



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

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL
EXTRACTO DE CHUQUIRAGUA (*Chuquiraga jussieui*) EN RATAS
(*Rattus norvegicus*)”**

Trabajo de titulación para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:
ANA CRISTINA BARRERA BASANTES

Riobamba – Ecuador

2015



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

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL
EXTRACTO DE CHUQUIRAGUA (*Chuquiraga jussieui*) EN RATAS
(*Rattus norvegicus*)”**

Trabajo de titulación para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ANA CRISTINA BARRERA BASANTES
TUTORA: BQF. CECILIA TOAQUIZA

Riobamba – Ecuador

2015

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO DE CHUQUIRAGUA (*Chuquiraga jussieui*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*)”**, de responsabilidad de la señorita egresada Ana Cristina Barrera Basantes, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Félix Andueza DIRECTOR DE ESCUELA	_____	_____
BQF. Cecilia Toaquiza DIRECTORA DE TESIS	_____	_____
Dra. Elizabeth Escudero MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Dra. María Macas MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
DOCUMENTALISTA SISBB - ESPOCH	_____	_____

HOJA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Ana Cristina Barrera Basantes**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

ANA CRISTINA BARRERA BASANTES

DEDICATORIA

A mi padre por ser mi sustento incondicional, por su arduo trabajo durante toda la vida, ya que con su entrega ha sido posible mi formación académica y de vida, creyendo en mí en toda circunstancia.

A mi madre por ser una mujer luchadora que me ha enseñado que pese a las dificultades se puede salir adelante, cumpliendo así mis sueños.

Este trabajo también se lo dedico a mis queridos hermanos Ruth y Daniel quienes han sido mis compañeros de vida, siendo los testigos y el apoyo a lo largo de mi carrera.

Quiero dedicar este trabajo a mi esposo por ser un hombre que ha sabido creer en mí apoyándome en todo lo que emprenda.

Dedico especialmente este trabajo a mi querido hijo Samuel ya que ha sido mi fuerza en los momentos difíciles para salir adelante en la culminación de este trabajo de titulación.

AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer a mi Dios por permitirme llegar hasta este punto, dándome sabiduría, fuerza y amor, ya que es por El que ocurren todas las cosas. Por enseñarme paciencia y perseverancia durante toda mi carrera académica.

A mi padre Hugo Barrera que con su arduo trabajo y dedicación me ha provisto de todo lo necesario para formarme profesionalmente.

Un infinito agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme estudiar en sus establecimientos preparándome para un futuro profesional competitivo y exitoso. A mis maestros que han sido el pilar fundamental para obtener todos los conocimientos necesarios para desarrollarme como un buen profesional.

A la BQF. Cecilia Toaquiza por su gran apoyo y paciencia para el desarrollo de esta tesis; a la Dra. Elizabeth Escudero por su colaboración y motivación brindada en este trabajo.

A mi toda mi familia que directa o indirectamente me ofrecieron su apoyo y cariño durante mis estudios y realización de esta tesis.

Quiero agradecer también a mis amigas y amigos por haber compartido conmigo buenos y malos momentos durante el tiempo que estuvimos en las aulas así como en el transcurso de la realización de nuestras tesis, mi cariño por siempre.

Ana Cristina Barrera Basantes

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Paginas
PORTADA	1
HOJA DE CERTIFICADO	2
HOJA DE RESPONSABILIDAD	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTO	5
RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 El riñón y la insuficiencia renal	3
1.2 Diuréticos	4
1.2.1 Clasificación de las drogas diuréticas	4
<i>1.2.1.1 Diuréticos osmóticos</i>	4
<i>1.2.1.2 Diuréticos inhibidores de los túbulos renales</i>	4
<i>1.2.1.2.1 Inhibidores de la anhidrasa carbónica</i>	4
<i>1.2.1.2.2 Benzotiadiazinas y diuréticos relacionados</i>	5
<i>1.2.1.2.3 Diuréticos ahorradores de potasio</i>	5
<i>1.2.1.2.4 Diuréticos de asa (alta eficiencia)</i>	5
1.3 Plantas medicinales	5
<i>1.3.1 Plantas medicinales diuréticas</i>	6
1.4 Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>)	7
<i>1.4.1 Descripción botánica</i>	7
<i>1.4.2 Taxonomía</i>	8
<i>1.4.3 Distribución geográfica y origen de la especie</i>	9
<i>1.4.4 Usos medicinales</i>	9
<i>1.4.5 Principios activos</i>	9

1.5	Análisis químico de las plantas medicinales (PM)	10
1.5.1	<i>Introducción</i>	10
1.5.2	<i>Obtención de la muestra</i>	10
1.5.3	<i>Ensayos morfológicos, anatómicos y organolépticos</i>	11
1.5.3.1	<i>Análisis organoléptico</i>	11
1.5.4	<i>Ensayos Físico- químicos cualitativos y cuantitativos</i>	11
1.6	Metabolitos primarios y secundarios	12
1.6.1	<i>Metabolitos secundarios</i>	13
1.6.1.1	<i>Isoprenoides</i>	14
1.6.1.1.1	<i>Terpenos</i>	14
1.6.1.1.2	<i>Aceites esenciales</i>	14
1.6.1.1.3	<i>Saponinas</i>	14
1.6.1.1.4	<i>Heterósidos cardiotónicos</i>	14
1.6.1.2	<i>Alcaloides</i>	14
1.6.1.3	<i>Derivados fenólicos</i>	15
1.6.1.3.1	<i>Fenoles simples</i>	15
1.6.1.3.2	<i>Ácidos fenólicos</i>	15
1.6.1.3.3	<i>Taninos</i>	15
1.6.1.3.4	<i>Cumarinas</i>	15
1.6.1.3.5	<i>Lignanós</i>	16
1.6.1.3.6	<i>Quinonas</i>	16
1.6.1.3.7	<i>Flavonoides</i>	16
1.7	Extracción	20
1.7.1	<i>Tipos de extracción</i>	20
1.7.1.1	<i>Percolación</i>	20
1.7.1.2	<i>Maceración</i>	20
1.7.1.3	<i>Decocción</i>	21
1.7.1.4	<i>Infusión</i>	21
1.7.1.5	<i>Digestión</i>	21
1.8	Extractos	21
1.8.1	<i>Extractos fluidos</i>	22
1.8.2	<i>Extractos secos</i>	22
1.8.3	<i>Extractos blandos</i>	22
1.8.4	<i>Crioextractos</i>	22
1.9	Preparación de extractos	23
1.10	Concentración de extractos	24

1.11	Extracto hidroalcohólico	24
1.12	Análisis cromatográfico	24
<i>1.12.1</i>	<i>Cromatografía en Capa Fina (CCF)</i>	25
<i>1.12.2</i>	<i>Cromatografía en columna</i>	26
1.13	Métodos espectrofotométricos	26
<i>1.13.1</i>	<i>Espectro infrarrojo</i>	26
<i>1.13.2</i>	<i>Espectro ultravioleta</i>	27
1.14	Animales de laboratorio para experimentación y enseñanza	27
<i>1.14.1</i>	<i>El reactivo biológico</i>	28
<i>1.14.2.</i>	<i>El principio de las tres r's como imperativo ético y de calidad</i>	28
<i>1.14.3</i>	<i>Rata <i>Rattus norvegicus</i></i>	29
<i>1.14.4</i>	<i>Información taxonómica</i>	29
1.15	Bioterio de experimentación	29
1.16	Técnicas de sujeción y de procedimientos	29
<i>1.16.1</i>	<i>Métodos de inmovilización para rata</i>	30
<i>1.16.2</i>	<i>Vías de administración para rata y ratón</i>	31
<i>1.16.2.1</i>	<i>Intramuscular</i>	31
<i>1.16.2.2</i>	<i>Intraperitoneal</i>	31
<i>1.16.2.3</i>	<i>Subcutánea</i>	32
<i>1.16.2.4</i>	<i>Intravenosa</i>	32
<i>1.16.2.5</i>	<i>Esofágica o VO</i>	33

CAPÍTULO II

2.	PARTE EXPERIMENTAL	34
2.1	Lugar de investigación	34
2.2	Materiales y equipos	34
<i>2.2.1</i>	<i>Material vegetal</i>	34
<i>2.2.2</i>	<i>Material biológico</i>	34
<i>2.2.2.1</i>	<i>Taxonomía</i>	34
<i>2.2.2.2</i>	<i>Descripción anatómica</i>	35
<i>2.2.2.3</i>	<i>Condiciones ambientales</i>	35
<i>2.2.3</i>	<i>Materiales de laboratorio</i>	35
<i>2.2.4</i>	<i>Equipos</i>	36
<i>2.2.5</i>	<i>Reactivos</i>	37
2.3	Métodos y técnicas	38

2.3.1	<i>Control de calidad de la droga vegetal</i>	38
2.3.1.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	38
2.3.1.2	<i>Determinación de Cenizas Totales</i>	39
2.3.1.3	<i>Determinación de las Cenizas Solubles en Agua</i>	40
2.3.1.4	<i>Determinación de las Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico</i>	41
2.3.2	<i>Obtención del extracto de la chuquiragua (Chuquiraga jussieui)</i>	41
2.3.3	<i>Control de calidad de los extractos</i>	42
2.3.3.1	<i>Determinación de los requisitos organolépticos</i>	42
2.3.3.2	<i>Determinación de la densidad relativa</i>	42
2.3.3.3	<i>Determinación del índice de refracción</i>	43
2.3.3.4	<i>Determinación del pH del extracto</i>	43
2.3.4	<i>Preparación de extractos y tamizaje fitoquímico</i>	44
2.3.5	<i>Análisis cromatográfico del extracto de Chuquiraga jussieui</i>	50
2.3.6	<i>Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como rutina</i>	50
2.3.7	<i>Evaluación de la actividad diurética del extracto de chuquiragua (Chuquiraga jussieui)</i>	51
2.3.8	<i>Medición de electrolitos Na⁺, K⁺ y Ca⁺²</i>	54
2.3.9	<i>Toxicidad aguda</i>	55
2.3.10	<i>Análisis estadístico</i>	55

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
3.1	Control de calidad de la droga vegetal cruda	57
3.2	Control de calidad del extracto de la Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>)	58
3.3	Resultados del Tamizaje fitoquímico para la <i>C. jussieui</i>	59
3.4	Resultado del análisis cromatográfico (TLC) de flavonoides	61
3.5	Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como porcentaje de rutina	61
3.6	Evaluación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>) en ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)	62
3.7	Electrolitos urinarios	68
3.8	Análisis estadístico	70
3.9	Toxicidad aguda en dosis repetida del extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i>	73

CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	84

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ERC	Insuficiencia renal crónica
CAH	Enzima anhidraza carbónica
PM	Plantas medicinales
CoA	Coenzima A
A	Alfa
UV	Ultra violeta
°C	Grados centígrados
G	Gramos
mL	Mililitros
CCF	Cromatografía en capa fina
CGL	Cromatografía de gases
Rf	Factor de referencia
Nm	Nanómetros
Mm	Milímetros
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
SC	Subcutánea
IV	Intravenosa
VO	Vía oral
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
M	Molar
H	Hora
Mg	Miligramos
Min	Minutos
Cm	Centímetros
pH	Potencial de hidrogeno
µL	Microlitros
mEq	Miliequivalentes
Kg	Kilogramo
GC +	Grupo control positivo
E.U.V	Excreción Urinaria Volumétrica
ANOVA	Análisis de varianza

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-3:	Resultados del análisis del control de calidad de la materia prima de Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>). Laboratorio de productos naturales. ESPOCH. Mayo 2015	57
Cuadro 2-3:	Resultados del análisis organoléptico y físico-químico del extracto de Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>). Laboratorio de fitoquímica. Facultad de ciencias. Espoch. Mayo 2015	58
Cuadro 3-3:	Análisis cualitativo fitoquímico de los extracto etéreo, alcohólico y acuoso de <i>Chuquiraga jussieui</i> . Laboratorio de productos naturales. ESPOCH. Mayo 2015	59
Cuadro 4-3:	Resultados de los Rf de la cromatografía del extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga jussieui</i> . Laboratorio de productos naturales. ESPOCH. Mayo 2015	61
Cuadro 5-3:	Concentración de flavonoides totales expresado en ug de rutina /g de muestra en el extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i> . Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Abril 2015.	62
Cuadro 6-3:	Resultados del promedio del ensayo farmacológico de diuresis a diferentes concentraciones de extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i> . Bioterio de la Escuela Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo 2015	63
Cuadro 7-3:	Porcentaje de diuresis con respecto al blanco del extracto de Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>) en sus diferentes concentraciones	64
Cuadro 8-3:	Cálculo del volumen de excreción urinaria para cada uno de los tratamientos	65
Cuadro 9-3:	Porcentaje de diuresis con respecto al control positivo de extracto de Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>) en sus diferentes concentraciones	67
Cuadro 10-3:	Efecto farmacológico del extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i> sobre la excreción de los electrolitos. ESPOCH. Junio 2015.	68
Cuadro 11-3:	Análisis estadístico (promedio, error estándar y probabilidad) del volumen de orina a cada hora de los tratamiento del extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i> . ESPOCH. Junio 2015	71
Cuadro 12-3:	Análisis de varianza ANOVA para los volúmenes promedio finales	72

	de cada tratamiento. ESPOCH. Junio 2015	
Cuadro 13-3:	Análisis de comparaciones múltiples (test de Tukey), para el volumen promedio final de cada tratamiento. ESPOCH. Junio 2015	72
Cuadro 14-3:	Parámetros evaluados en la toxicidad aguda. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Mayo 2015	73
Cuadro 15-3:	Valores obtenidos de la medición del peso en gramos durante el análisis de toxicidad aguda en dosis repetida. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Mayo 2015	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación taxonómica de la Chuquiragua	8
Tabla 2-1:	Metabolitos primarios y secundarios de vegetales	13
Tabla 1-2:	Evaluación farmacológica	51
Tabla 2-2:	Denominación de grupos para la investigación	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Promedio de los volúmenes en mL al final del ensayo de diuresis de los diferentes tratamientos	64
Gráfico 2-3:	Porcentaje de diuresis respecto al blanco de los diferentes tratamiento del extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i>	65
Gráfico 3-3:	Porcentaje del volumen de excreción urinaria para cada tratamiento	66
Gráfico 4-3:	Porcentaje de diuresis respecto al control positivo de los diferentes tratamiento del extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i>	67
Gráfico 5-3:	Cuantificación de electrolitos Na ⁺ y K ⁺ de los diferentes tratamientos	68
Gráfico 6-3:	Relación Na ⁺ /K ⁺ de los diferentes tratamientos	69
Gráfico 7-3:	Cuantificación de Ca ⁺² de los diferentes tratamientos	70
Gráfico 8-3:	Promedio del volumen de orina final de los diferentes tratamientos.	71
Gráfico 9-3:	Peso de las ratas durante el análisis de toxicidad aguda	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Estructuras básicas de los Flavonoides	16
Figura 2-1:	Ruta de biosíntesis de los flavonoides en las plantas	17
Figura 3-1:	Estructura de la Quercetrina	19
Figura 4-1:	Estructura de la Rutina	19
Figura 5-1:	Cromatografía en Capa Fina	25
Figura 6-2:	Esquema para preparación de extractos	44
Figura 7-2:	Esquema para las reacciones en extracto etéreo.	45
Figura 8-2:	Esquema para las reacciones en extracto alcohólico	45
Figura 9-2:	Esquema para las reacciones en extracto acuoso	46

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-1:	<i>Chuquiraga jussieui</i> J.F.Gmel.	7
Fotografía 2-1:	Técnicas de agarre y sujeción	31
Fotografía 3-1:	Aplicación intramuscular en ratón	31
Fotografía 4-1:	Aplicación Intraperitoneal en rata	32
Fotografía 5-1:	Vía de administración subcutánea en ratón	32
Fotografía 6-1:	Vía de administración intravenosa	32
Fotografía 7-1:	Vía de administración oral en ratón	33
Fotografía 8-3:	Placa cromatografía del extracto de Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>)	61
Fotografía 9:	Chuquiragua (<i>Chuquiraga jussieui</i>)	84
Fotografía 10:	Recolección de la materia prima	84
Fotografía 11:	Maceración de la materia prima	84
Fotografía 12:	Obtención de la muestra madre	84
Fotografía 13:	Determinación de humedad y cenizas	84
Fotografía 14:	Determinación de pH	84
Fotografía 15:	Determinación del índice de refracción	85
Fotografía 16:	Determinación de la densidad relativa del extracto alcohólico	85
Fotografía 17:	Molienda de la materia prima	85
Fotografía 18:	Materia prima molida	85
Fotografía 19:	Ensayos de Sudan (+), Baljet (+) y Lieberman Buchard (+) en extracto etéreo	85
Fotografía 20:	Ensayos de Fehling (+), Espuma (+), Baljet (+) en extracto alcohólico	86
Fotografía 21:	Ensayos de Shinoda (+), Mayer (+), Dragendorff (+) y Cloruro férrico (+) en extracto alcohólico	86
Fotografía 22:	Ensayos de Shinoda (+) y Wagner (+) en extracto acuoso	86
Fotografía 23:	Corrido del solvente en la placa	87
Fotografía 24:	Revelado de la placa	87
Fotografía 25:	Preparación de materiales y reactivos para la cuantificación	87
Fotografía 26:	Introducción de la celda en el espectrofotómetro UV – visible	87
Fotografía 27:	Lectura de la absorbancia	87
Fotografía 28:	Preparación de las diferentes concentraciones de extracto a administrar	88
Fotografía 29:	Administración en ratas por vía oral de extracto de <i>Ch.</i>	89

