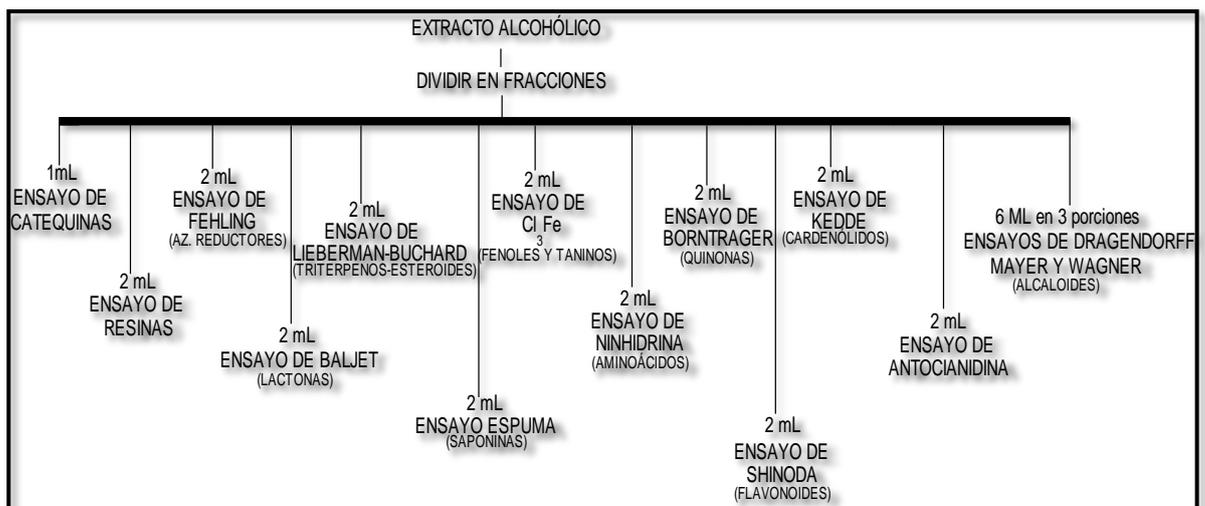
El filtrado sólido se introdujo en un envase ámbar con agua destilada y se procede de la misma manera que en los puntos anteriores.

La calidad de este extracto obtenido se determinó a través de las siguientes pruebas.

- Determinación del índice de refracción por refractómetro de Abbé (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).
- Determinación de densidad relativa por método gravimétrico (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).
- Determinación del pH por potenciometría. (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

2.3.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje se realizó mediante el proceso que se observa en el siguiente esquema.



FUENTE: MIRANDA, M. FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES (30)

Fig No 2.- TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

Al extracto acuoso se procede a realizar los análisis de la siguiente manera.



FUENTE: MIRANDA, M. FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES (30)

Fig No 3.- TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO

Compuestos grasos:- Se determinó por el ensayo de Sudan, este ensayo se procedió mediante la técnica que especifica las (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Alcaloides.- Para comprobar la existencia de estos compuestos se realizó los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner, mediante la técnica de (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Compuestos Lactónicos.- Para verificar si contiene compuestos lactónicos se procedió con el ensayo de Baljet, su procedimiento se encuentra en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Quinonas.- La determinación de estos compuestos se realizó por el ensayo de Borntrager, cuyo procedimiento se encuentra en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Triterpenos y Esteroides.- Los compuestos se reconocieron por el ensayo de Lieberman Buchard, esto esta especificado en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Catequinas.- Se realizó el ensayo de Catequinas, el proceso se localiza en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Resinas.- El reconocimiento de este tipo de compuestos se lo hizo mediante el ensayo de resinas, cuyo proceso se encuentra en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Azucares Reductores.- Éstos compuestos se pudieron reconocer mediante la técnica de ensayo de Fehling, la manera de realizar este ensayo se localiza en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

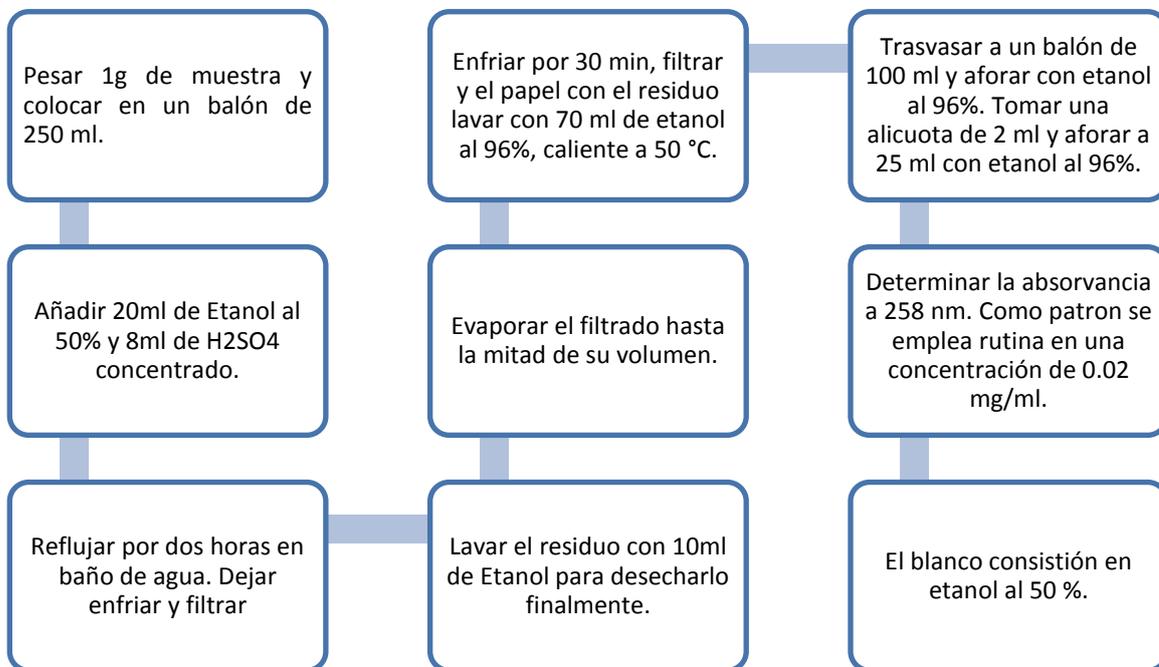
Saponinas.- La determinación de estos compuestos se conoce por el ensayo de espuma, cuyo procedimiento se encuentra en (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 199)

Compuestos fenólicos.- Para comprobar la existencia de estos compuestos se realizó el ensayo de cloruro férrico, mediante la técnica de (Normas Ramales. Drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Flavonoides.- Los compuestos se reconocen por los ensayos de Shinoda y Antocianidinas, esto está especificado en (Normas Ramales. De drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

2.3.4 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Procedimiento



La expresión empleada para el cálculo es la siguiente: (31)

$$X = \frac{Am_1}{Am_{st}} * \frac{1000 \text{ mg } Q}{1000 \text{ mL}} * \frac{0.8 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} * \frac{100 \text{ mL}}{1 \text{ g de planta}} * \frac{25 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}$$

Dónde:

X= Contenido de flavonoides totales expresados como rutina (%)

Am_1 = Absorbancia de la solución muestra (nm)

Am_{st} = Absorbancia de la sustancia referencia (nm)

2.3.4.1 Cuantificación Cromatografía del marcador químico de Flavonoides totales expresados como porcentaje de rutina.

Se Agregó un par de micro gotas del concentrado del extracto hidroalcohólico en una placa Cromatográfica de Sílica Gel 60 F254, con la ayuda de un capilar. Se introdujo la placa en la cuba Cromatográfica, hasta que el solvente recorra las $\frac{3}{4}$ partes de la placa.

Se retiró la placa y se dejó secar. Finalmente se procedió al revelado de la placa y se dejó secar, se sometió a calentamiento en la estufa por un periodo corto de tiempo y se midió los Rf.

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: Cloroformo, Acetona, Ac. Fórmico (75:16.5:8.5)

Revelador: Sulfato de Cerio

2.3.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE EN RATAS DE LABORATORIO

2.3.5.1 Protocolo de Diseño Experimental

- **Población:** 31 Ratas (*Rattus norvegicus*)
- **Definición de los Grupos**

TABLA No. 3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*,. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

CODIGO	GRUPO	TRATAMIENTO	NUMERO DE ANIMALES
A	Blanco	Sin tratamiento	5
B	Control Negativo	Sobrecarga de Almidón	5
C	Control Positivo	Sobrecarga de Almidón + Acarbosa	5
D	Dosis 1	Sobrecarga de Almidón + 0.2 ml de extracto	5
E	Dosis 2	Sobrecarga de Almidón + 0.4 ml de extracto	5
F	Dosis 3	Sobrecarga de Almidón + 0.6 ml de extracto	5
G	Daño Hepático	Hidrolisis celular de Hepatocitos por un Xenobiótico	1

2.3.5.2 Periodo de Ambientación

Se ambienta a todos los animales por grupos a las mismas condiciones ambientales y de alimentación de acuerdo al protocolo de investigación.

- Temperatura: 22 °C ±2
- Humedad relativa: 50% ± 10
- Periodo de fotoluminiscencia: 12 h de luz y 12 h de oscuridad
- Alimentación: 15g/día/rata; agua ad libitum

Los animales se ambientan al investigador y a la técnica que se va a realizar mediante manipulación y adaptación.

2.3.5.3 Inducción de la patología.

En un grupo se le administró una dosis de cloroformo para tener un daño a nivel hepático que a lo posterior nos ayudara a comparar el nivel de toxicidad con relación al extracto vegetal.

2.3.5.4 Ayuno.

El ayuno se realizara 12 h antes de iniciar con la administración para posteriormente medir los niveles de Glucosa presente en la sangre.

2.3.5.5 Periodo de investigación.

El periodo de investigación será por el lapso de 30 días.

2.3.5.6 Descripción del tratamiento.

El grupo A no se le administró ninguna sustancia solo una alimentación normal, al grupo B se le administró una solución de almidón disuelta en solución salina, al grupo C se le administró una solución de almidón disuelta en solución salina, más una solución de acarbosa 50mg/kg del peso de la Rata (Ashok T. et al. 2011), al grupo D se le

administró una solución de almidón disuelta en solución salina, más 0.2 mg del extracto, grupo E se le administró una solución de almidón disuelta en solución salina, más 0.4 mg del extracto, grupo F se le administró una solución de almidón disuelta en solución salina, más 0.8 mg del extracto, Grupo G se le administró una solución de cloroformo para provocar el daño hepático.

2.3.5.7 Solución para la hiperglucemia:

Los animales fueron alimentados con almidón soluble disuelto en solución salina normal a una dosis de 2 g/ kg peso corporal. A partir de entonces, la sangre se recogió en los intervalos de 30, 60, 90, y 120 minutos después de la alimentación (Ashok T. et al. 2011).