	<i>jussieui</i>	
Fotografía 30:	Administración en ratas por vía parenteral del medicamento furosemida	89
Fotografía 31:	Recolección de orina de las ratas en jaulas metabólicas	89
Fotografía 32:	Equipo para determinación de electrolitos AVL 6380	89
Fotografía 33:	Examen de electrolitos en orina de rata a dosis de 400 mg/Kg de extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i>	90

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A:	Materia prima	84
Anexo B:	Preparación de extractos	84
Anexo C:	Control de calidad del extracto	84
Anexo D:	Tamizaje fitoquímico	85
Anexo E:	Cromatografía en capa fina	87
Anexo F:	Cuantificación de flavonoides totales	87
Anexo G:	Curva de calibración obtenida de rutina a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm	88
Anexo H:	Ensayo de la actividad diurética del extracto de <i>Chuquiraga jussieui</i>	88
Anexo I:	Medición de electrolitos Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	89

RESUMEN

La presente investigación fue la evaluación de la actividad diurética del extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en ratas (*Rattus norvegicus*), realizada en el laboratorio de Fitoquímica, laboratorio de Instrumental y Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se realizó un estudio previo de la planta como: control de calidad de la Chuquiragua y del extracto, tamizaje fitoquímico, análisis cromatográfico en placas de sílica gel y cuantificación de flavonoides totales por el método del $AlCl_3$ utilizando como estándar la rutina. Para la evaluación de la actividad diurética se utilizaron 15 ratas (*Rattus norvegicus*) con peso de 200 g a 300 g las cuales fueron divididas en 5 grupos experimentales, 3 para cada tratamiento: extracto de Chuquiragua a dosis de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg, 400 mg/Kg, al blanco se le administró suero fisiológico, y para el control positivo utilizamos furosemida (20mg/Kg), se midió el volumen total de orina y electrolitos. Finalmente se realizó el análisis toxicológico midiendo diferentes parámetros. En el tamizaje fitoquímico se confirmó la presencia de flavonoides, saponinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, taninos, alcaloides, azúcares reductores, fenoles, principios amargos y compuestos grasos. Se comprobó el efecto diurético del extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en las tres dosis administradas, con respecto al blanco los tres tratamientos tuvieron efecto diurético muy elevado, el tratamiento tres (400 mg/Kg) tuvo un 638 % siendo el de mayor actividad. Con relación al control positivo (furosemida) los tratamientos tuvieron menor actividad, con 43% para el tratamiento tres que fue el de mayor porcentaje. El ensayo toxicológico no evidenció efectos colaterales para el extracto de *C. jussieui*, por lo cual se puede considerar como no tóxico. Se recomienda realizar más estudios farmacológicos de la *C. jussieui* de las propiedades terapéuticas que se le atribuye y no estén comprobadas.

Palabras claves: <CHUQUIRAGUA [*Chuquiraga jussieui*]> <ACTIVIDAD DIURÉTICA >
<EFECTIVIDAD> <TAMIZAJE FITOQUÍMICO> <FUROSEMIDA> <SUERO FISIOLÓGICO> <FLAVONOIDES TOTALES > < RATAS [*Rattus norvegicus*]>

SUMMARY

The present research was the evaluation of the diuretic activity in Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) extract en rats (*Rattus norvegicus*), conducted in the laboratory of Phytochemistry, laboratory of instruments and Bioterio of the Faculty of Science of Polytechnic School of Chimborazo. A previous study of the plant was conducted as: a quality control of Chuquiragua and extract, phytochemical screening, chromatographic analysis on silica gel plates and quantification of total flavonoids by the method of AlCl₃ using standard routine. For evaluation of the diuretic activity, they used 15 rats weighing 200 g to 300 g which were divided into 5 experimental groups, three for each treatment; chuquiragua extract at doses of 100 mg/Kg, 200 mg/Kg, 400 mg/Kg, to white rats administered saline, and for a positive control it used furosemide (20 mg/Kg), the total volumen of urine and electrolytes were measured. Finally toxicological analysis was performed by measuring different parameters. Phytochemical screening confirmed the presence of flavonoids, saponins, micilages, triterpenes and/or steroids, tannins, alkaloids, reducing sugars, phenols, bitter principles and fatty compounds. The diuretic effect of Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) extract in three doses, with respect to white found in three treatments had very high diuretic effect, treatment three (400 mg/Kg) had a 638% being the most active. With regard to the positive control (furosemide) the treatments had lower activity, with 43% for the three treatment that had the highest percentage. The toxicological test evidenced no side effects of *C. jussieui* extract, so it can be regarded as nontoxic. It recommended that most pharmacological studies of *C. jussieui* of the therapeutic properties attributed to it and are not checked.

Ken words: CHUQUIRAGUA [*Chuquiraga jussieui*] > < DIURETIC ACTIVITY > < EFECTIVENESS > < SCREENING PHYTOCHEMICAL > < FUROSEMIDE > < SALINE > < TOTAL FLAVONOIDS > < RATS [*Rattus norvegicus*] >

INTRODUCCIÓN

En los tiempos actuales las enfermedades renales son muy comunes por razones como la diabetes, hipertensión arterial, Síndrome urémico hemolítico, etc. Por lo cual las personas desde tiempos ancestrales se han visto en la necesidad de usar plantas medicinales con propiedades curativas específicas.

Ecuador por ser un país biodiverso cuenta con innumerables vegetales con propiedades medicinales, sin embargo muchos de los conocimientos que se tienen de las propiedades curativas de las plantas medicinales se han ido perdiendo, esto es porque la mayoría de especies utilizadas como medicina cuentan con muy poca información que pueden generar los métodos experimentales que respalden su uso, careciendo de esta manera de referentes sobre su efectividad, toxicidad e identificación de metabolitos.

Con respecto a lo anunciado resulta importante la recuperación de información etnobotánica y comprobación científicamente de los efectos farmacológicos atribuidos a una planta medicinal. Desde la antigüedad las plantas medicinales han sido utilizadas por nuestros ancestros para aliviar diversas dolencias y enfermedades del cuerpo, hoy en día se busca rescatar el uso de las mismas con el fin de tener mejores resultados que la medicina tradicional y con menos efectos secundarios.

Es así que en el páramo del Ecuador encontramos un gran número de plantas medicinales, entre estas la Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) la cual se encuentra sobre los 3000 metros de altura, se le atribuyen diferentes propiedades medicinales, por ejemplo, la infusión de chuquiragua tiene propiedades diuréticas, tónicas y ayuda al hígado y al sistema digestivo; mientras que a sus flores, hojas e incluso al tallo se los utiliza para cicatrices, inflamaciones, e incluso como antiséptico de las vías urinarias y próstata

Castro (1998), realizó un estudio de la estandarización y determinación del DL 50 en los extractos fluidos de ajeno y chuquiragua en la universidad de Cuenca, determinando parámetro en las plantas como cenizas, humedad, sustancias solubles; estos se hallaron dentro de los parámetros normales; también encontró los principios activos en la chuquiragua como son los taninos, flavonoides, azúcares reductores, etc.

Dueñas y colaboradores (2014), efectuaron un estudio del análisis fitoquímico y de seguridad de los extractos de *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel, encontrando en el tamizaje fitoquímico la

presencia de tripterpenos y/o esteroides, fenoles y/o taninos, resinas y flavonoides. Identificaron los flavonoides fueron por cromatografía de capa delgada, concluyendo así que los principios activos presentes en los extractos presentan una baja toxicidad, lo que permite continuar su desarrollo como biofuncional.

Naranjo (2013), evaluó de la actividad diurética y cuantificación de polifenoles de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa l.*) cultivada en Pomona Pastaza-Ecuador, con el fin de conocer el efecto diurético del extracto, la cuantificación de polifenoles totales presentes en el vegetal y como estos influyen en la diuresis a diferentes concentraciones. Comprobó la presencia de polifenoles que administrados en diferentes concentraciones a ratas dieron efecto diurético, con 20 mg/Kg de polifenoles, teniendo un 47% de diuresis respecto al control positivo.

La Chuquiragua, planta de los páramos andinos del Ecuador conocida por sus cualidades terapéuticas, es consumida por muchas personas de la zona por sus efectos diuréticos, es así que vemos necesario estudiarla. Tales estudios serán realizados en la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH con el objetivo principal de evaluar la actividad diurética de la Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*) en ratas, realizando ensayos previos de la planta como cromatografía, cuantificación, control de calidad, etc.

Esto es con el fin de garantizar su consumo, y dotando de estudios sobre su composición química y su efectividad, así se verán beneficiadas las personas que la consumen, se abrirá nuevos estudios para investigaciones futuras e industrialización de la misma, beneficiando a nuevos profesionales y al desarrollo del país.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. El riñón y la insuficiencia renal

El riñón es una víscera que posee una estructura enormemente compleja y característica, debido a las numerosas tareas funcionales, bioquímicas y endocrinas que tiene encomendada.

La misión fundamental del riñón es estabilizar el volumen y las características fisicoquímicas del líquido extracelular e, indirectamente del intracelular, mediante la formación de la orina. El riñón es capaz también de sintetizar diversas hormonas o precursores que desempeñan un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular, e incluso en la propia función renal. (AVENDAÑO, 2009, p. 3)

Insuficiencia renal aguda.- la insuficiencia renal aguda es una complicación de diferentes padecimientos médicos que amenaza gravemente la vida de los pacientes y ha sido tema de importantes trabajos de investigación. Este síndrome se caracteriza por suspensión rápida y completa de la mayor parte de las funciones renales, seguida de retención nitrogenada progresiva, oliguria importante y desequilibrio electrolítico y ácido básico grave. (DÍAS, 1991, p. 123)

Insuficiencia renal crónica (ERC).- es el daño renal durante al menos tres meses, definido por anormalidades estructurales o funcionales del riñón con o sin descenso del filtrado glomerular, manifestado por: anormalidades patológicas o marcadores del daño renal, que incluyen alteraciones en la composición de sangre u orina y/o alteraciones en los estudios de imagen. La ERC afecta a un porcentaje significativo de la población debido, fundamentalmente a trastornos de prevalencia, como el envejecimiento, la hipertensión arterial, la diabetes y la enfermedad vascular. (AVENDAÑO, 2009, p. 801)

1.2. Diuréticos

Los diuréticos son drogas que reducen el volumen de líquido extracelular, aumenta la excreción urinaria de cloruro de sodio y, en forma secundaria, incrementan el volumen de orina excretado por los riñones. Los diuréticos se utilizan sobre todo para prevenir y reducir el edema y la ascitis. Estos trastornos se asocian con enfermedades cardiacas, renales y hepáticas. Estos agentes también se utilizan para el tratamiento de la hipertensión, la diabetes insípida, los cálculos renales, la hipercalcemia, la insuficiencia renal aguda y crónica y el síndrome nefrótico. (REMINGTON, 2003, p. 1588)

1.2.1. Clasificación de las drogas diuréticas

1.2.1.1. Diuréticos osmóticos

Los diuréticos osmóticos son sustancias que en solución son marcadamente hipertónicas. Estas drogas retienen agua ejerciendo una presión osmótica por los túbulos sin ser reabsorbidos y filtrando por el glomérulo, cuando se “administran por vía intravenosa”, producen una diuresis osmótica elevada ya que actúan deteniendo la reabsorción de cloro y sodio. (NICANDRO, 2008, p. 529)

El manitol, es el diurético osmótico utilizado con mayor frecuencia, es filtrado en el glomérulo y no es reabsorbido en los túbulos renales. Debido a sus efectos osmóticos en los túbulos proximales, el manitol impide la reabsorción de agua e interfiere en la reabsorción de sodio a través de la concentración de este ion en el líquido tubular. (REMINGTON, 2003, p. 1588)

1.2.1.2. Diuréticos inhibidores de los túbulos renales

Estos diuréticos inhiben los mecanismos tubulares responsables del transporte activo para la reabsorción de ciertos iones. (REMINGTON, 2003, p. 1591)

1.2.1.2.1. Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Actúan predominantemente en el túbulo proximal. Como la acetazolamida, dorzolamida. Su mecanismo de acción se puede resumir así: disminuye la reabsorción de sodio porque el cotrasporte de Na^+/H^+ dispone de menos hidrógenos. El resultado: aumento de la excreción de

sodio y agua. La enzima anhidraza carbónica (CAH) acelera la regulación del equilibrio de la reacción: $H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H_2O + CO_2$. (LÜLLMANN et al., 2010: pp. 162)

1.2.1.2.2. Benzotiadiazinas y diuréticos relacionados

En este grupo se encuentran los diuréticos tiazídicos que aumentan la excreción de sodio a través de la inhibición de la reabsorción de sodio en el segmento cortical (grueso) de la rama ascendente del asa de Henle y en el segmento inicial de los túbulos distales. Estas drogas también aumentan la excreción urinaria de cloro, potasio y, en menor medida bicarbonato. Entre estos se encuentran: Bendroflumetiazida, Benzotiazida, Ciclotiazida, Clortalidona, Hidroclorotiazida, Hidroflumetazida, etc. (REMINGTON, 2003, p. 1593)

1.2.1.2.3. Diuréticos ahorradores de potasio.-

Comprenden la espironolactona, el triamtreno y la amilorida. Estos agentes ejercen un efecto similar en la composición de los electrolitos urinarios: provocan una natriuresis leve y reducen la excreción de iones potasio e hidrogeno. (REMINGTON, 2003, p. 1596)

1.2.1.2.4. Diuréticos de asa (alta eficiencia)

Comprenden el ácido etacrínico (Edecrin), la furosemida (Lasix) y la bumetanida (Bumex); son los agentes diuréticos más potentes en la actualidad. El denominador común de ellos es que ejercen su acción principal en la rama ascendente (gruesa) del asa de Henle cortical y medular. Los diuréticos del asa inhiben el transporte activo de cloro, y posiblemente también de sodio, en este nivel de la nefrona. Son eficaces aun en presencia de alteraciones de los electrólitos y el equilibrio ácido básico. (REMINGTON, 2003, p. 1589)

1.3. Plantas medicinales

Las plantas medicinales son los vegetales que elaboran los principios activos, que tienen actividad benéfica o perjudicial sobre el organismo. Sirven para disminuir o neutralizar las enfermedades, alivian y devuelven la salud perdida. Dentro de las plantas medicinales se encuentran las aromáticas, las especias y las apícolas.

De acuerdo a su función las plantas medicinales se pueden clasificar como: plantas relajantes, digestivas, circulatorias, hepáticas, depurativas, respiratorias, para la piel, para los problemas reumáticos, para los ojos, boca y oídos, para la mujer y para mejorar el sistema inmune.

Plantas depurativas: Estas plantas tienen una actividad diurética ejerciendo acción en patologías de retención de líquidos, también son antisépticas por lo que ayudan en infecciones a las vías urinarias; asociado a esto está indicada para cálculos renales. (OLAYA & ALZAMORA, 2003, p. 5)

1.3.1. Plantas medicinales diuréticas

Las plantas medicinales diuréticas suelen producir una excreción, principalmente de agua, sin que generalmente se vea aumentada la eliminación de iones. Estas plantas presentan una acción suave y cuantitativamente inferior a la de los diuréticos de síntesis. (LÓPEZ, s.f, p. 1-4)

Se sabe que muchos de los principios activos de naturaleza química de una sola planta son los que ejercen la actividad diurética, pero no se sabe cuantitativamente la acción de cada uno de estos a la totalidad de la acción diurética de la droga.

Los principales principios activos que pueden intervenir en la acción diurética son aceites esenciales, flavonoides, saponósidos y sales de potasio.

El mecanismo de acción puede ser causado por flavonoides, aceites esenciales, saponósidos, etc, los cuales posiblemente actúen en el glomérulo con más frecuencia que en el túbulo, provocando acuarenesis que es un incremento en la formación de orina consecuencia de una circulación renal y tasa de filtración glomerular aumentada.

Sin embargo, las sales de potasio podrían producir un efecto diurético gracias a un proceso osmótico. (LÓPEZ, s.f, p. 1-4)

Para ser eficaces, las plantas diuréticas deben ser dosificadas de manera correcta. Por lo general, la dosis es demasiado débil, por lo que el efecto es muy reducido, incluso inexistente en algunos casos. Cuando se dosifican correctamente las plantas, los efectos se mantienen de manera muy neta, la frecuencia de las micciones aumenta netamente, así como las cantidades eliminadas. Para encontrar la dosis óptima hay, pues, que aumentar las dosis medias sugeridas hasta la obtención de los efectos anhelados.

Las plantas diuréticas han de tomarse al menos tres veces al día, a fin de que los riñones de vean sostenidos en su trabajo durante toda la jornada.

Las tomas deben extenderse de cuatro a seis semanas aproximadamente, y renovarse más tarde, tras una pausa de una o dos semanas. También es recomendable cambiar de una cura a otra, y a veces en el curso de la cura, porque el organismo tiende a habituarse a las plantas y no reaccionar ya tan fuertemente a su estímulo.

Al igual que los alimentos, estas plantas pueden también contener ácidos y estar contraindicadas para personas que padecen una debilidad metabólica (cola de caballo principalmente).

Preparadas en forma de infusión, las plantas diuréticas presentan la ventaja de aportar líquido, además de su efecto diurético propio. Sin embargo su preparación exige cierto tiempo, y a no todo el mundo necesariamente le gusta beberlas. Felizmente, los comprimidos de plantas o las tinturas madres son alternativas igualmente válidas. Son por otra parte más prácticas de utilizar. (VASEY, 2001, p. 154-155)

1.4. Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*)



Fotografía 1-1: *Chuquiraga jussieui* J.F.Gmel.

Fuente: BOLAÑOS, 2014.

1.4.1. Descripción botánica

Es un ejemplar propio de los páramos, es un arbusto que llega a medir hasta 1,5 m de alto. Sus hojas son alternas, miden hasta 1,2 cm de largo, se caracterizan por ser duras y punzantes. La inflorescencia tiene cabezuelas vistosas de hasta 5 cm de largo, son muy compactas, con

brácteas punzantes de color anaranjado. Las flores (20–45) son delgadas, de color amarillo o anaranjado, de 20 mm de largo. El fruto con una corona blanco.

Su nombre común es Chuquiragua, es un tipo de arbusto bajo, densamente ramoso, conformado por varias matas hemisféricas de alrededor de 15 a 30 cm de altura. Sus ramas juveniles son crasamente hojosas, de característica seríceo-pubescentes.

Presentan nervadura uninervada, cabezuelas discoides, solitarias en el ápice de las ramas; involucre anchamente turbinado, multiseriado con brácteas imbricadas en 5–10 series, las exteriores largas y reduciéndose hacia adentro, espinicentes café- anaranjadas; receptáculo plano, pubescente.

Sus flores son perfectas, presentan de 12 a 45 corolas tubulares, 5 partidas en el ápice, densamente barbadadas, amarillas o blanquecinas; 5 estambres, anteras con apéndices basales largos, apéndices apicales linear-lanceolados, agudos; ramas del estilo glabras, cortamente bifidas. Aquenios turbinados, villosos o hirsutos; vilano de cerdas plumosas, uniseriadas. (ORQUERA, 2013, p. 6)

1.4.2. Taxonomía

La *Chuquiraga jussieui* pertenece a la familia *Asteraceae*, subfamilia *Barnadesioideae*, también denominadas compuestas por la inflorescencia que poseen, en forma de *estrella*. Es la familia de las Angiospermas con mayor diversidad y riqueza biológica, llegando de esta manera a integrar hasta el 10% de la flora vernácula. (ORQUERA, 2013, p. 5)

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de la Chuquiragua

Nombre: *Chuquiraga jussieui*

Género: *Chuquiraga*

Familia: *Asteraceae*

Orden: *Asterales*

Clase: *Magnoliopsida*

División/Phylum: *Tracheophyta*

Reino: *Plantae*

Fuente: ORQUERA, 2013.

1.4.3. Distribución geográfica y origen de la especie

El género Chuquiraga consta de 20 especies distribuidas en los Andes desde el suroeste de Colombia hasta el centro de Chile y en casi toda la Patagonia, en Argentina, donde se encuentra el mayor número de especies. En el Ecuador están representadas 2 especies siempre sobre los 3000 m.s.n.m: *Chuquiraga arcuata* Harling y *Ch. jussieui* J.Gmelin. (ORQUERA, 2013, p. 8)

1.4.4. Usos medicinales

Se la emplea en tratamientos a manera de infusión para la próstata en conjunto con otras especies de tipo medicinal como la Cashamarucha (*Xantium catharticum*) y Cuyicasha. De igual manera se la emplea para infecciones estomacales y para el tratamiento de problemas hepáticos debido a la acción diurética que posee. (ORQUERA, 2013, p. 8)

Según la tradición popular de la planta se usan las hojas y tallos mantenidos en etanol, para tratar reuma, fiebre e inflamación. La resina como cataplasmas en cardenales, heridas y el alivio de dolores producidos por luxaciones y fracturas. La infusión o decocción de partes aéreas también se utilizan para el tratamiento de heridas superficiales, úlceras y como un antipirético.

También se le han reportado en estudios experimentales, efectos tales como: antioxidante, antiinflamatorio, antibiótico. (DUEÑAS, 2014, p. 80). Usada para curar afecciones respiratorias como resfríos, gripe, tos y alternativamente para dolor de huesos y músculos; como antiséptico en afecciones de las vías urinarias, febrífuga y tónica; externamente se utiliza para lavados vaginales, en caso de inflamaciones e infecciones.

Parte utilizada: Ramas finales con hojas y flores.

Toxicidad: No toxica

1.4.5. Principios activos

Alcaloides, triterpenos, esteroides sequiterpenos, saponinas, flavonoides, taninos, resinas, minerales como potasio, calcio, fosforo, azufre y silicio. ("LISTA DE LAS ESPECIES," s.f)

1.5. Análisis químico de plantas medicinales (PM)

1.5.1. Introducción

Para este análisis de PM se necesita tomar una parte de la planta y analizar la estructura química y composición de la misma. Actualmente es necesario realizarla para saber la calidad en el empleo de una patología como medicamento fitoterapéutico así también en propiedades farmacéuticas. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

A continuación tenemos las etapas del proceso para la obtención y análisis de PM:

- A partir de la materia prima obtenemos la muestra, la misma que puede ser entera, pulverizada, aceite esencial, troceado o extracto para su posterior análisis.
- Determinar en la materia prima el: contenido en humedad, residuo seco, cenizas totales, etc.
- De la fracción volátil obtención y análisis de sustancias como aceites esenciales.
- De las fracciones no volátiles obtención y análisis de: elementos minerales, nutrientes, extractos.
- Análisis cualitativo y cuantitativo (físico – químico)
- Análisis de resultados. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

1.5.2. Obtención de la muestra

Se recolecta la materia prima en la época que se elija, esta puede ser antes, durante o después de la floración. Dependiendo de qué principio activo se desee estudiar se recolecta una muestra completa de raíces, tallos hojas, flores.

Dejamos secar la planta al ambiente hasta obtener un peso constante y procedemos a separar las partes de la planta tales como tallos, hojas y flores, pesando cada submuestra. Se trocea la planta a mano en muy pequeños trozos o se tritura en molinillo en caso de poseerlo.

Los principios activos de los aceites esenciales se encuentran en la fracción volátil de la planta, mismos que se obtienen por técnicas de destilación, en donde los principios activos son volatilizados por el calor y se recogen al condensar en frío.

Por otro lado los extractos están en la fracción no volátil, estos son inestables a la temperatura y por ende no pueden ser volatilizados, quedando de lado la destilación, a estos se los obtiene por técnicas de extracción. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

1.5.3. Ensayos morfológicos, anatómicos y organolépticos

Estos ensayos ayudan a identificar a la planta, saber cuáles son las condiciones para una buena conservación y darnos cuenta si existe alguna adulteración o imitación.

1.5.3.1. Análisis organoléptico

Dentro del análisis organoléptico tenemos características como el olor, sabor, olor y textura las cuales detallaremos a continuación:

Olor

El olor puede tener diversas apreciaciones como: alcanforado, a, nauseabundo, desagradable, aromático, a especia, aliáceo, etc. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

Color

La parte de la planta que se va a tratar puede dar una idea del color que posea la muestra (troceada o pulverizada, homogénea o no homogénea), como, “por ejemplo, el color verde indica que el polvo procede de hojas o partes aéreas, el marrón de cortezas, tallos y raíces, y el blanco de féculas y gomas”. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

Sabor

Aromático, salino, ácido, amargo, astringente, dulce, punzante, nauseabundo. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

1.5.4. Ensayos físico-químicos cualitativos y cuantitativos

Estos ensayos se lo pueden realizar a la droga que puede estar entera, en polvo o en extracto, estos pueden ser cualitativos o cuantitativos, ya que no ayudan a saber de qué está compuesta la planta, así como analizar sus principios activos y detectar posibles falsificaciones. Los ensayos

cualitativos identifican sustancias, los cuantitativos nos da una idea de la concentración de los componentes. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

Entre los ensayos cuantitativos tenemos los siguientes:

- Humedad
- Cenizas
- Residuo seco
- Materia extraíble
- Parámetros físicos: densidad, poder rotatorio, índice de refracción
- Índices químicos: acidez, saponificación, sobre todo para aceites esenciales
- Índices de hinchamiento para mucílagos
- Índices de espuma para saponinas
- Contaminantes. Metales pesados, plaguicidas, aflatoxinas”. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

A continuación tenemos los ensayos cualitativos:

- Reacciones de identificación: estas reacciones sirven para identificar diferente componente de la planta como pueden ser alcaloides, flavonoides, cumarinas, etc. Estas son de precipitación, coloreadas, microsublimación, de fluorescencia, etc.
- Métodos cromatográficos: Estos métodos nos ayudan a separar los componentes presentes en extractos, aceites, esencias, etc.
- Métodos espectroscópicos: Ayudan a identificar sustancias presentes en extractos. (BERMÚDEZ, 2009, p.108-115)

1.6. Metabolitos primarios y secundarios

Los vegetales poseen numerosos componentes en su estructura, los cuales sin lugar a duda son importantes para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de las plantas. Tales componentes son de diversa naturaleza química, los cuales se les clasifica en dos grandes grupos: orgánicos e inorgánicos. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

Los **componentes inorgánicos** más importantes son los minerales y el agua. El agua, de acuerdo a la parte de la planta y a la especie se encuentra en cantidad variable así, las hojas y los tallos contienen más cantidad de agua, hasta un 80% en unos casos, en tanto que las semillas contienen menos cantidad.

Los minerales pueden presentarse en varias formas como sales solubilizadas (cloruros, nitratos, fosfatos, etc.), sales cristalizadas (carbonato cálcico, oxalato cálcico, etc.), también se encuentran oligoelementos (magnesio, hierro, manganeso, flúor, etc.). Los minerales se encuentran mezclados con las sustancias orgánicas dentro de las especies vegetales. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

Incluyendo a los **componentes orgánicos** podemos mencionar tanto a los metabolitos básicos o primarios relacionados con el metabolismo esencial celular y los metabolitos secundarios que no están necesariamente relacionados con el metabolismo esencial pero son responsables en su mayoría de la actividad terapéutica de las drogas vegetales, los más importantes se resumen en la tabla. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-16)

Tabla 2-1: Metabolitos primarios y secundarios de vegetales.

Metabolitos vegetales primarios	Metabolitos vegetales secundarios
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Glúcidos ✓ Lípidos y grasas ✓ Aminoácidos ✓ Ácidos nucleicos ✓ Proteínas ✓ Compuestos nitrogenados (enzimas, glucósidos cianogénicos) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Derivados Fenólicos: ácidos fenólicos, fenoles simples, taninos, cumarinas, lignanos, flavonoides: antocianinas, quinonas. ✓ Isoprenoides: aceites esenciales, terpenos, saponinas, cardiotónicos. ✓ Alcaloides

Fuente: CARRIÓN y GARCÍA, 2010.

1.6.1. Metabolitos secundarios

Las rutas metabólicas básicas que constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, dan lugar a una variada serie de compuestos, algunos de estos son responsables de colores de los vegetales, olores, otros son tienen virtudes culinarias, medicinales o venenosas. Los metabolitos secundarios se depositan en grandes cantidades en las células vegetales o pueden ser expulsados fuera de éstas. Entre los metabolitos secundarios más importantes tenemos: (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.1. Isoprenoides

Se forman a partir de la Acetil Coa a través de la ruta del ácido mevalónico, en donde se añaden unidades de C5, presentan estructuras variadas y pueden encontrarse como tal o formando parte de compuestos más complejos. Los isoprenoides se los puede clasificar de la siguiente manera: (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.1.1. Terpenos

Las estructuras básicas de los terpenos se conocen como unidades de isopreno, ya que los terpenos pueden descomponerse a elevadas temperaturas dando isopreno. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.1.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias volátiles de naturaleza compleja, frecuentemente están asociadas a gomas y a resinas. Estas esencias se localizan exclusivamente en vegetales superiores. Varios aceites esenciales son de origen terpenoide, y solo un pequeño número de ellos contienen derivados aromáticos (bencénicos) mezclados con terpenos. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.1.3. Saponinas

Estas estructuras están formadas por una parte glusídica y una parte no glusídica (aglicón) y se denominan así por sus propiedades jabonosas. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.1.4. Heterósidos cardiotónicos

Están formados por una parte glusídica compuesta por una o varias unidades de azúcar y un aglicón que tiene un núcleo esteroídico (C27 tetracíclico) unido a un anillo insaturado lactónico. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.2. Alcaloides

Los alcaloides originales son de origen vegetal, tienen uno o más átomos de nitrógeno (generalmente en anillo heterocíclico). (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3. *Derivados fenólicos*

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios que contienen un grupo hidroxilo en un anillo aromático, que les confiere una estructura fenólica. Encontramos dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis: La **ruta del acetato** que lleva a la formación de cadenas policíclicas la cual mediante ciclación, dan lugar a compuestos policíclicos aromáticos y la **ruta del ácido shikímico** precursor de una serie de ácidos benzoicos hidroxilados y aminados.

Los compuestos aromáticos en la mayoría de los casos provienen de ésta ruta y suelen formarse por desaminación de aminoácidos aromáticos. A continuación se describen los compuestos fenólicos más importantes, entre ellos tenemos: fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides: antocianinas, etc. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.1. *Fenoles simples*

Se encuentran en las plantas en forma de heterósidos y son poco frecuentes. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.2. *Ácidos fenólicos*

Se pueden encontrar unidos a azúcares (heterósidos) o libres, al unirse tanto con el ácido quínico como con otro ácido fenólico pueden formar ésteres. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.3. *Taninos*

Los taninos tienen un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.4. *Cumarinas*

Las cumarinas son derivados de la benzo- α -pirona, varias de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.5. Lignanós

Estos compuestos poseen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.6. Quinonas

Las quinonas son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, son dicetonas insaturadas que se convierten en polifenoles por reducción. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-13)

1.6.1.3.7. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos, generalmente amarillos, que se encuentran en las sustancias celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de glucósidos de diversos azúcares (glucosa, galactosa, ramnosa o una pentosa) y cuyos aglucones son derivados del núcleo fundamental de la fenilbenzopirona. La unión glucosídica del aglucon y el azúcar suele estar sobre grupos fenólicos situados en las posiciones 7 o 3.

Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas, cuyo papel fisiológico, en ellas, no se conoce bien. Muchos de ellos se hallan en la corteza de los árboles (roble, nogal, morera, etc.) y se han utilizado como colorantes naturales (p. ej. La quercetrina del roble). Otros tienen carácter vitamínico y aplicaciones terapéuticas. . (YÚFERA, 2007, pp. 916-918)

Estructura y nomenclatura

Hay cuatro tipos fundamentales de flavonoides, que derivan de los cuatro núcleos siguientes: flavona, isoflavona, flavonol y flavanona. . (YÚFERA, 2007, pp. 916-918)

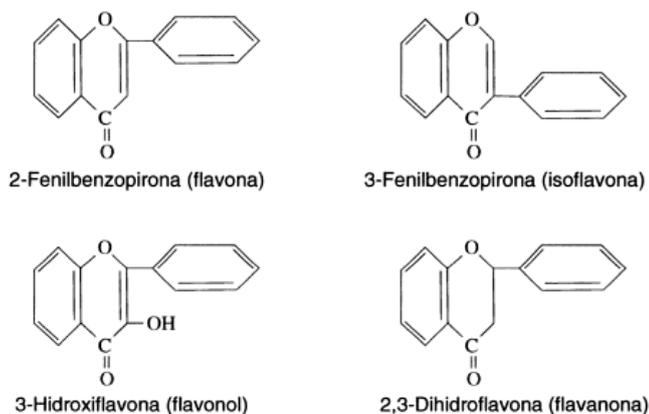


Figura 1-1: Estructuras básicas de los Flavonoides

Fuente: YÚFERA, 2007.

Biosíntesis

La vía del ácido shikímico se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido shikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina.

La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonoliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides.