2.3.5.8 Métodos de medición de Glucosa en sangre.

Para medir los parámetros de glucosa se utilizó un glucómetro y también un medidor del perfil lipídico Colesterol y Triglicéridos (Accutrend Plus cobas GCTL de Roche).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DROGA CRUDA.

3.1.1 PREPARACIÓN DE LA DROGA CRUDA

La preparación de los extractos se realizó mediante la guía de Farmacognosia y Productos Naturales Normas Ramales. Drogas crudas y extractos y tinturas. (NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

Después de someter la droga cruda y su extracto hidroalcohólico a las pruebas de control calidad descritas en el Capítulo II, se obtuvieron los resultados expresados a continuación.

CUADRO No. 1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA Y PULVERIZADA DE *Oreocallis grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DE 2013.

Parámetro	Cucharilla (<i>Oreocallis grandiflora</i>)	Límites aceptados (Farmacopea Española 2002)
Contenido de humedad (%)	12.77 ± 0.15	14%
Contenido de cenizas totales (%)	2.58 ± 0.11	5%
Contenido de cenizas solubles en agua (%)	0.40±0.12	2%
Contenido de cenizas insolubles en Ácido Clorhídrico (%)	0.014±0.008	1%

Los valores obtenidos de humedad fueron de 12.77 por ciento con una variación entre muestras de ± 0.15 , la técnica nos da límites de 8 a 15 %, en este caso la planta se encontró entre estos límites.

La determinación del contenido de humedad de drogas crudas es de gran importancia, ya que la cantidad de agua que presenta se puede relacionar con las condiciones ambientales en las que se encontraba mientras crecía, para suponer si sus metabolitos primarios como secundarios se encuentran en óptimas condiciones. En base al contenido de humedad también se puede conocer la actividad del agua y esto determina la vida útil del producto final, porque favorece las reacciones enzimáticas en un medio rico en agua, afectando la inocuidad del producto (Paz J. 2009).

El contenido de cenizas totales fue de 2.58 % con una variación entre muestras de ± 0.11 . El porcentaje de cenizas solubles en agua fue de 0.40 % con una variación de ± 0.08 entre muestras. En la determinación de cenizas insolubles en HCl se obtuvieron valores de 0.014 % con una variación de ± 0.008 entre muestras. Según la Farmacopea Española (2002), el valor límite para cenizas totales en droga cruda fue del 12%. Es importante la determinación de cenizas porque este parámetro permite suponer la presencia de metales pesados que contaminaron la materia vegetal, mientras se encontraba en su hábitat previo a su recolección.

Al determinarse valores bajos, de cenizas solubles, es un indicativo de que no presenta cantidades considerables de sales minerales (Barretto M. 2006), las cantidades bajas de cenizas insolubles nos ayuda a conocer la baja presencia de sílica, que es proveniente de la presencia de arena o de tierra que se encuentra presente en la parte aérea de las plantas (Sharapin N. 2000).

3.1.2 DETERMINACIÓN DEL CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

CUADRO No. 2 DETERMINACIÓN ORGANOLÉPTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oreocallis grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013

Parámetro	Resultado
Aspecto	Transparente
Color	Verdoso
Olor	Alcohólico, aromático.
Sabor	Amargo, ligeramente astringente.

En el CUADRO No. 2, se reporta los parámetros para la determinación organoléptica del extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora*. Los parámetros van acorde con las características de la planta. El color verdoso se debe a que el extracto procede de la parte aérea (hojas) del vegetal, específicamente a la clorofila (Paz J. 2009). Presentó un aspecto transparente sin presencia de ninguna partícula visible. Se percibió un olor alcohólico debido al etanol utilizado como solvente. El sabor del extracto es amargo y ligeramente astringente, debido al alcohol.

3.1.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

CUADRO No. 3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO De *Oreocallis grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

Parámetro	Resultado
Índice de Refracción	1.3655
pH	5.76 ± 0.05
Densidad Relativa	0.82 ± 0.02

El índice de refracción del extracto de *Oreocallis grandiflora*, fue de 1.365 (CUADRO No. 3) que comparado con el índice de refracción del agua que es 1, nos da a entender que existen componentes solubles presentes en el extracto hidroalcohólico.

El valor del pH presente en el extracto de *Oreocallis grandiflora*, fue de 5.76 con una variación de ± 0.05 entre muestras, comparado con el alcohol utilizado para la maceración que se encuentra a una concentración del 96%, y que tiene un pH de 6.95. Esto indica que el extracto tiende a ser ligeramente ácido.

La densidad relativa del extracto de *Oreocallis grandiflora*, fue de 0.82 con una variación de ± 0.02 entre muestras, comparado con el solvente utilizado (alcohol etílico al 96%) que presenta un valor de 0.70. Esto nos indica que el extracto presenta compuestos que provienen de la droga cruda.

3.1.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

CUADRO No. 4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO De *Oreocallis grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.

Tipo de ensayo	Compuesto a identificar	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Baljet	Cumarinas	++
Lieberman-buchard	Triterpenos y Esteroides	++ (verde)
Catequinas	Compuesto Catequinólicos	+
Resinas	Resinas	++
Espuma	Saponinas	++
Cl ₃ Fe	Fenólicos y Taninos	+++ (verde intenso)
Borntrager	Quinonas	++
Shinoda	Flavonoides	++ (amarillo)
Antocianidina	Flavonoides	++ (rojo)
Fehling	Azucars Reductores	+++

Ausencia: (-). Evidencia Baja: (+). Evidencia Media: (++) . Evidencia Alta: (+++).

De acuerdo a los resultados de la determinación fitoquímica (CUADRO No. 4), en el extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora*, se evidenció la presencia en baja cantidad de catequinas; también una mediana cantidad de: resinas, saponinas, de cumarinas, quinonas, flavonoides tipo antocianidinas, triterpenos y esteroides; y una cantidad alta de: compuestos fenólicos y taninos, azúcares reductores. No se evidenció la presencia de alcaloides según los ensayos realizados de Dragendorff, Mayer y Wagner. Los estudios que se realizaron con una planta *Grevillea robusta*, de la familia Proteaceae, demostraron que presentan flavonoides considerables y eso concuerda con los resultados presentes en el análisis (Sukumar D. 2014).

3.1.5 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO PORCENTAJE DE RUTINA

CUADRO No. 5 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR ESPECTROFOTOMETRÍA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO Y ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.

MUESTRA ANALIZADA	ABSORBANCIA	PORCENTAJE
Estándar de Rutina	0.308	0.519
Extracto etanólico <i>Oreocallis grandiflora</i>	0.637	1.14
Extracto acuoso de <i>Oreocallis grandiflora</i>	0.553	0.99

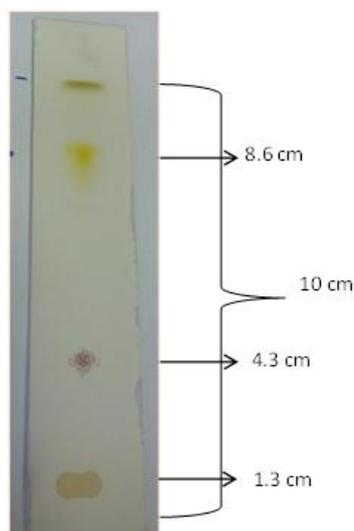
3.1.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL MARCADOR QUIMICO EXPRESADO COMO PORCENTAJE DE QUERCETINA.

CUADRO No. 6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS FLAVONOIDES PRESENTES MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LOS R_f EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oreocallis grandiflora*, EXPRESADO COMO PORCENTAJE DE QUERCETINA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.

Banda	Mancha	R _f	Compuesto relacionado
1	Café	0.13	Flavonoide Glicosilado
2	Violeta	0.43	Quercetina
3	Amarillo	0.86	Hidroxiflavona

FOTOGRAFÍA No. 3. PLACA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Oreocallis grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.

**TLC –EXTRACTO ETANÓLICO DE *Oreocallis grandiflora*, ECUADOR
(CHIMBORAZO)**



Fase Estacionaria: Sílica gel 60 HF₂₅₄

Muestra: Extracto etanólico de *Oreocallis grandiflora*

Sistema de solventes: Cloroformo – Acetona – Ácido fórmico (75:16,5:8,5 v/v)

Revelador: Sulfato de Cerio

En el (CUADRO No. 6) mostró el número de bandas identificadas en el TLC, permitiendo identificar en base a los Rf los probables compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico. A una distancia de 1.3 cm de recorrido del solvente, apareció la primera banda (color café pardo), relacionada con flavonoides glicosilados. A una altura de 4.3 cm se logró identificar una segunda banda (color violeta), cuyo Rf es de 0.43, asociada a quercetina. A la altura de 8.6 cm apareció una tercera banda (color amarillo), con un Rf de 0.86, asociada a hidroxiflavona (Wagner, H. 1996).

En la FOTOGRAFÍA No 3, permite reconocer cada uno de los componentes existentes en el extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora*, a través de la Cromatografía de Capa Fina (TLC), cuyo sistema de solventes fue Cloroformo – Acetona – Ácido Fórmico - (75:16,5:8,5) y un revelador de Sulfato de Cerio.

3.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

3.2.1 PROTOCOLO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN

El Protocolo del Diseño Experimental según la TABLA No.3, se realizó fundamentado en el esquema que presenta el Bioterio de la Facultad de Ciencias, de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, basado en el modelo utilizado en la investigación “Influence of antioxidant rich fresh vegetable juices on starch induced postprandial hyperglycemia in rats” (Ashok T et al. 2011).

Para la investigación se formaron grupos de 5 animales. Los sujetos experimentales fueron *Rattus norvegicus*, de la cepa Wistar. Todos los animales tenían una edad aproximada de 4 a 5 meses de edad, todos fueron machos, su peso promedio fue de 235 g \pm 20.

3.2.2 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

CUADRO No. 7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DIA 1. ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) DE VALORES DE GLICEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Grupo	AUC 30'	AUC 60'	AUC 90'	AUC 120'	AUC 0 - 120' (total)
Blanco	2730	2760	2730	2655	10875
Control negativo	2940	3180	3195	3000	12315
Control positivo	2880	3030	2880	2735	11525
Dosis baja	3000	3270	3150	2885	12305
Dosis media	2985	3135	3030	2775	11925
Dosis dosis alta	2895	3030	2925	2670	11520

Control negativo: Administración de almidón.

Control positivo: Administración de Acarbosa 50mg.

Concentración baja: Administración de 0.02 mg del extracto acuoso.

Concentración media: Administración de 0.04 mg del extracto acuoso.

Concentración alta: Administración de 0.08 mg del extracto acuoso.