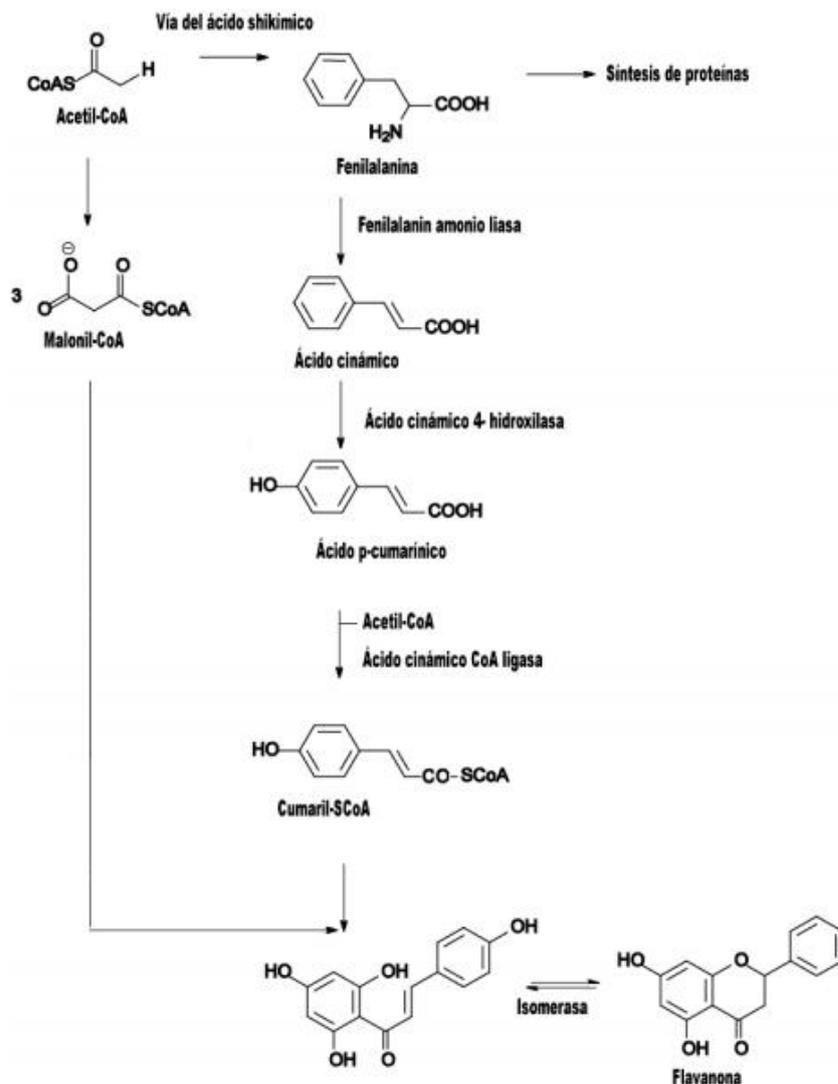


Figura 2-1: Ruta de biosíntesis de los flavonoides en las plantas

Fuente: CARRIÓN y GARCÍA, 2010.

La biosíntesis de los flavonoides se regula mediante dos vías:

- La vía del ácido shikímico que es dependiente de la luz.
- La acción de la fenilalanina amonioliasa, que inicia la vía biosintética de los flavonoides, es también activada por la luz pero depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. Su actividad suele aumentar cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como puede ser la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas, radiaciones UV y el frío. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 10-16)

Propiedades

La mayor parte de los glucósidos flavonoides son sólidos cristalinos, amarillos. Su solubilidad en agua depende de los azúcares que contiene. En general son solubles en alcoholes bajos.

Los grupos fenólicos incluyen en las propiedades; así las geninas son solubles en NaOH y con cloruro férrico dan colores típicos, generalmente violáceos. También son solubles en los ácidos fuertes por el carácter básico que les confieren los átomos de oxígeno del grupo de la pirona, formándose sales de oxonio (sales de pirilio) llamadas en este caso sales de flavilio.

Debido al sistema de dobles enlaces conjugados, tanto las flavonas como los flavonoles son de color amarillo, mientras que las flavanonas (hidroflavonas) son incoloras, puesto que al estar conjugado el enlace que existía entre los átomos de carbono 2 y 3, queda interrumpida la conjugación.

Actividad terapéutica

Los flavonoides poseen las siguientes propiedades farmacológicas: antihemorrágicos, protectores de la pared vascular, antiarrítmicos, antimicrobianos, antiinflamatorios, antihepatotóxicos, diuréticos y antiurémicos, antiespasmódicos, etc. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: p. 22)

Algunos flavonoides de interés

• Glucósidos de oxiflavonas

Apiína: se encuentra en las hojas y semillas del perejil (*Apium petroselinum*), en el apio (*Apium graveolens*) y en la dalia amarilla, etc. Se disuelven en agua caliente o alcohol, dando soluciones fuertemente dextrógiras. La hidrólisis por ácidos minerales de glucosa, apiosa y apigenina.

La apíina es un glucósido de la apigenina.

- **Glucósidos de oxiflavonas**

Genistina: Pigmento amarillo de las hojas y pétalos de las especies de retama y afines. Su hidrólisis ácida da genisteína y glucosa que, en el glucosido intacto, se encuentra unida a la posición 7 de la genisteína.

- **Glucosidos de oxiflavonoles**

Quercetrina: Se encuentra en muchos vegetales y, abundantemente, en la corteza de los robles (*Quercus*). Cristaliza en aguas amarillas. Por hidrólisis ácida de ramnosa y quercetina (aglicón). La quercetina es un 3-ramnósido.

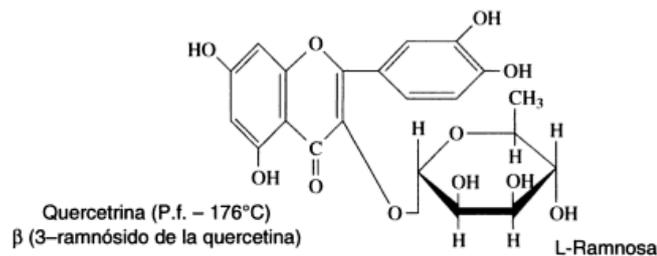


Figura 3-1: Estructura de la Quercetrina

Fuente: YÚFERA, 2007.

Rutina: Descubierta en la raíz de la ruda (*Ruta graveolens*), está muy difundida en el reino vegetal. Industrialmente se obtiene del trigo serraceno (*Fagopyum esculentum*), y cristaliza en aguas amarillas. Se utiliza, en medicina, contra la fragilidad de los capilares sanguíneos (hemorragias subcutáneas y otras). Por hidrólisis de glucosa, ramnosa y quercetina. Los restos de azúcar están combinados en forma de disacárido rutinosa (6-β-L-ramnósido-D-glucosa), que se une al C-3 de la quercetina.

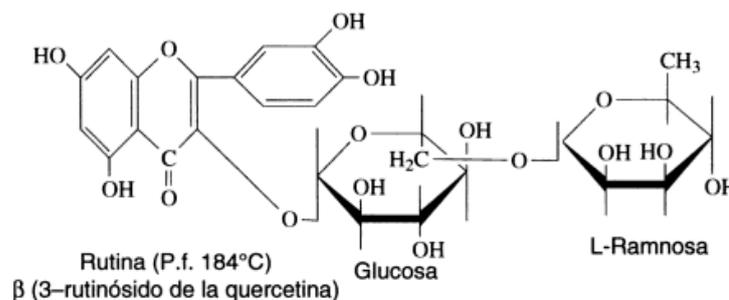


Figura 4-1: Estructura de la Rutina

Fuente: YÚFERA, 2007.

- **Glucósidos de oxiflavanonas**

Hesperidina: Es el glucósido más importante de los que contienen las naranjas. En las pequeñas muy verdes, alcanzan porcentajes muy elevados. Es insípida e insoluble en agua caliente, poco soluble en alcohol y muy soluble en hidróxidos alcalinos. Con cloruro férrico produce un color rojo vivo si está muy diluida y color casi negro a concentraciones elevadas. Por hidrólisis con ácidos diluidos da hesperetina (aglucon) y las manosas glucosa y L-ramnosa. (YÚFERA, 2007, pp. 916-918)

1.7. Extracción

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.7.1. Tipos de extracción

1.7.1.1. Percolación

Es el método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana, USP. Es un método que consiste en que el menstruo (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de menstruo acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.7.1.2. Maceración

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el menstruo constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el menstruo actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular.

Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.7.1.3. Decocción

Llamada también cocimiento, este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de droga más mensturo a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.7.1.4. Infusión

Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5%. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.7.1.5. Digestión

Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60 °C". (Selles, 1992) Al aumentar median amente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos.

1.8. Extractos

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.8.1. Extractos Fluidos

Los extractos fluidos son extractos de drogas que con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.8.2. Extractos Secos

Los extractos secos son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5% (Voigt, 1982).

Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua.

1.8.3. Extractos Blandos

Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan.

1.8.4. Crioextractos

Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70°C. Los crioextractos resultan muy caros, pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies. (CARRIÓN y GARCÍA, 2010: pp. 27-31)

1.9. Preparación de extractos

Para preparar un extracto es importante establecer los parámetros de extracción para así lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal.

En primer lugar debemos conocer la naturaleza química de la materia prima vegetal para determinar las características del metabolito o compuesto químico a extraer. Seguidamente la elección del solvente para definir, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés. (SHARAPIN, 2000, pp. 20-22)

La relación sólido-líquido es la proporción más conveniente de trabajo, será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.

Tamaño de partícula del sólido: de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción como taponamiento de cribas. (VANACLOCHA, 2003, p. 29)

La temperatura es un factor determinante al momento de preparar un extracto, el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstruo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables. (ROSALES, 1994, pp. 75-78).

La velocidad de agitación y tiempo de extracción son parámetros en el que se determina el rendimiento del producto que se sometió a la extracción. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones. (VANACLOCHA, 2003, p. 29)

1.10. Concentración de extractos

Toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el Rotavapor es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores). También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras. (ARRIAGA, 2007, p. 4; MARCANO y MASAHISA, 2002: pp. 29-84)

1.11. Extracto hidroalcohólico

La preparación consiste en pesar 100g de planta fresca y molida se coloca en un matraz de 500mL y se deja macerar con suficiente cantidad de etanol para cubrir completamente la planta. Después se filtra (papel filtro No. 4) o algodón y en un Rotavapor se lleva a sequedad el extracto a 47 °C y a presión reducida. Se pesa el extracto seco y se coloca en un vial bien cerrado, en el refrigerador. (BALLVÉ y NORMA, 2004: pp. 17-18; KOMAITIS, 2005, p. 1190-1195)

1.12. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico consiste en la separación de los componentes que se encuentran en una mezcla compleja, esta se pone en contacto con un líquido o gas que viene a ser la fase móvil y otra fase estacionaria que permanece fija la cual puede ser sólida o líquida. Las sustancias o componentes van a subir a través de la fase estacionaria que va a ser “arrastradas por la fase móvil”, estas viajan a velocidades diferentes dependiendo de la afinidad o solubilidad que tiene una fase con la otra.

Las sustancias van a migrar lentamente cuando son afines a la fase a la fase estacionaria, en cambio van a migrar más rápido cuando son afines a la fase móvil. Si se ajustan bien todos los parámetros cromatográficos se podrá separar de mejor manera todos los componentes.

“Los tres tipos más comunes son la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CGL) y la de líquidos (HPLC)”. (BERMÚDEZ, 2009, p.118)

1.12.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Esta técnica se usa para controlar todo producto natural. Se basa en la preparación de una capa, uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, así las sustancias que migran más rápido van a ser los menos polares.

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa esta se saca y se visualiza. La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como Rf (rate factor).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

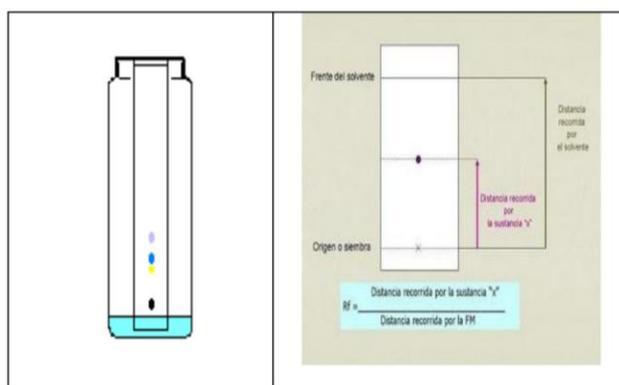


Figura 5-1: Cromatografía en Capa Fina

Fuente: (file:///C:/Users/SYSTEMarket/)

La búsqueda del eluyente requiere probar con varios disolventes de diferente polaridad o con mezclas. Para compuestos poco polares, que se desplazan con mucha facilidad, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano y en el caso de compuestos de polaridad media, mezclas de hexano y acetato de etilo.

La mayoría de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los componentes activos a la luz ultravioleta (254 nm). En el caso de componentes que no absorban a la luz ultravioleta, la visualización requiere utilizar un agente revelador. El revelador reacciona con los productos proporcionando productos coloreados.

1.12.2. Cromatografía en columna

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánico a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema.

Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención. El adsorbente más utilizado para cromatografía de columna es gel de sílice, aunque también se puede emplear alúmina y florisil. (“INTRODUCCIÓN,” s.f)

1.13. Métodos espectrofotométricos

Estos métodos se utilizan más cuando no se está seguro de los análisis previamente realizados para caracterizar principios activos como son la cromatografía, espectros de masa. Entre métodos estos tenemos: al espectro infrarrojo, espectro ultravioleta y de resonancia magnética nuclear. (BERMÚDEZ, 2009, pp.119-120)

1.13.1. Espectro infrarrojo

El espectro infrarrojo detecta la presencia de grupos carbonilo, anillos aromáticos, hidroxilo, dobles enlaces C=C, entre otros. Se necesita nada más que una gota del extracto o componente en una celda de NaCl y se procede a introducir en el espectrofotómetro, así nos da como resultado un espectro. El Espectro IR de una molécula se puede comparar con referencias de espectros que se encuentra en una base de datos, es característico solo de ella y se puede considerar como su “DNI”. (BERMÚDEZ, 2009, pp.119-120)

1.13.2. Espectro ultravioleta

El espectro ultravioleta detecta grupos funcionales y cromóforos que son grupos que absorben en UV como el limoneno presentando un máximo de 262 nm de absorción.

El espectrofotometría UV es limitado en cuanto a la detección de aceites esenciales terpénicos, ya que pocos de estos poseen grupos cromóforos. Sin embargo existen aceites esenciales característicos en la porción no volátil de los cítricos que pueden ser particular en el UV ya que está compuesto de carotenoides o con núcleos oxigenados heterocíclicos como furocumarinas sustituidas, cumarinas y polimetoxiflavonas.

Estas características son útiles para técnicas en las que se necesite evaluar la calidad y genuinidad, la tecnología que se emplea para su extracción, la época de producción e identificar el origen geográfico del aceite. (BERMÚDEZ, 2009, pp.119-120)

1.14. Animales de laboratorio para experimentación y enseñanza

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles.

Estos animales son para el investigador un reactivo biológico, por lo que su pureza debe ser vigilada, controlada y contrastada, al igual que cualquier reactivo, sin descuidar su posible contaminación biótica. Por esta razón se requiere la producción de animales “estandarizados o definidos” con características genéticas y sanitarias definidas, criados en ambientes controlados que respeten los requerimientos de la especie, con el correcto cumplimiento de los principios éticos y de bienestar animal.

Existen legislaciones nacionales y/o institucionales que regulan el uso de los animales de laboratorio. El eje central de estas regulaciones está dado por la aplicación del Principio de las 3 R's formulados por Russel y Burch, en Inglaterra en 1959 y por la constitución de comités institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio quienes tienen como misión evaluar

los protocolos de investigación y asegurar que todos los procedimientos se realicen acorde a las reglamentaciones vigentes.

El objetivo de esta publicación es contribuir a difundir los principios éticos y las buenas prácticas de laboratorio que rigen el uso de los animales de experimentación en las investigaciones biomédicas.

1.14.1. El reactivo biológico

El Animal de laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos” (2,5). El reactivo biológico es un animal estandarizado, lo que significa que tiene una composición genético-sanitaria definida, son criados y mantenidos en ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos para cada especie, los cuales garantizan, además el bienestar animal.

1.14.2. El principio de las tres r's como imperativo ético y de calidad

En 1959 William Russell y Rex Burch, en Inglaterra definen claramente las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con animales: las tres “Rs”: Reducir, Reemplazar y Refinar. Estos son los fundamentos para una racional e inteligente estrategia para minimizar el uso de animales y las causas de dolor y de estrés.

Los proyectos de investigación que requieren el uso de animales de laboratorio deben ser realizados con el número mínimo (**reducir**) necesario de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos.

Los procedimientos in vivo deben ser **reemplazados** siempre que sea posible por métodos alternativos que no usen animales vivos, como modelos matemáticos, simulación por computador, test serológicos, cultivos celulares y sistemas biológicos in vitro.

El **refinamiento** involucra fundamentalmente la estandarización según parámetros internacionales: definición genético-sanitaria y la calidad del ambiente donde son criados y mantenidos los animales antes y durante la experimentación. (HERNÁNDEZ, 2006, pp. 252-256)

1.14.3. Rata *Rattus norvegicus*

Rattus norvegicus, considerado como un miembro bastante grande del ratón, es un animal de experimentación que presenta pelaje áspero y grueso con prominentes orejas y cola prácticamente desnudas; la cola es más corta que la longitud del cuerpo. En promedio, estas ratas llegan a medir 400 mm de nariz a cola, su peso varía de 140 a 500 g.

Los machos son generalmente más grandes que las hembras, en general su coloración es café o gris oscuro en las partes superiores, con pelos negros alternados y un color más claro grisáceo en el vientre, varias cepas criadas en cautiverio pueden ser de color blanco, marrón o negro. (ÁLVAREZ, 2005 y ARMITAGE, 2004; citados en CHIMBO, 2014, p. 37)

1.14.4. Información taxonómica

Reino: ANIMALIA

Phylum: CHORDATA

Clase: MAMMALIA

Orden: RODENTIA

Familia: MURIDAE

Nombre científico: *Rattus norvegicus*. (BERKENHOUT, 1769; citado en ÁLVAREZ, 2005, p. 1)

1.15. Bioterio de experimentación

Destinado solamente para alojar animales durante el tiempo que dure un estudio o una investigación. Se debe tener en cuenta que existan instalaciones con barreras sanitarias establecidas para la protección de las personas así como de los animales, con el equipamiento necesario y los procedimientos normativos operacionales correspondientes para dichos fines.