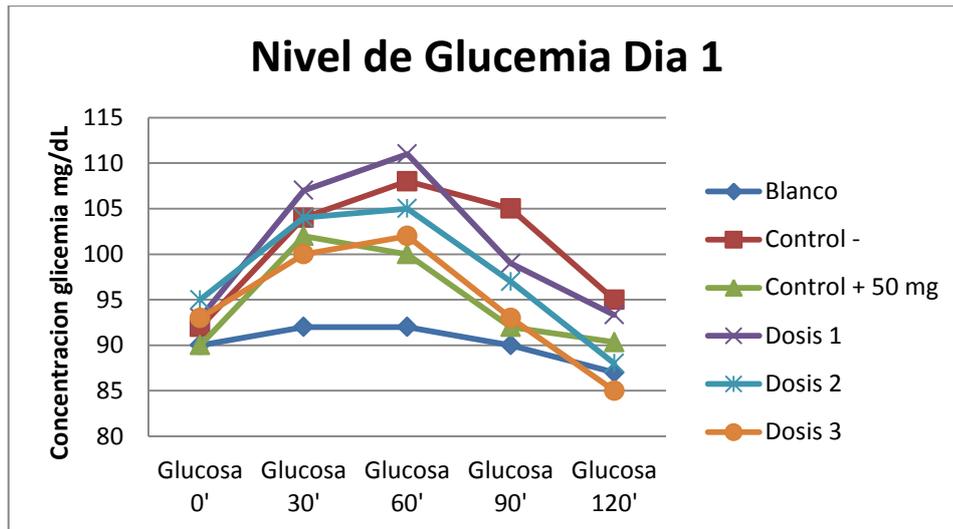


GRÁFICO No. 1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 1. VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

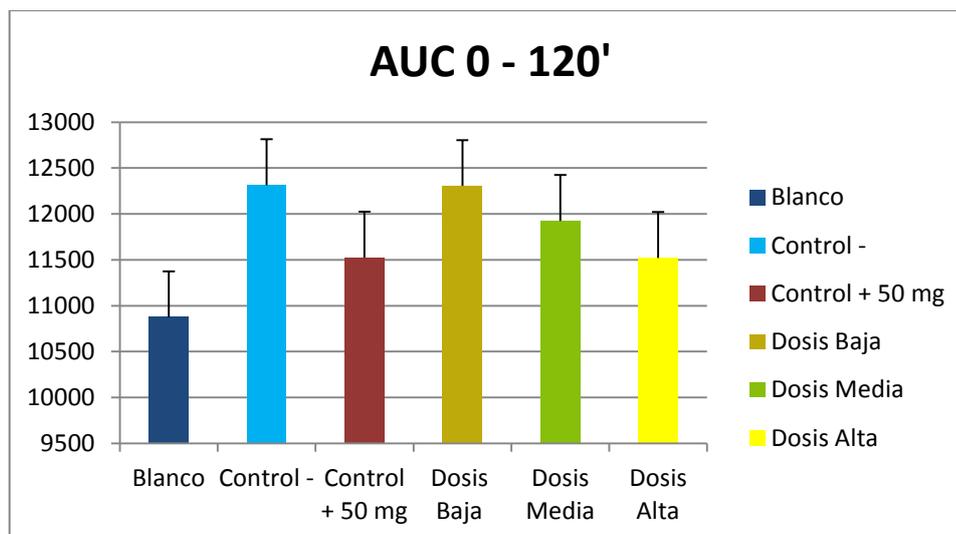


GRÁFICO No. 2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 1. ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) DE 0 - 120' DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Los animales de experimentación fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previas al tratamiento. El grupo blanco presentó valores de glucemia que se mantuvieron normales mientras duró el tiempo de experimentación, así también presentaron una Área Bajo la Curva (AUC) total menor en comparación al resto de grupos. El grupo control negativo presentó niveles de glucemia y Área Bajo la Curva (AUC) total elevados, lo que nos indica que el almidón es metabolizado en una cantidad considerable y nos sirve como referencia para comparar los resultados con los extractos de ensayo. El grupo de animales de control positivo presentó valores de glucemia y Área Bajo la Curva (AUC) total relativamente bajos en comparación con el grupo control negativo, debido a la administración de almidón, sirviendo este medicamento como un marcador para verificar si las concentraciones de la planta provocaron un efecto similar al que se espera de la sustancia comercial. El grupo de animales al que se administró una concentración baja del extracto, presentó valores de glucemia y AUC total elevados, similares al Control negativo, con valores menores pero sin diferencia notoria. El grupo de animales al que se administró una concentración media del extracto, presentó valores de AUC total que se encuentran entre los 11500 y 12000 mg.min/dL, dando a notar que el almidón administrado no se metabolizó en una cantidad notable como ocurrió con el grupo Control negativo y el grupo con concentración baja. El grupo de animales al que se administró una dosis alta del extracto, presentó niveles de glucemia relativamente bajos y un AUC total que se encuentra alrededor de 11500 mg.min/dL, similares al grupo de control positivo. Esto permitió interpretar que a una dosis alta del extracto ejerce funciones semejantes al medicamento utilizado.

CUADRO No. 8

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 5. ÁREA BAJO LA CURVA DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Grupo	AUC 30'	AUC 60'	AUC 90'	AUC 120'	AUC 0 - 120'
Blanco	2715	2760	2730	2655	10860
Control neg.	3060	3315	3330	3210	12915
Control posit.	2648	2813	2745	2605	10810
Dosis baja	2970	3255	3210	3030	12465
Dosis media	2925	3120	3090	2850	11985
Dosis alta	2790	2925	2880	2700	11295

Control negativo: Administración de almidón.

Control positivo: Administración de Acarbosa 50mg.

Concentración baja: Administración de 0.02 mg del extracto acuoso.

Concentración media: Administración de 0.04 mg del extracto acuoso.

Concentración alta: Administración de 0.08 mg del extracto acuoso.

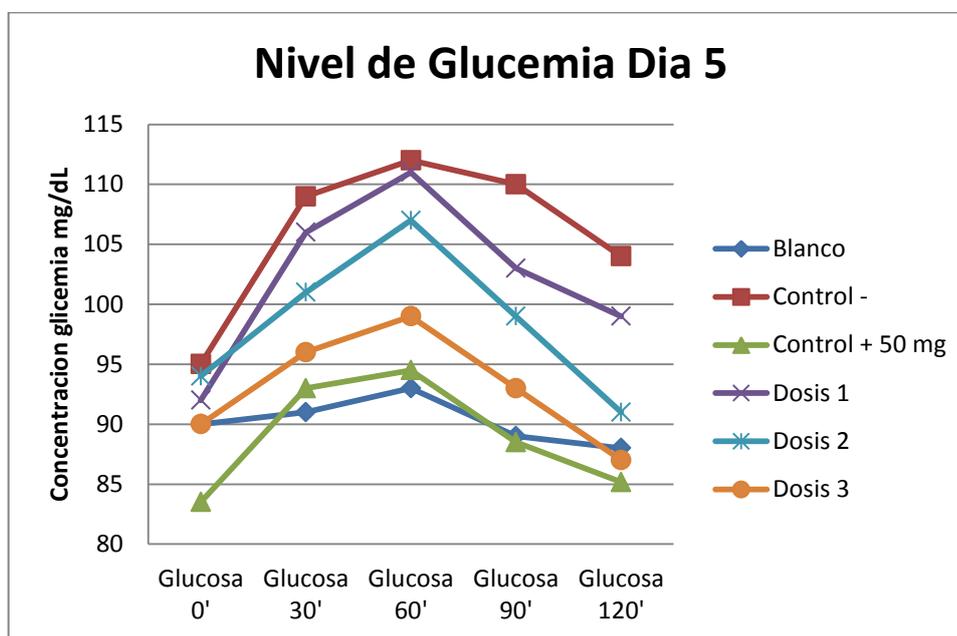


GRÁFICO No. 3

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDON EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 5. VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

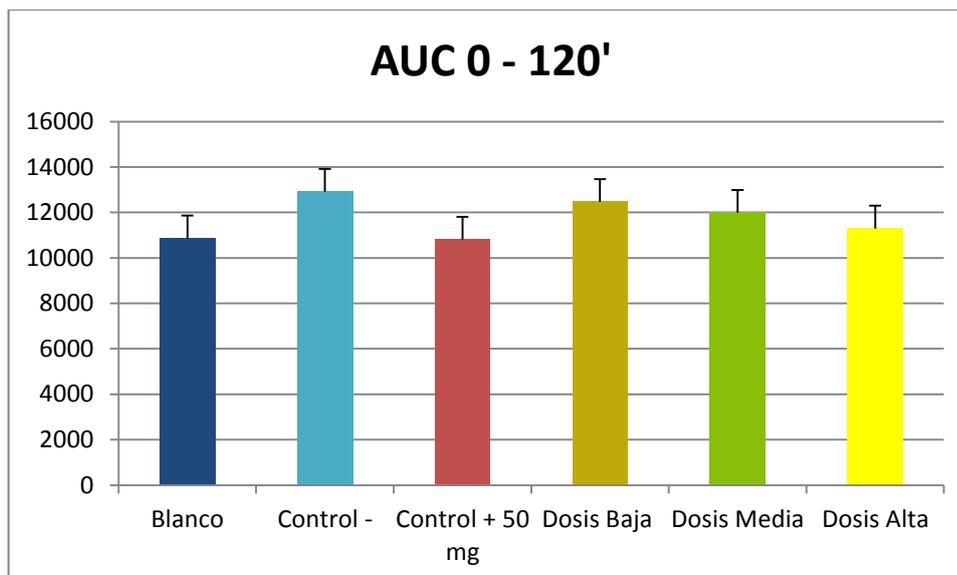


GRÁFICO No. 4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 5. ÁREA BAJO LA CURVA DE 0 - 120' DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

En comparación con los Gráficos del tratamiento del día 1, se pudo notar que en el día 5, según el (Gráfico de No. 3), los valores del grupo Blanco no presentan diferencias apreciables. El grupo control negativo presentó niveles un poco mayores al día 1. Después de las dos horas, su disminución no fue de forma drástica como lo fue en el día 1, sino de forma paulatina, esto puede ser debido a que como se le administró todos los días una sobrecarga de almidón, el organismo almacenó la glucosa en forma de glucógeno en los tejidos y músculos, y al momento de su eliminación toma parte de ese glucógeno. (Patiño R. et al. 2006). En el grupo de animales control positivo, se observó una disminución considerable de los niveles de AUC, llegando a mantenerse a un nivel similar al grupo de animales Blanco. En los grupos de animales que se les administró una dosis baja, dosis media y dosis alta, hubo una disminución de los niveles de AUC, pero no de forma considerable, que pudo ser debido al tiempo de experimentación que era corto hasta ese momento.

CUADRO No. 9

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 15. ÁREA BAJO LA CURVA DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Grupo	AUC 30'	AUC 60'	AUC 90'	AUC 120'	AUC 0 - 120'
Blanco	2865	2940	2880	2730	11415
Control neg	3255	3465	3495	3420	13635
Control posit.	2445	2625	2580	2445	10095
Dosis baja	2955	3255	3285	3120	12615
Dosis media	2775	3045	3045	2880	11745
Dosis alta	2625	2835	2835	2685	10980

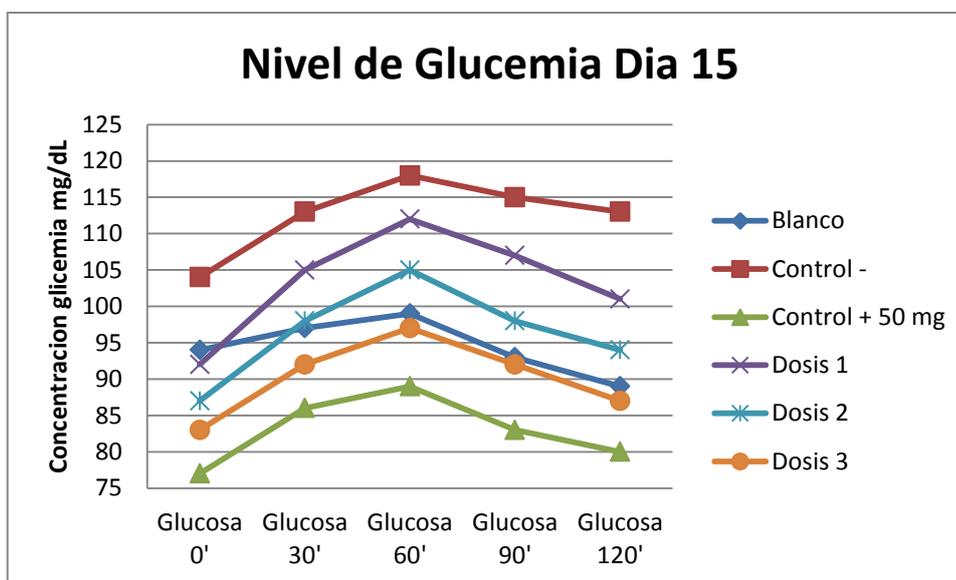


GRÁFICO No. 5

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 15. VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

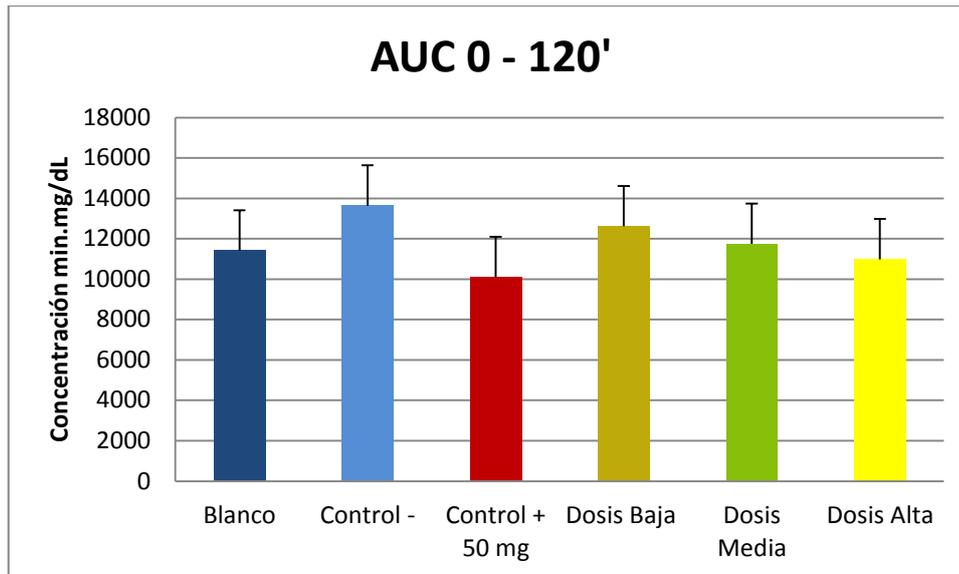


GRÁFICO No. 6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 15. ÁREA BAJO LA CURVA DE 0 - 120' DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Los valores del Área Bajo la Curva (AUC) en el grupo Blanco se mantienen casi constantes, se elevan progresivamente debido a que su alimentación es buena. En lo que respecta a los tratamientos de los animales de los grupos que se les administraron las dosis baja, dosis media y dosis alta, se observa un efecto sobre la absorción de la glucosa formada a partir del metabolismo del almidón que podría indicar una inhibición del mismo, dependiendo de las concentraciones administradas del extracto de la planta. Esto no permite que exista una elevación en los valores de Área Bajo la Curva (AUC) por lo que se ve una linealidad menos variable que en los gráficos anteriores.

CUADRO No. 10

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 30. ÁREA BAJO LA CURVA DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Grupo	AUC 30'	AUC 60'	AUC 90'	AUC 120'	AUC 0 - 120'
Blanco	2970	2955	2865	2760	11550
Control neg.	3435	3585	3600	3540	14160
Control posit.	2265	2430	2415	2310	9420
Dosis baja	2790	3120	3195	2985	12090
Dosis media	2535	2805	2850	2670	10860
Dosis alta	2325	2475	2550	2460	9810

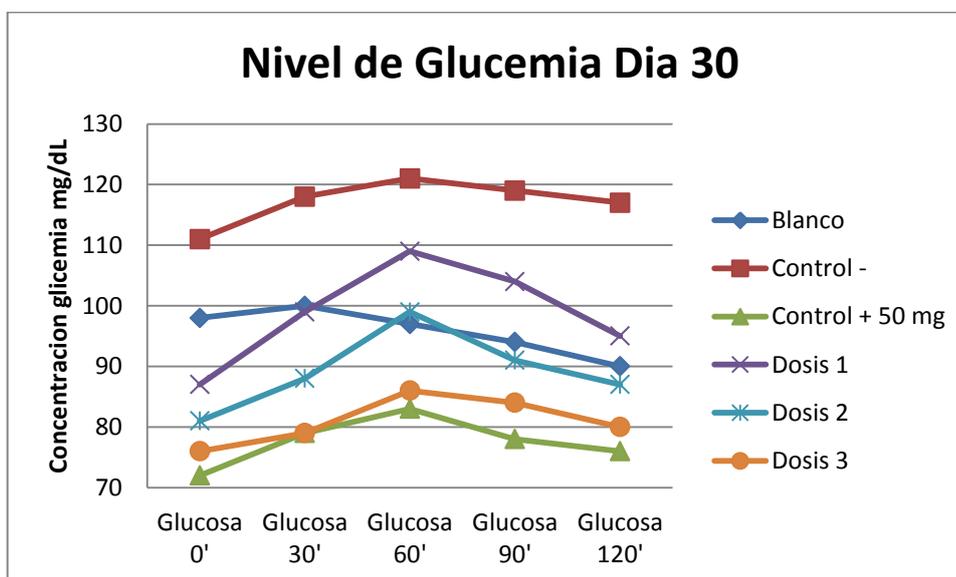


GRÁFICO No. 7

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 30. VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

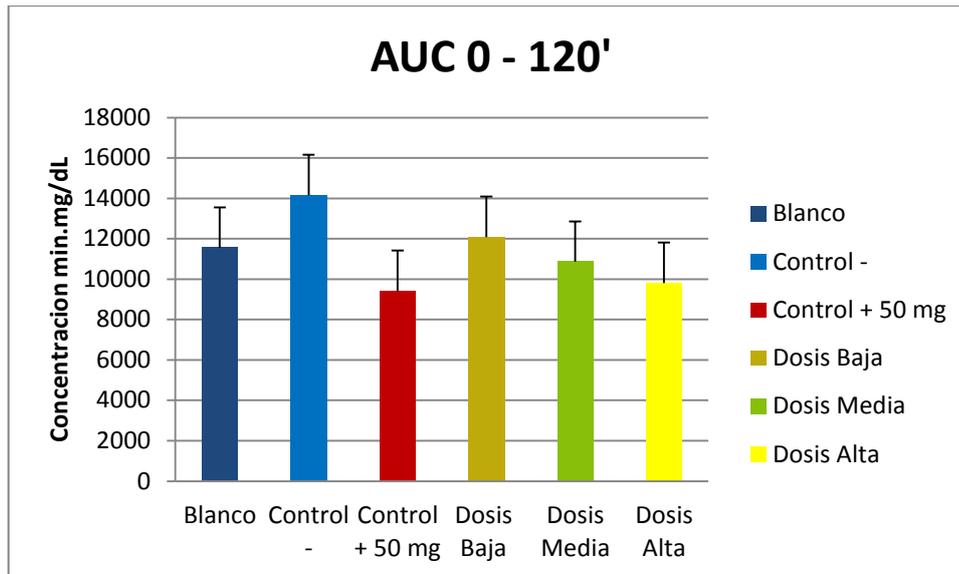


GRÁFICO No. 8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). DÍA 30. ÁREA BAJO LA CURVA DE 0 - 120' DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

En referencia a las concentraciones de extracto administradas, se puede observar que a esta instancia incluso el grupo de animales a concentración baja ejerce un efecto considerable para evitar que se eleven los niveles de Área Bajo la Curva (AUC). Aquí también se pudo observar que el grupo de animales de dosis alta presenta una similitud en su efecto con el grupo de animales de control positivo.