1.16. Técnicas de sujeción y de procedimientos

La habilidad para sujetar animales de laboratorio no se adquiere fácilmente.

Para adquirir la destreza de sujetar animales de laboratorio no es fácil, se necesitan muchas horas de práctica para ser un experto.

A continuación se exponen puntos que nos pueden ayudar a conseguir los resultados esperados.

- Investigar acerca de las técnicas de sujeción de la especie que se desee estudiar, estas pueden ser e films, libros, etc. Observar a profesionales expertos en tales procedimientos.
- Poner de nuestra parte para perder el miedo y ansiedad al tomar al animal, ya que no se podrá trabajar de esta manera, por lo que el animal no estará tranquilo si el manipulador no lo está.
- El animal debe estar correctamente sujetado y relajado para realizar cualquier procedimiento, caso contrario no se podrá llevar a cabo. (MUÑOZ et al., 2010, pp. 6-9)

Si la sujeción es incorrecta podrá causar daño tanto al sujetado como al animal. Cuando el animal ha sido mal sujetado llegan adquirir más miedo cuando esta contactado por un humano. Así también el sujetador que ha sido herido por un animal al no saber cómo sujetarlo apropiadamente, por lo que la próxima vez que lo intente sujetar tendrá más miedo y más probabilidades de ser rasguñado o mordido nuevamente.

Consecutivamente los animales son más difíciles de sujetar al percibir el miedo. Por otro lado sujetar de una manera incorrecta podría causar que este se escape aumentando las posibilidades de sufrir heridas.

Para lograr sujetar animales de laboratorio apropiadamente se necesita observar a personas con experiencia que sepan hacerlo correctamente y practicar hasta conseguirlo, no tan solamente conociendo la teoría. (MUÑOZ et al., 2010, pp. 6-9)

1.16.1. Métodos de inmovilización para rata

El macho es menos nervioso que la hembra, en general son animales dóciles. Primero se debe sacar la rejilla para extraerlo de la jaula, antes de hacer la sujeción los animales deben tener un tiempo fuera de la jaula para que tomen confianza, seguidamente se realiza la sujeción de todo el cuerpo con los cinco dedos suavemente y con firmeza.

La técnica más usada es apoyar la nuca del animal en el borde interno del dedo índice, “si se sujeta con la mano derecha, el dedo pulgar pondrá el miembro anterior izquierdo del animal frente a su hocico, el miembro anterior izquierdo quedará sujeto entre el dedo índice y medial, de manera que la cabeza quede inmóvil”. (MUÑOZ et al., 2010, pp. 6-9)



Fotografía 2-1: Técnicas de agarre y sujeción

Fuente: MUÑOZ, 2010.

1.16.2. Vías de administración para rata y ratón

Las vías de administración más frecuentes son: subcutánea (SC), intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), intramuscular (IM), y esofágica o vía oral (VO).

1.16.2.1. Intramuscular

Se realiza una vez la rata esté sujeta adecuadamente, se introduce la aguja en los miembros superiores, en forma paralela al fémur. Las agujas a utilizarse deben ser de calibre 25 o 27. (MUÑOZ et al., 2010, pp. 6-9)



Fotografía 3-1: Aplicación intramuscular en ratón.

Fuente: MUÑOZ, 2010.

1.16.2.2. Intraperitoneal

Por esta vía el medicamento debe ser aplicado en la cavidad abdominal, esta se divide en cuatro secciones imaginariamente, la inyección se aplica en cualquiera de las secciones posteriores, el animal debe estar inclinado hacia el cráneo, la aguja debe estar en un ángulo de 35° para introducirla evitando así tocar las vísceras causando una peritonitis mortal.



Fotografía 4-1: Aplicación Intraperitoneal en rata.

Fuente: MUÑOZ, 2010.

1.16.2.3. *Subcutánea*

Se toma la piel del dorso o abdomen del animal con los dedos firmemente y se introduce la aguja en un ángulo muy pequeño para realizar la administración.

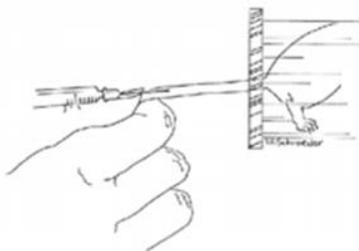


Fotografía 5-1: Vía de administración subcutánea en ratón

Fuente: MUÑOZ, 2010.

1.16.2.4. *Intravenosa*

Para esta administración se necesita de un contenedor mecánico con la cola fuera, para una buena sujeción de la misma y que sea más fácil de trabajar. Luego hay que dilatar las venas de la cola que son tres con agua caliente o xilol. Una vez localizada la vena se introduce la aguja para administrar el medicamento.



Fotografía 6-1: Vía de administración intravenosa

Fuente: FALCONÍ, 2010.

1.16.2.5. Esofágica o VO

Una vez sujetado correctamente al animal manteniéndolo en forma vertical, se introduce la cánula o sonda en el hocico del animal, con movimientos suaves y firmes viendo el movimiento de deglución del animal (se puede sentir el paso de la sonda con el dedo índice de la mano que está sujetando al animal). Cuando ya se administre la dosis requerida se extrae la sonda de forma suave y firme. (MUÑOZ et al., 2010, pp. 6-9)



Fotografía 7-1: Vía de administración oral en ratón

Fuente: MUÑOZ, 2010.

CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar de investigación

La presente investigación se efectuó en: Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Análisis Instrumental y Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. *Material vegetal*

La Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) se recolectó en la parroquia San Juan, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo; a una altura de 3240 msnm, con clima frío y humedad relativa de 0,7-1,88. Se utilizó toda la planta a excepción de la raíz.

2.2.2. *Material biológico*

Se utilizaron quince Ratas Wistar albinas (*Rattus norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH.

2.2.2.1. *Taxonomía*

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Mamalia

Orden: Rodentia

Suborden: Myomorpha

Familia: Muridae

Género: *Rattus*

Especies: *norvegicus*

2.2.2.2. *Descripción anatómica*

Peso: 200 – 300 g

Edad: 3 meses

Sexo: Machos y hebras

Lugar de nacimiento: Bioterio de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2.2.3. *Condiciones ambientales*

Humedad relativa: 55% \pm 10

Temperatura: 21°C \pm 2

Períodos luz oscuridad: 50% c/uno

2.2.3. *Materiales de laboratorio*

- Algodón
- Aspersor
- Bebederos
- Balones aforados de 10, 25 y 100 ml
- Balón esmerilado de 100 ml
- Bandejas de papel aluminio
- Cámara cromatográfica
- Cámara fotográfica
- Canasta para pesaje de reactivos biológicos
- Cánula orogástrica
- Capilares
- Capsulas de porcelana
- Cuba de vidrio
- Crisoles de porcelana
- Embudo
- Espátula
- Embudo Buchner
- Envases estériles de orina
- Frascos ámbar

- Fundas rojas y negras para los respectivos desechos
- Gradilla para tubos
- Guantes
- Jaulas metabólicas
- Jaulas para ratas
- Jeringas de insulina
- Jeringa 5 ml
- Kitasato
- Mortero con pistilo
- Material de aseo en general
- Mangueras
- Mandil
- Mascarilla
- Pinza para crisol
- Pinza para tubo
- Placas con sílica gel
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Pizeta
- Picnómetro
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Pera de succión
- Probeta de 10 y 50 mL
- Reverbero
- Trípode
- Tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vidrio reloj
- Vasos de precipitación de 50, 100 y 250 ml
- Vaselina

2.2.4. Equipos

- AVL 9180
- Balanza analítica ADAM
- Balanza técnica BOEHCO

- Bomba de vacío GAST
- Cámara fotográfica NIKON
- Desecador
- Estufa de aire caliente MEMMERT FANEM
- Espectrofotómetro HELYOS β
- Mufla SNOL
- Molino
- pH-metro HANNA
- Refractómetro BAUSCH & LOMB
- Refrigeradora KELVINATOR
- Rotavapor HEIDOLPH

2.2.5. *Reactivos*

- Agua destilada
- Alcohol al 96°
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Ácido fórmico
- Acetona
- Amonio 5 %
- Cloroformo
- Éter dietílico
- Furosemida 20 mg / kg
- Hidróxido de sodio 1 M
- Limaduras de Mg
- Reactivo de Baljet
- Reactivos de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Sudan III
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Fehling
- Solución salina 0.9 %

2.3. Métodos y técnicas

2.3.1. Control de calidad de la droga vegetal

Dentro del control de calidad del material de origen vegetal tenemos los ensayos físico-químicos cuantitativos que permiten valorar la droga vegetal, las técnicas básicas que se debe realizar son:

- Determinación de Humedad
- Determinación de Cenizas Totales
- Determinación Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico
- Determinación de Cenizas Solubles en Agua

2.3.1.1. Determinación del contenido de humedad

Fundamento: El ensayo de contenido de humedad se entiende como la eliminación del agua libre que contiene el material vegetal después de ser desecada en una estufa. Este debe ser inferior al 10 % para asegurar una buena conservación, expresar la valoración de principios activos en cuanto a materia seca. (CASTILLO, 2007, p. 57)

Procedimiento: De la especie vegetal se pesa 2 g a 5 g con desviación permisible de 0,5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante; seguidamente se deseca a 105 °C durante 3 horas. La cápsula se coloca en el desecador, donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1h, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante. El ensayo se realizó por triplicado.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a al siguiente formula:

$$\%H = \frac{M2 - M}{M2 - M} * 100$$

Dónde:

% H = pérdida de peso por desecación (%).

M2 = Masa de la cápsula con la muestra del ensayo (g).

M1 = Masa de la cápsula con la muestra del ensayo desecada (g).

M = Masa de la cápsula vacía.

100 = Factor matemático. (ARRIAGA, 2007, p. 4)

2.3.1.2. *Determinación de Cenizas Totales*

Fundamento: El método de cenizas totales está diseñado para medir la cantidad total de materia que queda después de la ignición. Esto incluye tanto a las “cenizas fisiológicas”, que proceden del tejido mismo de las plantas, como a las “cenizas no fisiológicas”, que son el residuo de la materia extraña (ejemplo arena y tierra) adherida a la superficie de la planta. (ARRIAGA, 2007, p. 4)

Procedimiento: Se coloca 2.0 g de muestra en un crisol de porcelana previamente tarado, a una temperatura no mayor de 450 °C hasta que esté libre de carbón, enfriar y pesar. Si no se puede obtener una ceniza libre de carbono de esta manera, añadir agua caliente a la masa quemada y recoger el residuo sobre papel filtro libre de cenizas, incinerar el mismo junto con el papel, luego añadir el filtrado, evaporar a sequedad e incinerar a una temperatura no mayor de 450 °C.

Se lleva el crisol a un desecador para que se enfríe y se pesa, el proceso se repite hasta que dos pesos sucesivos no difieran más de 0,5 mg por gramo (masa constante).

Los intervalos de calentamiento y pesaje deben ser de 30 minutos para poder obtener una masa constante. Para que el residuo no presente trazas de carbón, en caso de que los tenga, hay que añadir ácido nítrico concentrado, gotas de solución de peróxido de hidrógeno o solución de nitrato de amonio al 10 % m/v y calentando hasta que los componentes se evaporen. Una vez enfriado el crisol el residuo toma una coloración blanco o casi blanco. El ensayo se realizó por triplicado.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a la siguiente fórmula:

$$\%Ct = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Dónde:

Ct = Cenizas totales (%)

M = Masa del Crisol vacío (g)

M1 = Masa del Crisol con la Muestra (g)

M2 = Masa del Crisol con la Muestra carbonizada (g)

100 = Factor matemático.

2.3.1.3. *Determinación de las Cenizas Solubles en Agua*

Se añade 15 a 20 mL de agua a las cenizas totales obtenidas anteriormente, se tapa y calienta en la llama del mechero por 5 minutos suavemente. La solución se filtra con papel filtro libre de cenizas.

Tanto el filtro como el residuo se transfieren al crisol inicial, carbonizamos en el mechero e incinerar en una mufla a 700 °C -750°C por 2 horas. Seguidamente lo colocamos en el desecador hasta temperatura ambiente y se pesa. Repetir el procedimiento hasta obtener un peso constante.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a al siguiente formula:

$$\%Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} * 100$$

Dónde:

Ca = Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M = Masa del Crisol vacío (g)

M1 = Masa del Crisol con la Muestra (g)

M2 = Masa del Crisol con las cenizas totales (g)

Ma = Peso del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

100 = Factor matemático (2)

2.3.1.4. *Determinación de las Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico*

A las cenizas totales obtenidas se le añade de 2 a 3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Se lava el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro, se lava el residuo con agua caliente hasta que al añadirle al filtrado acidulado con ácido nítrico: 1 o 2 gotas de nitrato de plata 0.1Molar para que no muestren presencia de cloruros.

El papel filtro con el residuo se desecó de 100 a 105 °C., transferimos al crisol inicial e incineramos en una mufla a 700 -750 °C de temperatura por 2 horas. Seguidamente se coloca en un desecador hasta que alcance temperatura ambiente y se pesa. Repetimos el procedimiento hasta obtener un peso constante.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a al siguiente formula:

$$\% Cac = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Dónde:

Cac = Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada

M = Masa del Crisol con la porción de ensayo (g)

M1 = Masa del Crisol con la Muestra (g)

M2 = Masa del Crisol con las cenizas residuales (g)

100 = Factor matemático. (CÁCERES, 1999, pp. 322-324)

2.3.2. *Obtención del extracto de la chuquiragua (Chuquiraga jussieui)*

En un recipiente de vidrio con su respectiva tapa, transferir la planta Chuquiragua troceada (usar molino preferiblemente) y pesada, humedecer directamente con etanol al 96 % cubriendo toda la planta. Macerar durante 48 horas.

A las 48 horas filtrar el contenido con un embudo previamente colocado algodón o papel filtro colocando el extracto en un balón desmerilado (previamente tarado) para próxima concentración. El residuo obtenido de la planta macerar nuevamente con alcohol durante 1 hora para posteriormente someterlo a un nuevo filtrado para extraer todo el colorante posible de la planta.

Al filtrado llevarlo a concentración en Rotavapor hasta eliminación del alcohol. Envasar el extracto de la Chuquiragua en un recipiente ámbar para evitar al contacto directo con la luz.

2.3.3. *Control de calidad de los extractos*

2.3.3.1. *Determinación de los requisitos organolépticos*

Determinación del olor

Tomamos una tira de papel filtro de 10 cm de largo por 1 cm de ancho aproximadamente e introducimos en la muestra de ensayo. Lo olfateamos y determinamos el olor característico de la muestra.

Determinación del color y aspecto

En un tubo de ensayo previamente limpio y seco llenamos hasta 2 cm con la muestra a analizar, observamos el color, la presencia de partículas, transparencia y separación en capas, se registran los resultados.

Determinación del sabor

Se colocó una pequeña cantidad de muestra en el borde de la palma de la mano o en el dedo índice e inmediatamente al contacto con la punta de la lengua se realiza la identificación de su sabor.

2.3.3.2. *Determinación de la densidad relativa*

Fundamento: Se entiende como densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso no específico.

Procedimiento: Se pesó el picnómetro vacío y seco, posteriormente a ello se llena con la porción de ensayo y mantenemos a temperatura ambiente, si es preciso, con una tira de papel extraemos el exceso y secamos exteriormente el picnómetro. Se procede a pesar cuidadosamente el picnómetro con la porción del ensayo y se repite la operación con agua destilada después de limpiar el picnómetro. (ARRIAGA, 2007, pp. 2-24)

Los resultados son expresados mediante la siguiente fórmula:

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Dónde:

M1 = peso del picnómetro con la muestra (g)

M2 = peso del picnómetro con agua (g)

M = peso del picnómetro vacío (g)

Los resultados se aproximan hasta la tercera cifra. (CASTILLO, 2007, p. 63)

2.3.3.3. *Determinación del índice de refracción*

Fundamento: El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente. (CASTILLO, 2007, p. 69)

Procedimiento: Así se procedió a medir la muestra directamente en el refractómetro a una temperatura ambiente, observando la escala que trae el equipo para expresar el resultado. Se realizó por triplicado y se calcula el promedio de las mismas.

2.3.3.4. *Determinación del pH del extracto*

Fundamento: La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar

la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$pH = -\log a [H^+]$$

Donde, a [H⁺] = actividad de los iones hidrógeno.

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura del pH en la escala de un instrumento medidor de pH. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo. (CASTILLO, 2007, p. 63)

Procedimiento: Ajuste el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra.

2.3.4. Preparación de extractos y tamizaje fitoquímico

Preparación de extractos

Para determinar los metabolitos secundarios primero se obtiene los extractos con los solventes adecuados.