3.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

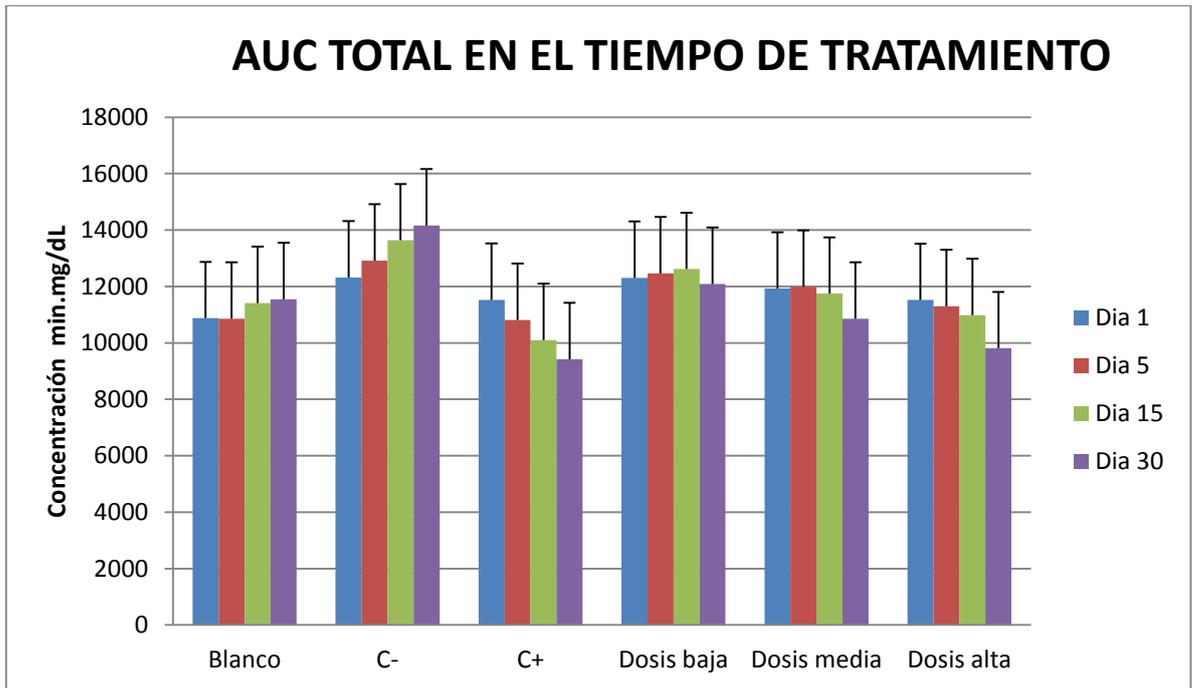


GRÁFICO No. 9

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). ÁREA BAJO LA CURVA TOTAL DE VALORES DE GLUCEMIA EXPRESADOS EN mg.min/dL. DURANTE TODO EL TIEMPO DE EXPERIMENTACIÓN. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

CUADRO No. 11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE ANOVA PARA DATOS AGRUPADOS, COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS Y EL TIEMPO DE DURACIÓN DEL TRATAMIENTO, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

	Blanco	Control -	Control + 50 mg	Dosis Baja	Dosis Media	Dosis Alta
Día 1	10875	12315	11525	12305	11925	11520
Día 5	10860	12915	10810	12465	11985	11295
Día 15	11415	13635	10095	12615	11745	10980
Día 30	11550	14160	9420	12090	10860	9810
	Blanco	Control -	Control + 50 mg	Dosis Baja	Dosis Media	Dosis Alta
Promedio	11175	13256,25	10462,5	12368,75	11628,75	10901,25
desviacion	359,3744565	808,8301738	907,6572407	224,8471703	522,5478447	760,4644962

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Días	806704,1667	3	268901,3889	0,60016863	0,62477512	3,287382105	
Tratamientos	21166295,83	5	4233259,167	9,44833117	0,000315087	2,901294536	
Error	6720645,833	15	448043,0556				
Total	28693645,83	23					

El CUADRO No. 11, permitió conocer si existe diferencia entre los tratamientos utilizados en el experimento y también conocer si existe desemejanza entre los días en el que se desarrolló la investigación. Es así que utilizando el Test Estadístico ANOVA, para datos Agrupados a un nivel de significancia del 95 %, el valor de F fue 0.60016, siendo mucho menor que el valor crítico para F que es 3.2873, dando a entender que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los días en los que se desarrolló la investigación. Esto demuestra que no existe ni habituación ni sensibilización en los organismos de los sujetos experimentales hacia el efecto farmacológico de los extractos. Es decir se puede utilizar la misma dosis por largos periodos de tiempo para obtener similares resultados.

Enfocándonos en los tratamientos resultó que hay un valor de F de 9.4483, que en comparación con el valor crítico para F que es 2.901294, resulta ser mayor, lo que nos da a entender que existió una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos

en la experimentación; por lo que se procedió a realizar un test de Tuckey HSD para conocer los grupos que son diferentes.

CUADRO No. 12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE TUKEY HSD, PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES, ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS Y EL TIEMPO DE DURACIÓN DEL TRATAMIENTO, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			
Número de Casos:		30	
Método: Tukey HSD al 95.00%			

	N	Media	Grupos Homogéneos

C+	5	10462.5000	X
Alto	5	10901.2500	X
Blanco	5	11175.0000	X X
Medio	5	11628.7500	X X
Bajo	5	12368.7500	X X
C-	5	13256.2500	X

Contraste	Diferencia	+/- Límite	

Blanco VS C-	*-2081.2500	*1264.6029	
Blanco VS C+	712.5000	1264.6029	
Blanco VS Bajo	-1193.7500	1264.6029	
Blanco VS Medio	-453.7500	1264.6029	
Blanco VS Alto	273.7500	1264.6029	
C- VS C+	*2793.7500	*1264.6029	
C- VS Bajo	887.5000	1264.6029	
C- VS Medio	*1627.5000	*1264.6029	
C- VS Alto	*2355.0000	*1264.6029	
C+ VS Bajo	*-1906.2500	*1264.6029	
C+ VS Medio	-1166.2500	1264.6029	
C+ VS Alto	-438.7500	1264.6029	
Bajo VS Medio	740.0000	1264.6029	
Bajo VS Alto	*1467.5000	*1264.6029	
Medio VS Alto	727.5000	1264.6029	

*Diferencia estadísticamente significativa

Después de realizar el Análisis Estadístico de ANOVA, donde permitió conocer que existe diferencia entre los tratamientos utilizados en la experimentación, se procedió a realizar un Análisis Estadístico de TUKEY HSD al 95 %, para conocer entre qué grupos existe diferencia estadísticamente significativa.

La administración de la concentración baja no produjo una actividad significativa para inhibir la absorción de glucosa a partir de almidón en comparación con el grupo control

negativo, es decir, la concentración administrada a este grupo no ha sido suficiente para que exista una actividad farmacológica considerable. Esto se confirma al observar que existió diferencia entre el grupo de concentración baja con los grupos de control positivo y de concentración alta.

La administración de la concentración media si presentó un efecto sobre la absorción de la glucosa a partir de almidón diferente al observado en el grupo control negativo, es decir ya existió una actividad farmacológica que se empieza a apreciar. En comparación con el grupo control positivo se pudo observar que los resultados no son significativamente diferentes lo que indicó que esta concentración ejercería una actividad farmacológica bastante similar a la concentración administrada del medicamento comercial.

La administración de la concentración alta presentó una actividad farmacológica similar a la concentración media y al medicamento comercial del grupo control positivo y es muy diferente al grupo negativo y bajo, indicando que si ejerce una actividad en el metabolismo del almidón, que es dosis dependiente.

Los estudios realizados en la Universidad de Loja (Alejandro-Espinosa M et al. 2012), sobre la actividad hipoglicemiante de *Oreocallis grandiflora* por inhibición de alfa amilasa in vitro, demuestran que existe una relación dosis dependiente, es decir va en correlación de la concentración del extracto para conocer la actividad de inhibición de la enzima alfa amilasa. En base a este fundamento se puede interrelacionar los resultados obtenidos en el experimento y suponer que el metabolismo, in vivo, del almidón es interrumpido en cierta manera, por la inhibición de la enzima alfa amilasa.

CUADRO No. 13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). VALORES DE TRIGLICÉRIDOS EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Grupo	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30
Blanco	97	100	110	121
Control neg.	93	103	117	134
Control posit.	115	104	93	89
Dosis baja	93	100	103	121
Dosis media	98	102	106	125
Dosis alta	100	102	105	121

Control negativo: Administración de almidón.

Control positivo: Administración de Acarbosa 50mg.

Concentración baja: Administración de 0.02 mg del extracto acuoso.

Concentración media: Administración de 0.04 mg del extracto acuoso.

Concentración alta: Administración de 0.08 mg del extracto acuoso.

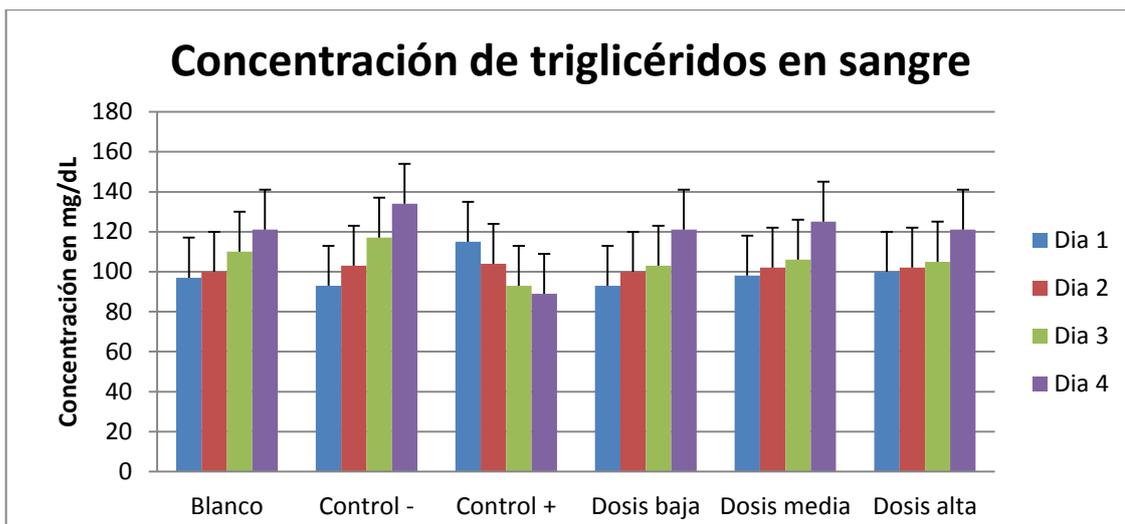


GRÁFICO No. 10 COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS Y TIEMPO DE DURACIÓN DEL TRATAMIENTO, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

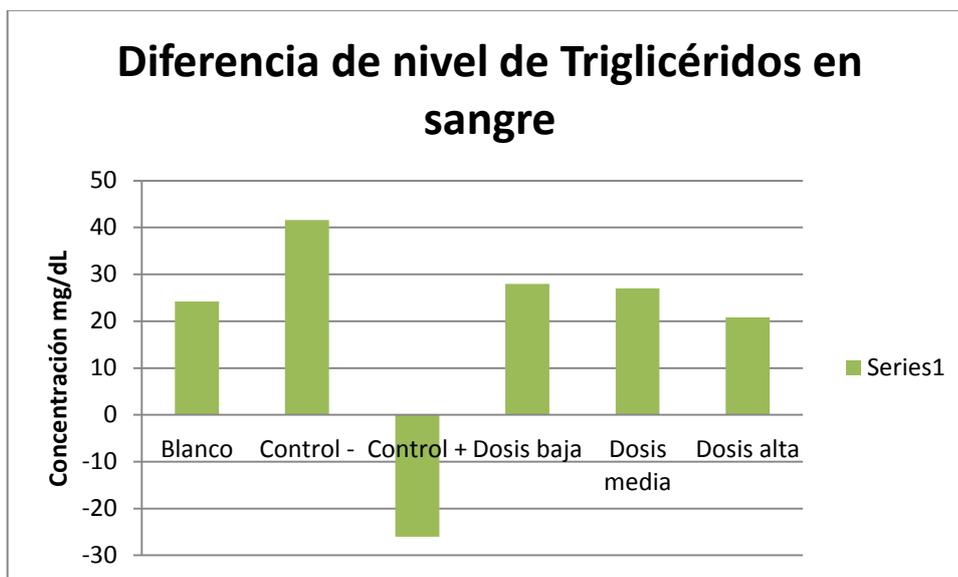


GRÁFICO No. 11 COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. DIFERENCIA DE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS ENTRE EL DÍA 1 Y DÍA 30. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

CUADRO No. 14

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE ANOVA PARA DATOS AGRUPADOS, COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

12/02/2014 17:28					
Anova Un Factor					
Número de Casos:	30				
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	13553.0667	5	2710.6133	273.0638	0.0002E-16
Dentro Grupos	238.2400	24	9.9267		
Total (corr.)	13791.3067	29			

El CUADRO No. 14, permitió conocer si los tratamientos utilizados difieren significativamente en los niveles de triglicéridos de cada animal de experimentación. Es así que utilizando el Test Estadístico ANOVA, para datos Agrupados a un nivel de significancia del 95 %, el valor de p fue 0.6382, siendo menor que 5%, lo que expresa que si existe diferencia estadísticamente entre tratamientos.

CUADRO No. 15

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE TUKEY HSD, PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES, COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. DIFERENCIA DE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS ENTRE EL DÍA 1 Y DÍA 30. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

12/02/2014 17:31			
Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			
Número de Casos:		30	
Método: Tukey HSD al 95.00%			
	N	Media	Grupos Homogéneos
C+	5	-26.0000	X
Dosis Alta	5	20.8000	X
Blanco	5	24.2000	XX
Dosis media	5	27.0000	X
Dosis baja	5	28.0000	X
C-	5	41.6000	X
Contraste	Diferencia		+/- Limite
Blanco VS C-	*-17.4000		*6.1613
Blanco VS C+	*50.2000		*6.1613
Blanco VS Dosis baja	-3.8000		6.1613
Blanco VS Dosis media	-2.8000		6.1613
Blanco VS Dosis Alta	3.4000		6.1613
C- VS C+	*67.6000		*6.1613
C- VS Dosis baja	*13.6000		*6.1613
C- VS Dosis media	*14.6000		*6.1613
C- VS Dosis Alta	*20.8000		*6.1613
C+ VS Dosis baja	*-54.0000		*6.1613
C+ VS Dosis media	*-53.0000		*6.1613
C+ VS Dosis Alta	*-46.8000		*6.1613
Dosis baja VS Dosis media	1.0000		6.1613
Dosis baja VS Dosis Alta	*7.2000		*6.1613
Dosis media VS Dosis Alta	*6.2000		*6.1613

*Diferencia estadísticamente significativa

En el CUADRO No. 15, permitió identificar qué tipos de grupos presentan diferencia estadísticamente significativa mediante el test de Tukey HSD a un nivel de significancia del 95 %.

Debido a la administración de almidón va a haber un aumento de triglicéridos en sangre tal como se evidencia en el grupo control negativo. Se observó que la administración del extracto en sus tres dosis logra reducir este incremento. Sin embargo no presenta un efecto evidente en la disminución de triglicéridos como lo observado en el control positivo.

La inhibición del metabolismo del almidón que provocó el extracto no es suficiente como para controlar o evitar el aumento de triglicéridos en sangre de la forma en que se evidencia con el tratamiento de acarbosa.

CUADRO No. 16 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*, CON HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR ALMIDÓN EN RATAS (*Rattus norvegicus*). VALORES DE COLESTEROL EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Grupo	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30
Blanco	169	167	165	163
Control neg.	174	173	171	168
Control posit.	172	169	167	166
Dosis baja	175	173	169	157
Dosis media	171	169	165	160
Dosis alta	179	175	174	160

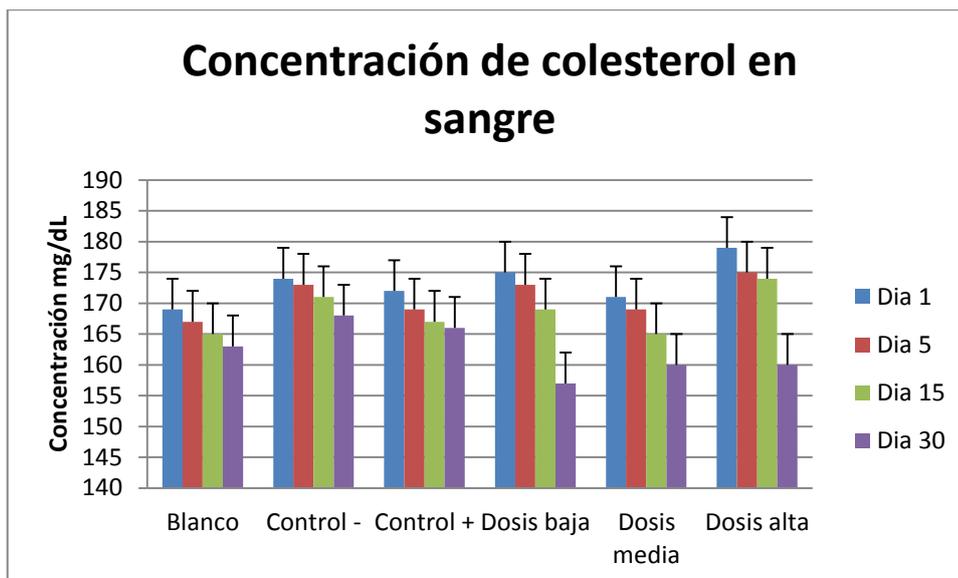


GRÁFICO No. 12 COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS Y TIEMPO DE DURACIÓN DEL TRATAMIENTO, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. NIVELES DE COLESTEROL EXPRESADOS EN mg/dL. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

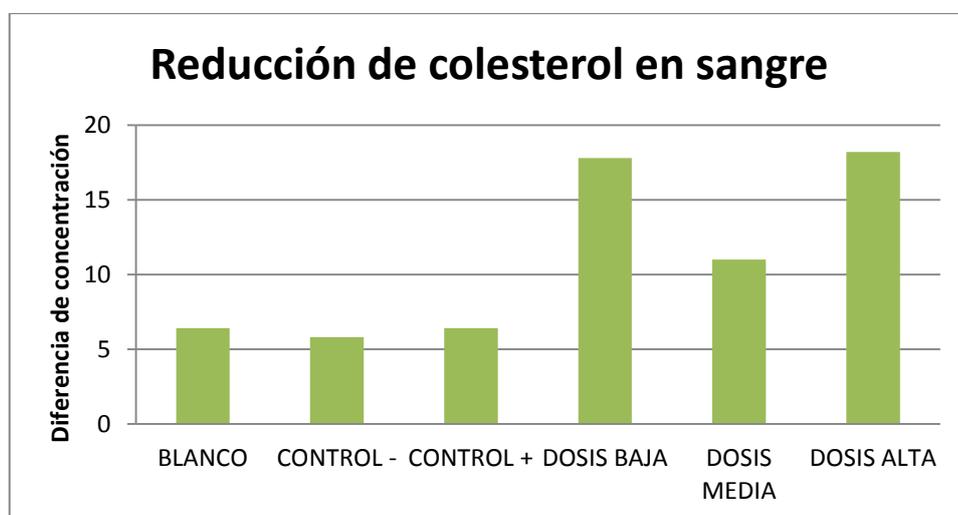


GRÁFICO No. 13 COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. DIFERENCIA DE LOS NIVELES DE COLESTEROL ENTRE EL DÍA 1 Y DA 30. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

CUADRO No. 17

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE ANOVA PARA DATOS AGRUPADOS, COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. DIFERENCIA DE LOS NIVELES DE COLESTEROL ENTRE EL DÍA 1 Y DÍA 30. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

12/02/2014 16:18					
Anova Un Factor					
Número de Casos:		30			
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	837.0667	5	167.4133	12.7796	0.0004E-2
Dentro Grupos	314.4000	24	13.1000		
Total (corr.)	1151.4667	29			

El CUADRO No. 17, permitió conocer si los tratamientos utilizados difieren significativamente en los niveles de colesterol de cada animal de experimentación. Es así que utilizando el Test Estadístico ANOVA, para datos Agrupados a un nivel de significancia del 95 %, el valor de p fue 0.0004E-2, siendo menor que 5%, lo que expresa que si existió diferencia estadísticamente entre tratamientos.

CUADRO No. 18

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE TUKEY HSD, PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES, COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS DE TRATAMIENTOS, DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Oreocallis grandiflora*. DIFERENCIA DE LOS NIVELES DE COLESTEROL ENTRE EL DÍA 1 Y DÍA 30. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

12/02/2014 16:01			
Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			

Número de Casos:	30		
Método:	Tukey HSD al 95.00%		

	N	Media	Grupos Homogéneos

C-	5	5.8000	X
Blanco	5	6.4000	X
C+	5	6.4000	X
Dosis media	5	11.0000	X X
Dosis baja	5	17.8000	XX
Dosis Alta	5	18.2000	X

Contraste		Diferencia	+/- Límite

Blanco VS C-		0.6000	7.0780
Blanco VS C+		0.0000	7.0780
Blanco VS Dosis baja		*-11.4000	*7.0780
Blanco VS Dosis media		-4.6000	7.0780
Blanco VS Dosis Alta		*-11.8000	*7.0780
C- VS C+		-0.6000	7.0780
C- VS Dosis baja		*-12.0000	*7.0780
C- VS Dosis media		-5.2000	7.0780
C- VS Dosis Alta		*-12.4000	*7.0780
C+ VS Dosis baja		*-11.4000	*7.0780
C+ VS Dosis media		-4.6000	7.0780
C+ VS Dosis Alta		*-11.8000	*7.0780
Dosis baja VS Dosis media		6.8000	7.0780
Dosis baja VS Dosis Alta		-0.4000	7.0780
Dosis media VS Dosis Alta		*-7.2000	*7.0780

*Diferencia estadísticamente significativa

En el CUADRO No. 18, se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa de la reducción de colesterol en sangre producida con el tratamiento del extracto a dosis alta y el control negativo.

Lo mismo sucede con el tratamiento a una dosis baja, esto nos permitió suponer que el uso de este extracto presenta un efecto sobre los niveles de colesterol, promoviendo su reducción.

3.2.4 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE RATAS (*Rattus norvegicus*).

CUADRO No. 19 DISEÑO HISTOPATOLÓGICO DE RATAS (*Rattus norvegicus*) DE LA CEPA WISTAR, A LOS QUE SE LES ADMINISTRÓ DOSIS DEL EXTRACTO DE *Oreocallis grandiflora*, ALMIDÓN Y ACARBOSA. POR EL LAPSO DE 30 DÍAS. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE DEL 2013.