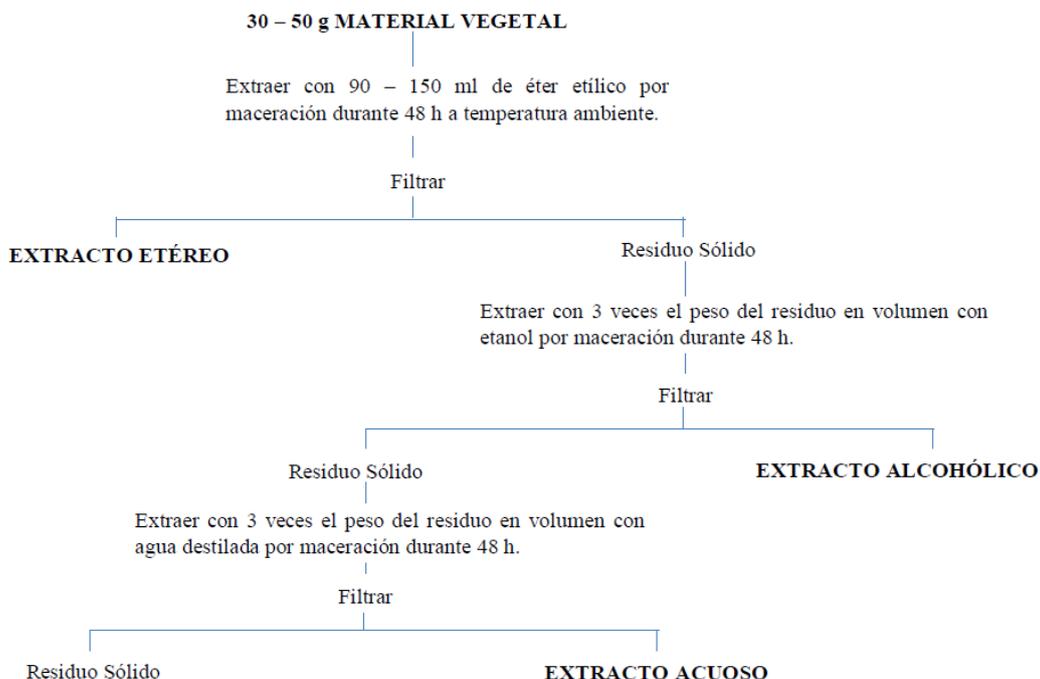


Figura 6-2: Esquema para preparación de extractos.

Fuente: GAIBOR, 2013.

Una vez obtenidos los extractos fluidos se les realizaron diferentes ensayos con reacciones químicas de identificación, mediante cambios de color o formación de precipitados.

Tamizaje fitoquímico

Para el tamizaje fitoquímico se realizan reacciones de coloración y precipitado en diferentes extractos como se muestra a continuación:

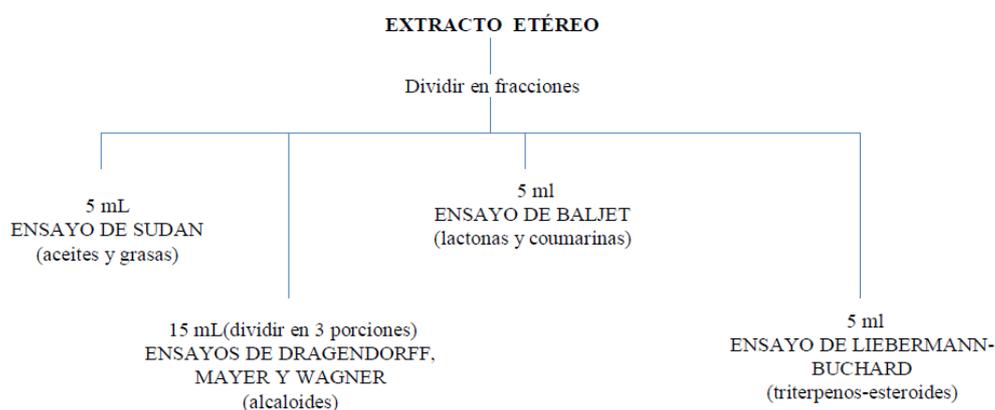


Figura 7-2: Esquema para las reacciones en extracto etéreo.

Fuente: GAIBOR, 2013.



Figura 8-2: Esquema para las reacciones en extracto alcohólico.

Fuente: GAIBOR, 2013.

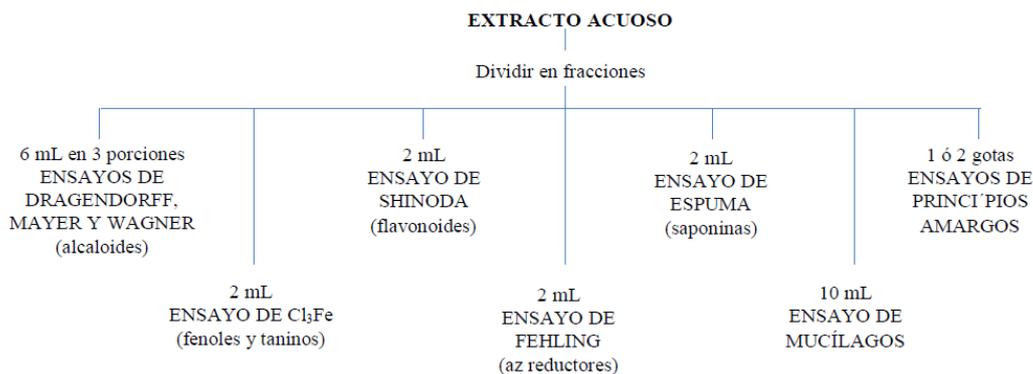


Figura 9-2: Esquema para las reacciones en extracto acuoso.

Fuente: GAIBOR, 2013.

Ensayo de dragendorff

Nos ayuda a determinar la presencia de alcaloides. Si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo, se disuelve en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, calentamos suavemente y se deja enfriar hasta acidez).

Para el ensayo, a la solución acuosa ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa:

Opalescencia: (+)

Turbidez definida: (++)

Precipitado: (+++)

Ensayo de wagner

Se procede de la misma manera descrita anteriormente, partiendo de la solución ácida. A esta solución ácida, se le añade 2 o 3 gotas del reactivo de Mayer y se registra los resultados de igual forma que en el caso anterior.

Ensayo de mayer

Igual que en los casos anteriores partimos de la solución ácida. Añadimos a esta solución 2 o 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior.

Ensayo de liberman –buchard

Determina en un extracto la presencia de triterpenos. Para ello, si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo re disolver en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

Rosado –azul muy rápido.

Verde intenso –visible aunque rápido.

Verde oscuro –negro –final de la reacción

Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues esta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

Ensayo de borntrager

Indica presencia de quinonas. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su anterior separación.

El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) , o, rojo para lo cual se reporta (+++)

Ensayo de baljet

Permite reconocer la presencia de Camarinas. Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y re disolverse en 1 ml de alcohol. Seguidamente, se añade 1 ml del reactivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojizo (++ y +++) respectivamente.

Ensayo de sudan iii.

Este ensayo nos ayuda a determinar la presencia de compuestos grasos, cuando un extracto etéreo se evapora a sequedad en presencia de una solución de Sudan III al 0.6 % en glicerina –

agua (1:1), la aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, revela la presencia de Lípidos y/o aceites esenciales.

La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, indica la presencia de Lípidos y/o aceites esenciales.

Ensayo de catequinas

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique una solución de Carbonato de Sodio.

La aparición de una mancha verde carmelita a la Luz UV, indica positiva la prueba

Ensayo de resinas

Para determinar estos compuestos, adicionar a 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada. La presencia de un precipitado, indica un ensayo positivo.

Ensayo de espuma

Permite detectar en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo triterpénica como esteroideal. De manera que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 –10 minutos.

Si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y es resistente por más de 2 minutos el ensayo se considera positivo.

Ensayo del cloruro férrico.

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adiciona 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos.

A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- ✓ Desarrollo de una coloración rojo –vino, compuestos fenólicos en general.
- ✓ Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecolicos.
- ✓ Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos

Ensayo de ninhidrina

Este ensayo nos confirma la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general en los extractos vegetales.

A la fracción disuelta en 1 ml de Etanol se le adiciona 1 ml de solución de Ninhidrina al 5 %. Se calienta en baño de agua de 5 a 10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece una coloración azul o violeta.

Ensayo de shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezcla las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

Ensayo de antocianidinas

Este ensayo ayuda a detectar en los extractos vegetales la presencia de estructuras de secuencia como C6 –C3 –C6 del grupo de los flavonoides. Se calienta 2 ml del extracto etanólico por 10 minutos con 1 ml de HCl concentrado.

Una vez frío adicionar 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Agitar y dejar separadas las 2 fases. Indica un ensayo positivo la aparición de color rojo a marrón en la fase amílica.

Ensayo de fehling

Permite detectar en un extracto vegetal la presencia de azúcares reductores. Para lo cual, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo se disuelve en 1 –2 ml de agua. Se adiciona 2 ml del reactivo y se calienta en baño de agua 5 –10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. (MIRANDA., 2000., pp. 40-60)

2.3.5. *Análisis cromatográfico del extracto de Chuquiraga jussieui.*

Usar el concentrado metanólico para la cromatografía. Aplicar 10uL del concentrado en una placa cromatográfica de sílica gel 60F254 con la ayuda de un capilar y se deja secar después de cada aplicación. Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las $\frac{3}{4}$ partes de la placa. Retirar de la cuba y dejar secar para luego observar en una lámpara de UV 365nm. Revelar la placa y dejar secar, calentar la estufa y anotar los Rf.

Condiciones de ensayo

Adsorbentes: Sílica gel 60F254

Sistema de solventes: Cloroformo-acetona-ácido fórmico (75:16.5:8.5)

Revelador: vapores de sulfato de cerio

Cálculo:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por los solventes}}$$

2.3.6. *Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como rutina*

Fundamento: La presencia de flavonoides presenta una coloración rosada al formar quelatos los cuales son formados cuando el tricloruro de aluminio (AlCl₃) se une con flavonoides ortodihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados en medio básico. Los valores de flavonoides totales son expresados en valores de mg del flavonoide empleado como estándar equivalente por gramo de muestra. (PALOMINO et al., 2009, pp. 1-8)

Procedimiento: El contenido de flavonoides en extracto etanolito fue medido por espectrofotometría UV- visible.

- Tomamos una alícuota de 500 µL de extracto etanólico de *Chuquiraga jussieui* se coloca en un tubo de ensayo con 400 µL de agua bidestilada.
- Se añade 38 µL de NaNO₂ al 5 % p/v, se homogeniza deja en reposo temperatura ambiente por 5 minutos.
- Seguidamente se añadió 38µL de AlCl₃ al 10 % p/v, se agitó, y se dejó en reposo tapado a temperatura ambiente durante 6 min.
- Últimamente se agregó 250 µL de NaOH 1M más 24 µL de agua bidestilada, así completando un volumen final de 1250 µL.
- Fue medida inmediatamente la absorbancia transcurrido el tiempo de reacción a 510 nm en un espectrofotómetro UV – visible. Se realizó el ensayo por triplicado.
- La concentración de flavonoides fue construida empleando una curva de calibración con un estándar de rutina medida a diferentes diluciones.
- Expresamos los resultados como ug de rutina por ml de extracto.
- Se calculó el contenido de flavonoides totales en base a la ecuación de la recta del estándar utilizado, e nuestro caso rutina.

Fórmula: $Y = 0,01228 X + 0,0067$

Dónde:

Y = Absorbancia

X= Concentración de flavonoides

2.3.7. Evaluación de la actividad diurética del extracto de chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*)

Tabla 1-2: Evaluación farmacológica

GRUPOS	ADMINISTRACIÓN	EVALUACIÓN									NÚMERO DE RATAS
		% de volumen de orina excretado en horas						Valoración de electrolitos mEq			
		1	2	3	4	5	6	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	
BLANCO	Suero fisiológico 5 ml										3
CONTROL +	Furosemida 20 mg/Kg										3
TRATAMIENTO 1	Extracto 100 mg/Kg										3
TRATAMIENTO 2	Extracto 200 mg/Kg										3
TRATAMIENTO 3	Extracto al 400 mg/Kg										3
TOTAL											15

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015.

Modelo experimental

Tabla 2-2: Denominación de grupos para la investigación

GRUPOS	REPETICIONES		
G I	R1	R2	R3
G II	R1	R2	R3
GIII	R1	R2	R3
GIV	R1	R2	R3
GV	R1	R2	R3

Fuente: COLOMA, 2015.

Dónde:

GI: BLANCO: suero fisiológico administración de 5ml vía oral.

G II: control positivo (G C +): furosemida en dosis de 20 mg/kg de peso, administración vía parenteral. (PÉREZ et al., 2011: p. 335)

GIII: Tratamiento 1: administración de 5 ml por vía oral de extracto de Chuquiragua a 100 mg/Kg.

GIV: Tratamiento 2: administración de 5 ml por vía oral de extracto de Chuquiragua a 200 mg/Kg.

GV: Tratamiento 3: administración de 5 ml por vía oral de extracto de Chuquiragua a 400 mg/Kg. (MARTÍNEZ et al., 2004: p. 3)

Periodo de ambientación

En este periodo se ambientan según el protocolo de investigación a los animales de experimentación a las condiciones ambientales y de alimentación. También se ambienta al investigador mediante manipulación y adaptación a la técnica que se va a realizar.

Temperatura: 22 °C +/- 2

Humedad: 50 % +/-10

Periodo de fotoluminiscencia: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Alimentación: pellets de balanceado para roedor 15g/100g peso al día y agua ad libitum.

Homologación de pesos: 290 ±5

Periodo de tiempo: 7 días.

Actividad diurética

Para evaluar la actividad diurética utilizamos el método de Naik y Col con modificaciones. Se utilizaron 15 Ratas, con un peso promedio de 200 -300g, machos y hembras, estos fueron mantenidos en cuarentena durante 7 días con libre disposición de alimentos y agua, en condiciones de ambientación adecuadas mencionadas anteriormente.

Las ratas fueron, privados de agua y comida 18 h antes del experimento y durante el mismo. Se realiza la separación aleatoria a los animales y se procede a administrar los tratamientos a diferentes concentraciones de extracto del vegetal (*Chuquiraga jussieui*) por vía oral en un volumen igual a 5 mL; al lote control se administró solución salina en el mismo volumen de 5 mL, al bloque control positivo se administró 5 mL de solución salina por vía oral más una dosis de furosemida 20mg/Kg peso por vía intraperitoneal.

Luego de la hidratación correspondiente se procede a colocar en jaulas metabólicas adaptadas de forma individual para la recolección de orina, se recolecta el volumen de orina cada hora durante un periodo de 6 horas, consecutivamente determinar las concentraciones de Na⁺, K⁺ excretados en el volumen final.

Concluido el experimento se procedió a la eutanasia de los animales mediante anestesia con éter. Se realizó los siguientes cálculos con la media de los datos obtenidos.

- **Porcentaje de Diuresis Respecto al Blanco**

Es la cantidad de orina de cada tratamiento en relación a la orina promedio del blanco.

$$\% \text{ de Diuresis respecto al blanco} = \frac{X - \text{volumen de orina del blanco}}{\text{volumen de orina del blanco}} \times 100$$

Dónde:

X = Volumen de orina del tratamiento X

- **Acción Diurética de los Tratamientos**

Porcentaje de diuresis respecto al grupo control positivo

$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{Excreción urinaria del grupo tratado}}{\text{Excreción urinaria del grupo control}} \times 100$$

- **Excreción Urinaria Volumétrica (E.U.V)**

Es el volumen total excretado en relación al volumen total administrado.

$$\text{Excreción urinaria} = \frac{\text{Volumen total excretado}}{\text{Volumen total administrado}} \times 100$$

(NARANJO, 2013, pp. 47-48)

2.3.8. *Medición de electrolitos Na⁺, K⁺ y Ca⁺²*

La medición de electrolitos lo realizamos con analizador de electrolitos versátil AVL 9180 del laboratorio LACFE-Riobamba. Esta tiene la característica principal de tener electrodos intercambiables, los cuales permiten configurar el equipo en 7 perfiles diferentes. Las son calibraciones completamente automática y rápidas.

El sodio es el mejor catión de fluido extracelular. Sus principales funciones en el cuerpo son químicamente para mantener la presión osmótica y el equilibrio ácido-base y de transmitir los impulsos nerviosos. La función del sodio es a nivel de la membrana celular mediante la creación de un potencial eléctrico entre las diferentes membranas celulares que provocan la transmisión de los impulsos nerviosos y la excitabilidad neuromuscular que se mantengan. (“MANUAL DE OPERACIONES,” s.f)

Método: Análisis por electrodo de ion selectivo

Procedimiento

Trasladar la orina en el recipiente adecuado para el equipo. Levantar la tapa de toma de muestra, esperar a que el analizador aspire la muestra automáticamente y anotar el resultado.

Características para la medición:

- Volumen de muestra: 95 µL
- Tipo de muestra: orina

- Aplicación de la muestra: Jeringas, tubos de recolección, cubetas para muestra o capilares
- Tiempo de análisis: 50 seg
- Temperatura: 15-32°C
- Humedad relativa: 5%-95%

2.3.9. Toxicidad aguda

Se usó este estudio para hacer una valoración estimada y experimental de las propiedades toxicológicas del extracto de la Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) contribuyendo con información acerca de los riesgos para la salud, consecuencias de una exposición a dosis repetida vía oral. Este ensayo se realizó de acuerdo a las técnicas recomendada por Adamaris Saravia.