Muestra	Examen Macroscópico	Examen microscópico
Blanco	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Peso: 11.1 mg Color: Rojo oscuro Largo: 5.5 cm Ancho: 4.0 cm Profundidad: 0.6</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Peso: 1.1 mg Color: café oscuro Largo: 1.7 cm Ancho: 1.1 cm Profundidad: 0.5 cm</p> <p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Peso: 2.9 mg Color: blanquecino Largo: 3 cm Ancho: 1,1 Profundidad: 0.6</p>	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Lobulillos hepáticos de arquitectura normal. Espacios porta normales. Congestión vascular.</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Glomérulos normales. Túbulos de calibre Normales. Vasos Congestivos.</p> <p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Integridad de la mucosa Gástrica. Sin lesiones focales ni erosivos.</p>
Control Negativo	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Peso: 12.6 mg Color: Rojo oscuro Largo: 5.7 cm Ancho: 4.6 cm Profundidad: 0.7</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Peso: 1.1 mg Color: café oscuro Largo: 1.7 cm Ancho: 1.2 cm Profundidad: 0.6 cm</p>	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Espacios porta normales. Lobulillos hepáticos de arquitectura normal. Congestión vascular.</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Túbulos de calibre Normales. Glomérulos normales. Vasos Congestivos.</p> <p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Sin lesiones focales ni erosivos. Integridad de la mucosa Gástrica.</p>

	<p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Peso: 4.3 mg Color: blanquecino Largo: 2.9 cm Ancho: 1,6 Profundidad: 0.6</p>	
Control Positivo	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Peso: 12.6 mg Color: Rojo oscuro Largo: 5.5 cm Ancho: 4.6 cm Profundidad: 0.7 cm</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Peso: 1.0 mg Color: café oscuro Largo: 1.7 cm Ancho: 1.1 cm Profundidad: 0.5 cm</p> <p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Peso: 1.9 mg Color: blanquecino Largo: 2.3 cm Ancho: 1,1 cm Profundidad: 0.6 cm</p>	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Congestión vascular. Espacios porta normales. Lobulillos hepáticos de arquitectura normal.</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Vasos Congestivos. Túbulos de calibre Normales. Glomérulos normales.</p> <p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Integridad de la mucosa Gástrica. Sin lesiones focales ni erosivos.</p>
Dosis Baja	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Peso: 11.1 mg Color: Rojo oscuro Largo: 6.2 cm Ancho: 4.3 cm Profundidad: 0.9</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Peso: 1.5 mg Color: café oscuro Largo: 2.2 cm Ancho: 1.1 cm</p>	<p style="text-align: center;">Hígado</p> <p>Lobulillos hepáticos de arquitectura normal. Congestión vascular. Espacios porta normales.</p> <p style="text-align: center;">Riñón</p> <p>Vasos Congestivos. Glomérulos normales. Túbulos de calibre Normales.</p> <p style="text-align: center;">Estómago</p> <p>Sin lesiones focales ni erosivos. Integridad de la mucosa Gástrica.</p>

	<p>Profundidad: 0.6 cm</p> <p>Estómago</p> <p>Peso: 1.4 mg</p> <p>Color: blanquecino</p> <p>Largo: 3.1 cm</p> <p>Ancho: 1,2 cm</p> <p>Profundidad: 0.7 cm</p>	
<p>Dosis</p> <p>Media</p>	<p>Hígado</p> <p>Peso: 12.3 g</p> <p>Color: Rojo oscuro</p> <p>Largo: 6.2 cm</p> <p>Ancho: 4.1 cm</p> <p>Profundidad: 0.9</p> <p>Riñón</p> <p>Peso: 3.3 g</p> <p>Color: café oscuro</p> <p>Largo: 1.8 cm</p> <p>Ancho: 1.5 cm</p> <p>Profundidad: 0.7 cm</p> <p>Estómago</p> <p>Peso: 2.8 mg</p> <p>Color: blanquecino</p> <p>Largo: 2.6 cm</p> <p>Ancho: 1.5 cm</p> <p>Profundidad: 0.6 cm</p>	<p>Hígado</p> <p>Congestión vascular. Lobulillos hepáticos de arquitectura normal. Espacios porta normales.</p> <p>Riñón</p> <p>Túbulos de calibre Normales. Vasos Congestivos. Glomérulos normales.</p> <p>Estómago</p> <p>Integridad de la mucosa Gástrica. Sin lesiones focales ni erosivos.</p>

Dosis Alta	Hígado	Hígado
	Peso: 14.9 mg Color: Rojo oscuro Largo: 6.2 cm Ancho: 4.3 cm Profundidad: 0.8	Congestión vascular. Lobulillos hepáticos de arquitectura normal. Espacios porta normales.
	Riñón	Riñón
	Peso: 1.4 mg Color: café oscuro Largo: 1.8 cm Ancho: 1.2 cm Profundidad: 0.6 cm	Glomérulos normales. Túbulos de calibre Normales. Vasos Congestivos.
	Estómago	Estómago
	Peso: 7.3 mg Color: blanquecino Largo: 3.6 cm Ancho: 1,6 cm Profundidad: 1.1 cm	Sin lesiones focales ni erosivos. Integridad de la mucosa Gástrica.

En el CUADRO No. 19, se observó que al terminar el tratamiento a diferentes concentraciones de administración del extracto no provocó ningún efecto tóxico a nivel de los órganos implicados en funciones directas en el metabolismo de las sustancias (estómago, hígado y riñones), resultado que fue emitido por el Doctor Oswaldo Duque (Patólogo). Estos resultados demostraron ser eficaces a las concentraciones administradas del extracto.

CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *Oreocallis grandiflora*, administrado a una concentración superior a 0.02 mg planta/mL presentó una actividad inhibitoria de la absorción de glucosa a partir del sustrato de almidón, probablemente por la inhibición de la enzima alfa amilasa en el intestino delgado de *Rattus norvegicus*; a una concentración de 0.04 mg planta/mL se apreció el efecto farmacológico deseado, dándonos a entender que a partir de esta concentración se puede adquirir la disminución de los niveles de glucemia en la sangre; y a una concentración de 0.08 mg planta/ml, ejerce una actividad inhibitoria de la absorción de glucosa similar a la que se produce tras la administración de 50 mg/Kg peso de acarbosa, en *Rattus norvegicus*.
2. La actividad inhibitoria de la absorción de glucosa en *Rattus norvegicus*, producida por el extracto acuoso de *Oreocallis grandiflora*, es dosis dependiente. No se observó ni habituación ni sensibilización respecto al efecto farmacológico del extracto de *Oreocallis grandiflora* durante el tiempo de experimentación.
3. Aunque el extracto acuoso de *Oreocallis grandiflora*, previno ligeramente el incremento natural de la concentración de los triglicéridos en sangre (20 mg/dL) en los grupos experimentales, no se evidenció un claro efecto sobre la disminución de los mismos.
4. La administración del extracto acuosos de *Oreocallis grandiflora*, a concentraciones altas presento un evidente efecto sobre la reducción de concentración de colesterol en sangre (20mg/dL) en los 30 días que duró la experimentación en los grupos de ensayo.
5. La administración del extracto acuoso de *Oreocallis grandiflora* no presentó un efecto toxico agudo sobre los órganos farmacocinéticos (estómago, hígado y riñones) de los sujetos experimentales durante los 30 días que fue el tiempo que duró la experimentación.

6. La caracterización fitoquímica preliminar del extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora*, evidenció la presencia de catequinas, resinas, saponinas, Cumarinas, quinonas, Triterpenos, esteroides, compuesto fenólicos y taninos, azúcares reductores y flavonoides de tipo antocianidinas. Dichos flavonoides se encuentran en un porcentaje de 1.14 en el extracto etanólico y en un porcentaje del 0.99 en el extracto acuoso, de un total de 50 g de la planta vegetal seca.

RECOMENDACIONES

1. Investigar en fracciones purificadas del extracto compuestos que tengan efecto sobre la inhibición de alfa amilasa y la reducción del colesterol.
2. Realizar pruebas de toxicidad crónica del extracto de *Oreocallis grandiflora* a fin de tener certeza sobre la seguridad de su uso.
3. Desarrollar una forma farmacéutica del extracto con posteriores criterios de industrializar.

BIBLIOGRAFÍA

- **AHMAD, Shamim.** Diabetes una vieja enfermedad, una nueva visión. New York-USA. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. 2013; pp 1-14.
- **ALEJANDRO-ESPINOSA, Mónica.** Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. (Redalyc.org). (Chile). No 1. Vol 12; pp 59-68. Enero 2013.
- **ALLMANN-ISALIN. Issac.** Husbandry. (Handbook of laboratory rat). (New York-USA). pp. 46-50. June 2013
- **ASHOK, Tiwari. et al.** 2011, Influence of antioxidant rich fresh vegetable juices on starch induced postprandial hyperglycemia in rats, (Food And Funtion). (USA). No 9. Vol 2; pp 507-570. September 2011.
- **Asociación Latinoamericana de Diabetes.** Guías ALAD de diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. <http://www.revistaalad.com.ar/website/articulo.asp?id=12>. 03-12-2013.
- **ÁVILA, Lorena.** Clasificación y Tratamiento de la Diabetes Mellitus. (ELSERVIER). (México). No 2. Vol. 38; pp. 1. Septiembre 2010.
- **BARRETO, Mario.** El Mate, su historia y cultura. 2da. ed; Buenos Aires-Argentina. del Sol. 2006; pp 44.
- **CARRASCO, Nantali.** Comprobación del Efecto Hipoglucemiante del Extracto del Fruto de la Tuna (*Opuntia ficus-indica*) en Ratones (*Mus musculus*) con Hiper glucemia Inducida. (Tesis) (Bioq. Farm). ESPOCH, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador., 2012., pp 73.

- **CARRILLO, Pulina.** Comprobación del Efecto Hipoglucemiante del Sumo del Fruto de Noni (*Morinda citrifolia*), en Ratas (*Rattus norvegicus*) con Hiperglicemia Inducida. (Tesis) (Bioq. Farm). ESPOCH, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador., 2012. pp 92
- **COREL, Vanessa.** Tratamiento de la Diabetes Mellitus. (Informe del Sistema Nacional de Salud). (España). No 2. Vol. 24; pp 34-37. November 2000.
- **Federación Internacional de Diabetes.** Carga Mundial. (IDF Atlas Diabetes). (USA). Six Edition.
<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/la-carga-mundial?language=es>.
10-02-2014.
- **GARCÍA, Fermín.** Pie diabético. (Infogeriatria). (España). No 2. Vol. 3; pp 2-4. Agosto 2011.
- **HEDRICH, Hans.** History, Strains and Models. (Handbook of laboratory rat). (New York-USA). pp. 4. June 2013.
- **KEENAN, Kenne,** Nutrition. (Handbook of laboratory rat). (New York-USA). pp. 57-69. June 2013
- **KEMP, Robert.** Handling and Restraint. (Handbook of laboratory rat). (New York-USA). pp. 36-39.
- **LÓPEZ, M.** et al. La Diabetes Mellitus: Concepto, clínica y diagnóstico. http://www.elendocrino.com/linked/Archivos%20profesionales/Diabetes%20Mellitus_Dco_Clinica_Etio.pdf. 11-12-2013.
- **Ministerio de Salud Pública.** Día mundial de la Diabetes: MSP ejecuta acciones para reducir su incidencia y complicaciones.

<http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes-msp-ejecuta-acciones-para-reducir-su-incidencia-y-complicaciones/>.

10-02-2014.

- **MIRANDA, Martha.** Farmacognosia y productos naturales. (Normas Ramales. De drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992). (Cuba). pp. 32-44, 56-62. Agosto 2006
- **MUÑOZ, Omar. et al.** Plantas medicinales de uso en Chile, Química y Farmacología. 2da. ed; Santiago de Chile-Chile. Universitaria S.A. 1999; pp 169.
- **OJEDA, R.** et al. Inhibición de la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa a partir de los extractos totales de *justicia colorata* (nees) wassh (insulina), *artocarpus altilis* (parkinson) fosberg (fruto del pan) y *adiantum poiretti wikstr* (culantrillo). (UTPL). (Loja-Ecuador). pp 2 y 3. 2008.
- **Organización Mundial de la Salud.** Diabetes.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.
10-02-2014.
- **PATÍÑO, Juan.** Metabolismo, Nutrición y Shok., 4ta. ed; Bogotá-Colombia. Medica Internacional Bogotá. 2006; pp 91.
- **PAZ, Juan.** Análisis químico de las plantas aromáticas y medicinales. (Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales). (Argentina). No 1. Vol.4; pp 109-117. 2009.
- **PAZMIÑO, Carlitos.** Determinación de la Actividad Hipoglicemiante del Extracto Hidroalcoholico de *Justicia chlorostachya Leonard* (Insulina) en Ratones con Hiperglicemia. (Tesis) (Bioq. Farm). ESPOCH, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador., 2012. pp 66.

- **PILCO, Gisela.** COMPROBACIÓN DEL EFECTO ADELGAZANTE DE LA TINTURA DE APIO (*Apium graveolens*) Y EL PEREJIL (*Petroselinum sativum*) EN VOLUNTARIOS CON SOBREPESO. (Tesis) (Bioq. Farm). ESPOCH, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador., 2012. pp 37 y 38.
- **QUEZADA, Alberto.** Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. (Tesis) (Quim. Farm). Universidad Autónoma de Yucatán Facultad de Ciencias. Yucatán-México., 1997. pp. 118.
- **REYNEL, C & J Marcelo.** Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Lima-Perú. Serie de investigación y Sistematización No. 9. Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION.. 2009.pp 122.
- **ROJO, Rubio.** et al. Enzimas amilolíticas en la alimentación de rumiantes. (Redalyc). (México). No 2. Vol. 23; pp 173-175. Febrero 2007.
- **RUIZ, Miguel.** et al. La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. Vivir, enfermar y morir en una sociedad opulenta. (España). No 1. Vol. 5; pp 15 y 16. Abril 2006.
- **SÁNCHEZ, Sara.** et al. C13- Yacon: Un potencial producto natural para el tratamiento de la diabetes. (Redalyc). (Chile). No 5. Vol. 6; pp 162 y 163. 2007.
- **SARANGO, Verónica.** Determinación de la actividad antidiabética de los extractos totales de nueve especies vegetales nativas del Sur del Ecuador. (Tesis) (Bioq. Farm). UTPL, Facultad de Ciencias. Loja-Ecuador., 2012. pp 50-60.
- **SENOO, Haruki.** Digestion, metabolism. (Handbook of laboratory rat). (New York-USA). pp. 367-372.
- **SERRANO, Marco.** Fisiología de la absorción y digestión de los hidratos de carbono. (ANS). (España). No 3. Vol. 5; pp 75-77. Jul.-Sep. 1998.

- **SHARAPIN, Nuria.** Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. 1ra. ed; Santa Fé de Bogotá, D.C- Colombia. Azucena Martínez. 2000; pp 146.
- **SUKUMAR, D.** Phytochemical Studies On Grevillea Robusta.a.cunn.exr.br. (Global journal for research analysis). (USA). No 2277. Vol. 3; pp 7 y 8. Feb 2014.
- **TOUMILEHTO, Jaakko.** Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. (The New England Journal of Medicine). (USA). No 18. Vol 344; pp 1343. May 3, 2001.
- **VALSECIA, Malgor.** Insulina. (Farmacología de la diabetes).
http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen2/cap25_insuli.pdf.
11-2-2014.
- **WAGNER, Hedrig.** Plant drug analysis. 2da ed; Berlin-Germany. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1996; pp 169.

ANEXOS

ANEXO No. 1. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA Y PULVERIZADA DE *Oreocallis grandiflora*

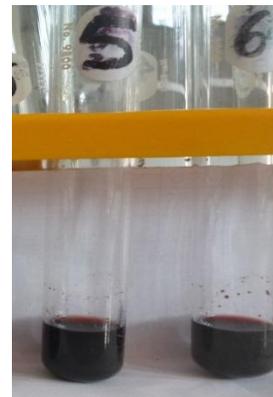


FOTOGRAFÍA No. 4. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA Y PULVERIZADA

ANEXO No. 2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO De *Oreocallis grandiflora*.



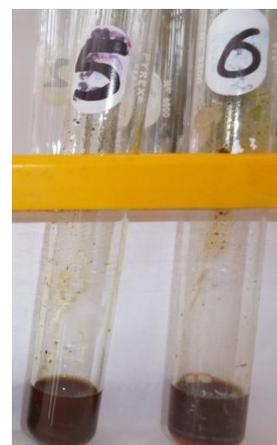
ENSAYO DE RESINAS



ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS



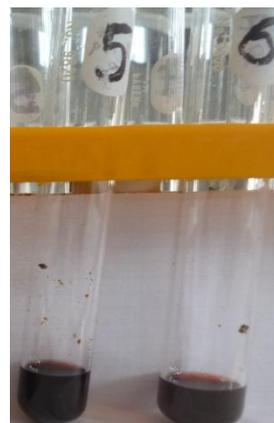
ENSAYO DE BORNTRAGER



ENSAYO DE FEHLING



ENSAYO DE FeCl₃



ENSAYO DE SHINODA

FOTOGRAFÍA No. 5. ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO.

ANEXO No. 3. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO RUTINA.



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



MUESTRAS LISTAS PARA EL ANÁLISIS

FOTOGRAFÍA No. 6. MÉTODO DE RUTINA

ANEXO No. 4. DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oreocallis grandiflora*.



ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO, ALMIDÓN Y ACARBOSA



MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA. TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL EN SANGRE



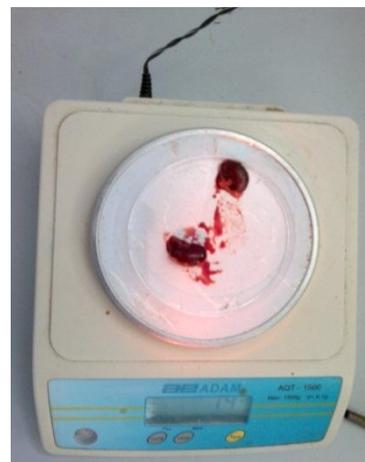
DISECCIÓN DE LA RATA (*Rattus norvegicus*)



ESTÓMAGO



HIGADO



RIÑONES

FOTOGRAFÍA No. 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

ANEXO No. 5. VALORES DE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS EN SANGRE.

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 1	93	103	117	134	Control -
Animal 1	115	104	93	89	Control +
Animal 1	97	100	110	121	Blanco
Animal 1	93	100	103	121	Dosis baja
Animal 1	98	102	106	125	Dosis Media
Animal 1	100	102	105	121	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 2	95	100	115	137	Control -
Animal 2	118	102	95	92	Control +
Animal 2	94	97	107	120	Blanco
Animal 2	95	97	100	124	Dosis baja
Animal 2	100	105	103	123	Dosis Media
Animal 2	97	104	103	125	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 3	91	106	119	131	Control -
Animal 3	112	106	91	91	Control +
Animal 3	100	100	110	122	Blanco
Animal 3	90	103	106	121	Dosis baja
Animal 3	99	99	108	127	Dosis Media
Animal 3	104	105	106	118	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 4	94	104	114	136	Control -
Animal 4	114	105	96	86	Control +
Animal 4	99	103	113	124	Blanco
Animal 4	94	98	102	118	Dosis baja
Animal 4	96	101	105	128	Dosis Media
Animal 4	99	99	105	123	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 5	92	102	120	135	Control -
Animal 5	116	103	90	87	Control +
Animal 5	94	100	110	118	Blanco
Animal 5	93	102	104	121	Dosis baja
Animal 5	97	102	107	122	Dosis Media
Animal 5	102	98	106	119	Dosis Alta

ANEXO No. 6. VALORES DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN SANGRE.

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 1	174	173	171	168	Control -
Animal 1	172	169	167	166	Control +
Animal 1	169	167	165	163	Blanco
Animal 1	175	173	169	157	Dosis Baja
Animal 1	171	169	165	160	Dosis Media
Animal 1	179	175	174	160	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 2	175	170	173	172	Control -
Animal 2	175	167	165	162	Control +
Animal 2	171	165	168	160	Blanco
Animal 2	171	175	172	160	Dosis Baja
Animal 2	168	171	167	157	Dosis Media
Animal 2	175	173	178	157	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 3	173	175	169	164	Control -
Animal 3	170	171	169	170	Control +
Animal 3	167	170	162	165	Blanco
Animal 3	177	173	170	158	Dosis Baja
Animal 3	174	168	165	163	Dosis Media
Animal 3	183	175	176	159	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 4	178	176	174	170	Control -
Animal 4	171	169	170	166	Control +
Animal 4	169	166	167	164	Blanco
Animal 4	179	171	167	155	Dosis Baja
Animal 4	172	169	163	159	Dosis Media
Animal 4	177	178	170	164	Dosis Alta

ANIMAL	DIA 1	DIA 5	DIA 15	DIA 30	TRATAMIENTO
Animal 5	170	172	168	167	Control -
Animal 5	173	170	165	165	Control +
Animal 5	170	166	163	162	Blanco
Animal 5	173	172	168	156	Dosis Baja
Animal 5	169	167	166	160	Dosis Media
Animal 5	179	176	171	162	Dosis Alta