Se trabajó con un lote de 4 ratas, de 200 a 300 g de peso, con un periodo de ayuno de 24 horas, de 2 a 3 meses de edad las cuales fueron acondicionadas en jaulas individuales, cumpliendo previamente un periodo de readaptación de 3 días. Se alimentó con fórmula peletizada y agua ad libitum, utilizando así una rata como blanco y 3 para los tratamientos (una para cada tratamiento).

Se administró vía oral 5ml de extracto. El periodo de observación fue de 14 días observando la mortalidad y el comportamiento general de los animales tratados. Durante los tres primeros días de administración del extracto se observó cuidadosamente a cada animal a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después de la administración del extracto.

Luego de los tres días la observación se realizó periódicamente cada 24 horas hasta completar 14 días, registrando signos y síntomas de toxicidad como: grito, actividad general, respuesta al toque, irritabilidad, huida, contorsiones patas posteriores, enderezamiento, tono corporal, convulsiones, micción, lagrimación, pilo erección, defecación, número de muertos. Además se tomó el peso de los animales.

2.3.10. Análisis estadístico

Se utilizó el test de ANOVA (Análisis de varianza), que permite comparar las medias de n grupos. Este modelo presupone que las varianzas de los grupos son iguales y que los residuos o errores son aleatorios, independientes e idénticamente distribuidos siguiendo la ley normal con media 0 y desviación constante. La hipótesis nula de la prueba ANOVA de un factor es:

H_0 = las medias de los n grupos son iguales

H_a = Al menos una de las medias es diferente

Esta prueba se basa en la comparación de la suma de los cuadrados medias, debido a la variabilidad entre grupos y a la variabilidad intra grupos. Ambas sumas son estimaciones independientes de la variabilidad global, de manera que si el cociente entre la primera y la segunda es grande, se tendrá mayor probabilidad de rechazar la hipótesis nula.

La hipótesis nula de igualdad de medias se rechaza en el caso que p valor $< 0,05$ caso contrario no hay evidencia suficiente para poder rechazarla.

Con ayuda del test de Tukey nos permite probar todas las diferencias entre las medias de tratamientos de una experimentación, colocando a los diferentes tratamientos en grupos homogéneos o heterogéneos dependiendo el caso, normalmente se trabaja con un nivel de confiabilidad del 95%. (NARANJO, 2013, p. 49)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Control de calidad de la droga vegetal cruda

Para el análisis se recolectó el material vegetal en la parroquia San Juan, provincia de Chimborazo. En el control de calidad realizamos el análisis físico-químico obteniéndose los siguientes resultados:

Cuadro 1-3: Resultados del análisis del control de calidad de la materia prima de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*). Laboratorio de productos naturales. ESPOCH. Mayo 2015

PARÁMETRO	%	LÍMITES (Farmacopea Española 2002)
Humedad	10.95	8-14%
Cenizas totales	2.10	≤ 12%
Cenizas solubles en agua	5.65	≤ 7%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0.9	≤ 5%

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

Según los resultados obtenidos del control de calidad muestra que la planta posee un grado de pureza apropiado.

Para la humedad se obtuvo un porcentaje de 10.95, siendo un valor cercano a otros autores como Dueñas *et al* (2014) 11.66 % mencionando así que el parámetro se encuentra dentro de los límites establecidos por la Farmacopea española (2002) (8-14%). Esto nos puede indicar que la planta tiene una buena conservación de sus principios activos y baja tendencia a contaminación.

En las cenizas totales se obtuvo un valor de 2.10 %, el cual se encuentra dentro del rango normal ≤ 12%, lo que quiere decir que no posee metales pesados en cantidad, ni es una fuente de contaminación. Para las cenizas solubles en agua tenemos un valor de 5.65% que nos indica la calidad de la planta previo a su utilización que es menor al ≤ 7% límite establecido por la Farmacopea. En el contenido de cenizas insolubles en ácido se obtuvo un valor de 0.9% el cual

es muy inferior al establecido por la farmacopea $\leq 5\%$, mostrando así que no hay material orgánico extraño como sálica, tierra o arena.

3.2. Control de calidad del extracto de la Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*)

En el siguiente cuadro se presenta los resultados de los parámetros físico-químicos organolépticos del extracto de la Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Cuadro 2-3: Resultados del análisis organoléptico y físico-químico del extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*). Laboratorio de fitoquímica. Facultad de ciencias. Espoch. Mayo 2015

PARÁMETRO		RESULTADO
Organolépticos	Aspecto	Líquido
	Color	Verde oscuro
	Olor	Característico
	Sabor	Amargo
Densidad relativa (g/mL)		0.854
Índice de Refracción		1.376
pH		4.95
Solidos totales %		6.15

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

Las propiedades organolépticas del extracto hidroalcohólico de la *C. jussieui* fueron característicos de la planta, con un aspecto líquido, color verde oscuro, olor característico y un sabor amargo.

La densidad dio un valor de 0.854, el cual es mayor al del solvente empleado que en nuestro caso fue alcohol al 96% cuya densidad es de 0.789 g/mL, lo cual nos indica que hay sustancias disueltas en el extracto. El índice de refracción fue de 1.376 que es mayor que el agua 1.33, este valor muestra la cantidad de sólidos disueltos el cual es considerable, el contenido de sólidos totales dio 6.15 % mostrándonos así una cantidad alta materia dispersa como residuos orgánicos y metabolitos secundarios.

El pH arroja un valor de 4.95 ligeramente ácido lo cual indica que el extracto se puede conservar bien sin que se degraden los compuestos químicos y evita la proliferación de microorganismos.

Los datos obtenidos comparando con los resultados realizados por Dueñas, et al (2014); un pH de 5,30; los sólidos totales brindaron un valor de 6,28 % la densidad relativa fue de 0,889 y el índice de refracción de 1,256 confirma que los resultados obtenidos de las determinaciones de los parámetros físicos son similares, a excepción del índice de refracción que en nuestro caso fue mayor por el solvente utilizado (etanol 95%).

3.3. Resultados del Tamizaje fitoquímico para la *C. jussieui*

A continuación se presenta los resultados del tamizaje fitoquímico realizados a los extractos etéreos, alcohólicos y acuosos de la Chuquiragua, determinando así la presencia de metabolitos secundarios con cambios de coloración y/o formación de precipitados.

Cuadro 3-3: Análisis cualitativo fitoquímico de los extracto etéreo, alcohólico y acuoso de *Chuquiraga jussieui*. Laboratorio de productos naturales. ESPOCH. Mayo 2015

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYO	EXTRACTO ETEREO	EXTRACTO ETANÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Compuestos grasos	Sudan	++		
Coumarinas	Baljet	++	++	
Alcaloides	Dragendorff	-	++	-
	Mayer	-	++	-
	Wagner	-	++	++
Catequinas	Catequinas		-	
Triterpenos y esteroides	Lieberman –	+	+	
	Buchard			
Resinas	Resinas		+	
Azucres reductores	Fehling		+	-
Saponina	Espuma		+	-
Taninos y fenoles	Cloruro Férrico		+	+
Quinonas	Bortrager		-	
Flavonoides	Shinoda		-	++
	Antocianidinas		+	
	Mucilagos			++
	Principios amargos			+++

Interpretación de la tabla: - No presencia; + Baja evidencia; ++ Moderada evidencia; +++ Alta evidencia; Espacio en blanco significa que no se ha realizado el ensayo.

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

Al efectuar los ensayos de tamizaje fitoquímico se detectó la presencia de flavonoides, saponinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, taninos, alcaloides, azúcares reductores, fenoles, principios amargos y compuestos grasos; comprobando así la alta diversidad de metabolitos secundarios con respuestas positivas presentes en la *Chuquiraga jussieui* lo que demuestra la utilidad dada a esta planta en la cura de numerosas afecciones.

En el extracto etéreo se evidenció la presencia de compuestos grasos, coumarinas que se le puede atribuir la actividad antiséptica, antiinflamatoria, antitumoral entre otras y triterpenos; esta última también se evidenció en extracto alcohólico. No se evidenció la presencia de alcaloides en extracto etéreo, más sí en alcohólico y en acuoso con baja evidencia, a este principio activo se le atribuye la propiedad de repelente, antibacteriana, depresores y como estimulantes.

En el extracto alcohólico a más de los metabolitos mencionados anteriormente encontramos resinas (utilizadas como cicatrizante para heridas y el alivio de dolores y fracturas), azúcares reductores, saponinas, taninos y fenoles; este último también en el extracto acuoso. A los taninos y fenoles se les atribuye la propiedad antiinflamatoria, antidiarreica, astringente, antioxidante, vasoconstrictora, etc.

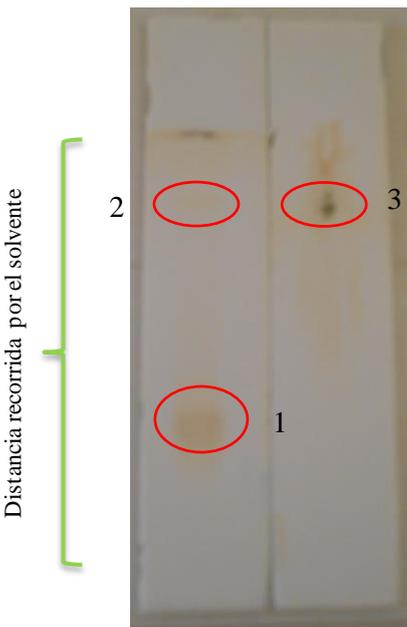
Se evidenció la presencia de flavonoides en extracto acuoso y con baja evidencia en extracto alcohólico, esto pudiera deberse a múltiples causas como forma de cosecha y secado, época del año, variedad de la especie o a que las concentraciones en los extractos pueden haber estado por debajo del límite inferior de detección de los métodos que se emplearon para la determinación de este grupo de metabolitos.

De cualquier manera la evidencia de flavonoides se confirma con lo expuesto en bibliografía de trabajos como Dueñas *et al* (2014, pp. 81) y Castro (1998), a este metabolito se le atribuyen múltiples propiedades, entre ellas la acción diurética, que fue la base para realizar el presente trabajo.

Como vemos en los resultados la mayor cantidad de metabolitos se evidencia en extracto alcohólico ya que es donde está disuelto la mayor cantidad, lo que justifica que es el extracto más utilizado para la extracción de estos en plantas y administración a los animales de laboratorio como la rata en nuestro caso. Esta diferencia entre extractos pudiera explicarse por la desigualdad de polaridad del alcohol con respecto al agua y éter.

3.4. Resultado del análisis cromatográfico (TLC) de flavonoides

Cuadro 4-3: Resultados de los Rf de la cromatografía del extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga jussieui*. Laboratorio de productos naturales. ESPOCH. Mayo 2015

TLC del Extracto Hidroalcohólico	Número de manchas	Cálculo de Rf	Compuesto
	1	$Rf = 1.4 / 6.5 = 0.23$	Rutina
	2	$Rf = 5.3 / 6.5 = 0.82$	Quercetina
	3	$Rf = 5.2 / 6.8 = 0.76$	Kaempferol

Fotografía 8-3: Placa cromatografía del extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*)
Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

En las placas de sílica gel se pudo observar tres manchas de color amarillo y verde, a estas se calcularon los Rf dando como resultado 0.23 para la muestra 1, 0.85 para la muestra 2 y 0.76 para la muestra 3; indicando que el extracto hidroalcohólico presenta similitud con componentes flavónicos como rutina, quercetina y kaempferol, las cuales concuerdan con los estándares expuestos por Wagner (2006) mostrando así una tendencia cromatográfica típica en presencia de solventes y reveladores clásicos para estos compuestos.

3.5. Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como porcentaje de rutina

Para la cuantificación de flavonoides se utilizó rutina como muestra estándar en diferentes concentraciones y medido por espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 510 nm.

Se calculó el contenido de flavonoides totales en el extracto etanólico de *Chuquiraga jussieui* mediante la ecuación de la curva de calibración ($Y = 0,01228 X + 0,0067$) obteniéndose los siguientes resultados.

Cuadro 5-3: Concentración de flavonoides totales expresado en ug de rutina /g de muestra en el extracto de *Chuquiraga jussieui*. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Abril 2015

Absorbancia	Concentración en ppm (μg de rutina /mL de extracto)	Porcentaje de flavonoides totales
0.526	60.18	0.4

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

El resultado del contenido de flavonoides totales en función de la rutina fue de 0.4 %, con una absorbancia de 0.526 y 60.18 μg de rutina/mL de extracto, podemos decir que el porcentaje está dentro de los rangos establecidos por Lock (1994) de 0.1-2% para principios activos presentes en plantas, lo que quiere decir que si posee la cantidad necesaria para la actividad estudiada.

3.6. Evaluación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga jussieui* en ratas (*Rattus norvegicus*)

Para evaluar la actividad diurética se administró el extracto de la *Chuquiraga* a diferentes concentraciones como tratamiento para cada uno de los grupos de ratas a analizar, al grupo control positivo se le administro el diurético furosemida (20 mg/Kg) y al blanco solución salina al 0,9%. Los tratamientos fueron inoculados por vía oral usando una cánula, depositando el extracto directamente en el estómago de la rata. La furosemida se administró vía intraperitoneal (IP) en el grupo control positivo.

Para todos los tratamientos el volumen de administración VO fue de 5 mL.

El ensayo farmacológico tuvo una duración de 6 horas en las cuales se recogió la orina cada hora según la metodología detallada en el capítulo II, realizando la medición del volumen a estos tiempos y obteniendo un volumen total de diuresis al final del ensayo (a las 6 horas) para cada grupo de tratamiento.

Una vez medido el volumen total en una probeta se realizó un promedio de las tres replicas para cada uno de los bloques de tratamiento, los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 6-3: Resultados del promedio del ensayo farmacológico de diuresis a diferentes concentraciones de extracto de *Chuquiraga jussieui*. Bioterio de la Escuela Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo 2015

VOLUMEN DE ORINA DE LOS BLOQUES POR HORA									
TRATAMIENTOS	BLOQUES	VOLUMEN DE ORINA POR HORAS (mL)						TOTAL	PROMEDIO
		1	2	3	4	5	6		
BLANCO (SF)	RB1	0	0,1	0	0	0,2	0,1	0,4	0,47
	RB2	0	0,2	0,3	0	0,2	0	0,7	
	RB3	0	0,1	0,2	0	0	0	0,3	
CONTROL POSITIVO	RC1	5,5	2,2	0,1	0	0,1	0,1	8	8,47
	RC2	6	2,3	0,2	0,1	0,1	0	8,7	
	RC3	7,3	1,1	0	0,2	0,1	0	8,7	
T1	R1T1	1	1,4	0,5	0	0	0	2,9	2,80
	R2T1	2	0,3	0,2	0	0	0	2,5	
	R3T1	1	2	0	0	0	0	3	
T2	R1T2	0,5	1,2	0,6	0,5	0	0	2,8	3.13
	R2T2	1	1,5	0,3	0,2	0	0	3	
	R3T2	2	1	0,1	0,5	0	0	3.6	
T3	R1T3	0,4	3,2	0,1	0,1	0	0	3,8	3,47
	R2T3	2	1	0,4	0,1	0	0	3,5	
	R3T3	2,9	0,1	0,1	0	0	0	3,1	

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

Blanco = Suero Fisiológico o solución salina

Control positivo = Furosemida (20mg/Kg)

T1 = Extracto de Chuquiragua a una concentración de 100 mg/Kg

T2 = Extracto de Chuquiragua a una concentración de 200 mg/Kg

T3 = Extracto de Chuquiragua a una concentración de 400 mg/Kg

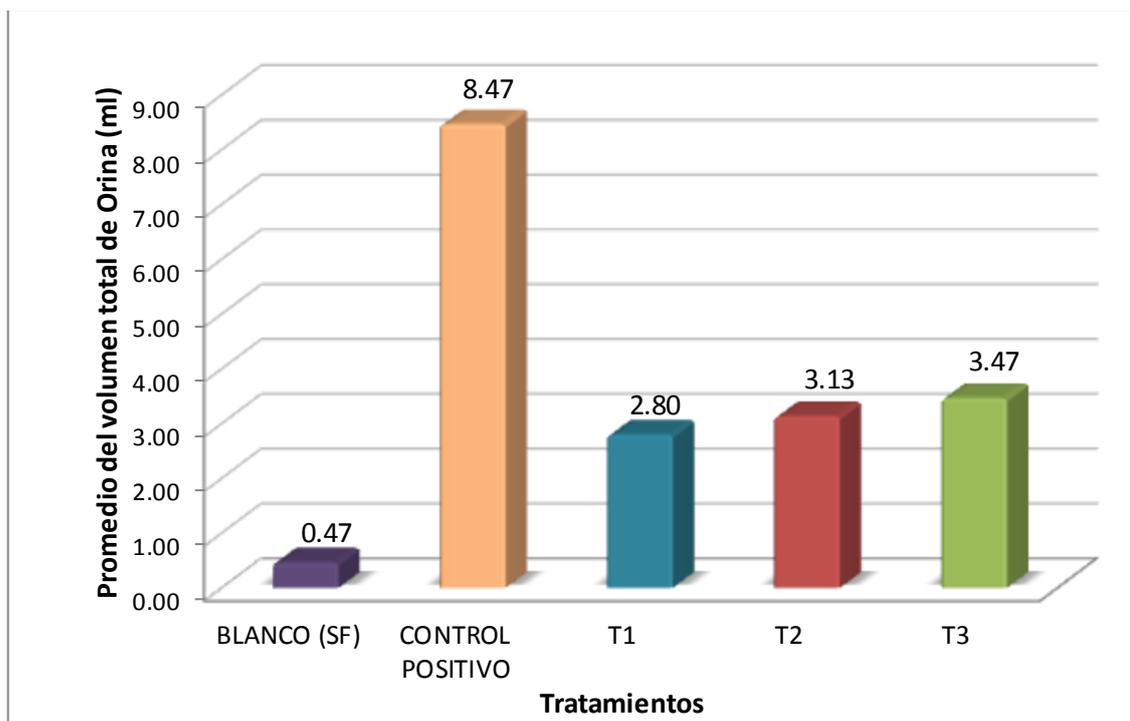


Gráfico 1-3: Promedio de los volúmenes en mL al final del ensayo de diuresis de los diferentes tratamientos.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

En la gráfica podemos observar claramente que el promedio del volumen del control positivo es muy superior a los demás tratamientos con una cantidad de 8,47 mL, el blanco fue muy inferior a los demás tratamientos con un volumen de 0,47 mL, los volúmenes promedio de los tratamientos de extracto fueron T1: 2,80 mL, T2: 3,13 mL, T3: 3,47 mL, siendo el T3 el grupo con mayor cantidad de volumen de orina en comparación con los otros tratamiento de extracto, con respecto al blanco T1, T2, T3 son superiores, además van subiendo el volumen a mas concentración de extracto.

Cuadro 7-3: Porcentaje de diuresis con respecto al blanco del extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en sus diferentes concentraciones

Tratamientos	Promedio del volumen final (mL)	%
T1	2,80	496
T2	3,13	566
T3	3,47	638

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

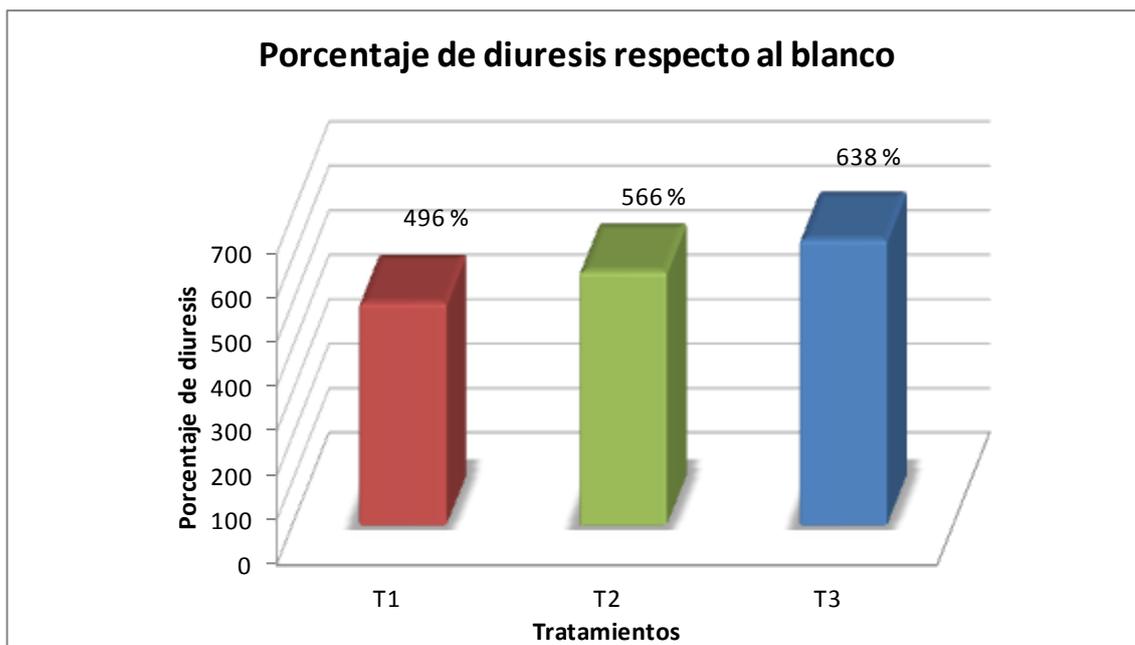


Gráfico 2-3: Porcentaje de diuresis respecto al blanco de los diferentes tratamiento del extracto de *Chuquiraga jussieui*.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

En la gráfica podemos observar que el porcentaje de diuresis de los tres tratamiento respecto al blanco con un volumen de 0.45 mL es muy alta, lo que quiere decir que poseen buena actividad diurética, estos van en aumento dependiendo de la concentración de extracto, es así que el T3 es el que mayor porcentaje tiene con 638% seguido del T2 con 556% y por último el T1 con 496%. Comparando estos resultados con trabajos realizados por Naranjo (2013) que obtuvo 75 % de diuresis en el tratamiento con mayor actividad diurética y Coloma (2015) con un 155 % nuestro valor supera considerablemente.

Cuadro 8-3: Cálculo del volumen de excreción urinaria para cada uno de los tratamientos

Tratamientos	Promedio del volumen final (ml)	%
Blanco	0,47	9
Control positivo	8,47	160
T1	2,80	56
T2	3,13	63
T3	3,47	69

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

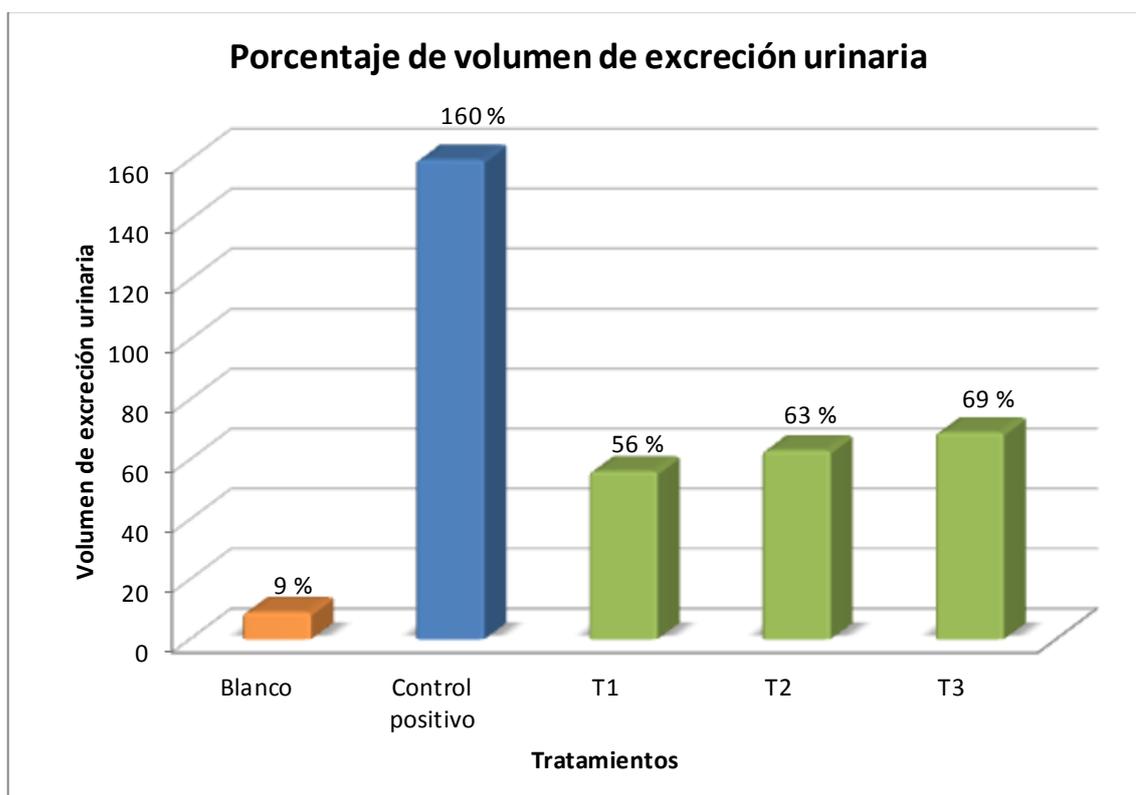


Gráfico 3-3: Porcentaje del volumen de excreción urinaria para cada tratamiento.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

La gráfica 3-3 indica la cantidad de orina excretada en relación al volumen administrado que fue 5 mL en cada uno de los tratamientos incluyendo al blanco y al control positivo, teniendo de esta manera en porcentaje el volumen excretado de orina para el blanco con 9%, para el control positivo (furosemda) 160%, y para cada uno de los tratamientos T1 = 56%, T2 = 63%, T3 = 69%.

Podemos apreciar que el control positivo presenta mayor volumen de excreción urinaria en relación al volumen administrado (5 mL) corroborando que la planta no es más activa que el fármaco, en los tratamientos el que mejor volumen de excreción tuvo fue el T3 que eliminó en un 69% en volumen administrado presentando una diuresis efectiva, seguidamente del T2 y T1 que también presentaron porcentajes altos en relación al blanco.

Comparando el volumen de excreción urinaria de la furosemda con otros autores como (Naranjo, A, 2014) este tuvo un porcentaje más alto 178%, así también el blanco con 44% y el de mayor dosis de extracto de flores de Jamaica con 78%.

Cuadro 9-3: Porcentaje de diuresis con respecto al control positivo de extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en sus diferentes concentraciones

Tratamientos	Excreción urinaria volumétrica (%)	% de diuresis
T1	56	35
T2	63	39
T3	69	43

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

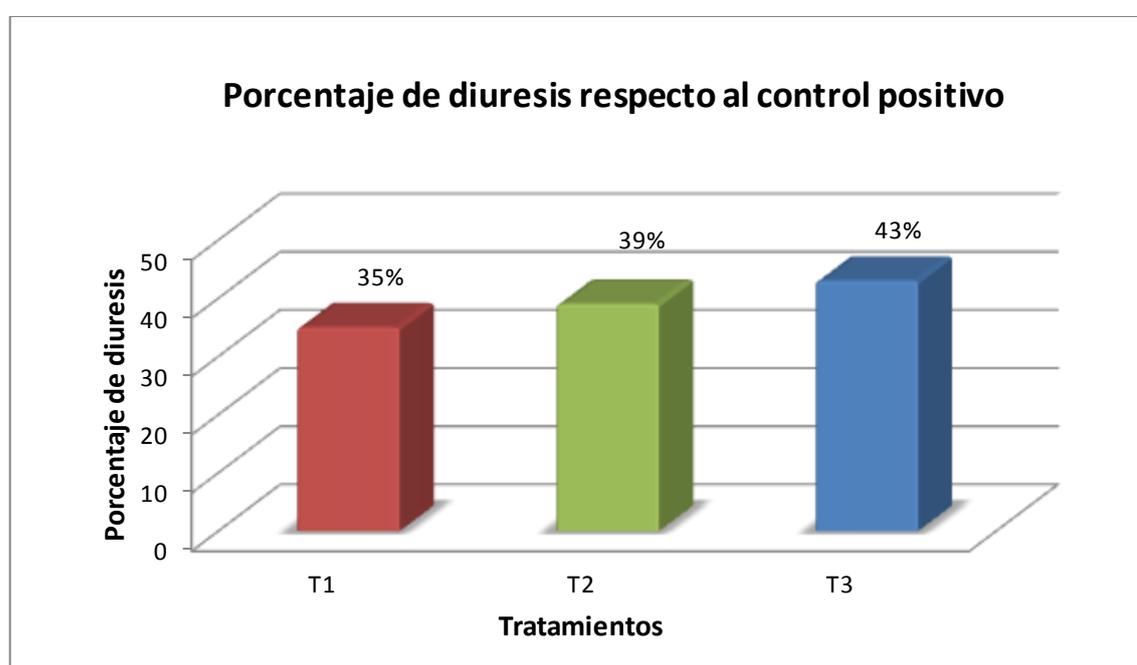


Gráfico 4-3: Porcentaje de diuresis respecto al control positivo de los diferentes tratamiento del extracto de *Chuquiraga jussieui*.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

La gráfica 4-3 muestra en porcentaje la acción diurética respecto a la furosemida es decir la acción diurética, teniendo así para el T1 un 35%, T2 un 39% y T3 un 43%, es así que el T3 posee el mayor porcentaje de acción diurética frente a los demás tratamientos, sin embargo el T3 solo es aproximadamente el 50% de actividad diurética en relación al control positivo (furosemida), lo que era de esperarse por ser un medicamento artificial.

3.7. Electrolitos urinarios

Finalizado el experimento, se midió el contenido de electrolitos urinarios Na^+ , K^+ Y Ca^{2+} excretados en el volumen final de orina, como se muestra en el cuadro.

Cuadro 10-3: Efecto farmacológico del extracto de *Chuquiraga jussieui* sobre la excreción de los electrolitos. ESPOCH. Junio 2015.

Tratamiento	Concentración de electrolitos (mEq/L)			
	Na^+ (Val ref. 40 a 200)	K^+ (Val ref. 25 a 125)	Na^+/K^+	Ca^{2+} (Val ref. 5.0 a 40.0)
Suero fisiológico	80	92.7	0.87	6.9
Furosemida	240.7	101.2	2.38	8.96
Extracto 100 mg/Kg	118.3	128.5	0.92	2.61
Extracto 200 mg/Kg	118.3	128.5	0.92	2.61
Extracto 400 mg/Kg	119.4	128.6	0.93	2.53

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

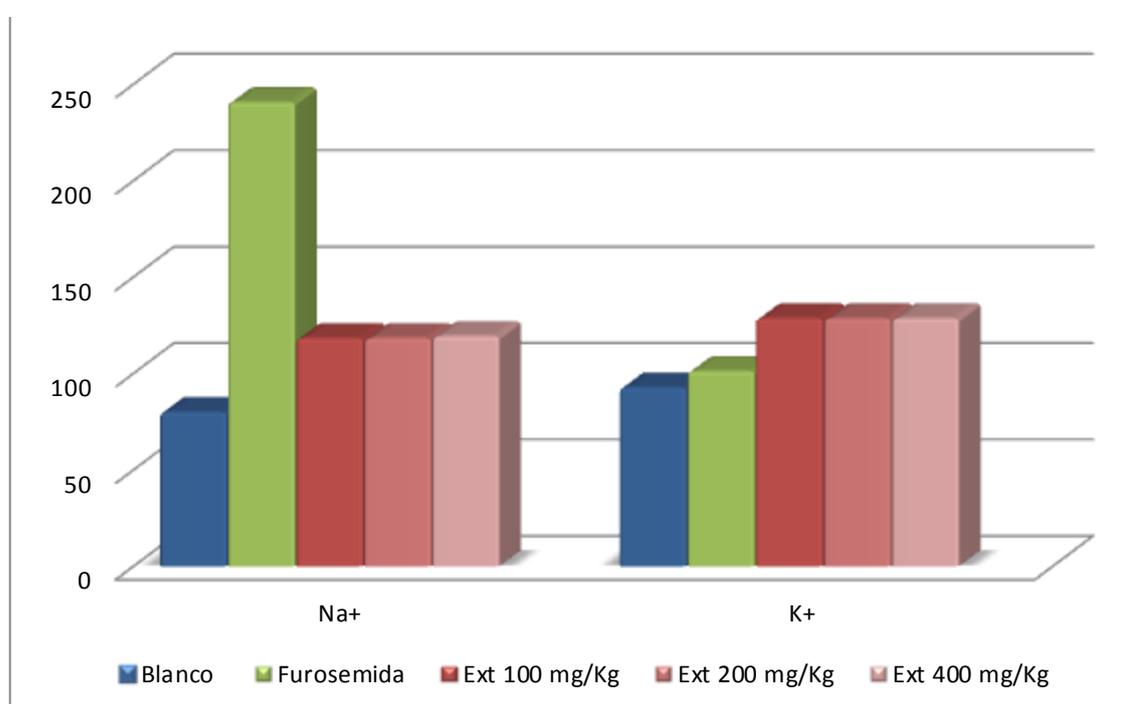


Gráfico 5-3: Cuantificación de electrolitos Na^+ y K^+ de los diferentes tratamientos.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

Como podemos observar el grupo con suero fisiológico muestra la menor cantidad de electrolitos eliminado con 80 mEq/L de ión Na^+ y 92.7 mEq/L de ión K^+ con respecto a la furosemida y a los tratamientos, la furosemida presenta una considerablemente mayor excreción

de Na^+ que los demás tratamientos, el cual está muy encima del valor normal de referencia (40 a 200 mEq/L según el Laboratorio LACFE-Riobamba), no así en el ión K^+ que es menor a los tratamientos aunque no en mucha cantidad encontrándose este dentro del valor de referencia (25 a 125 mEq/L).

Al estudiar la excreción de los tratamientos se evidenció valores muy similares de iones, el ión Na^+ se encuentra dentro del rango normal, en cambio el ión K^+ presenta un poco mayor cantidad de iones que el de referencia.

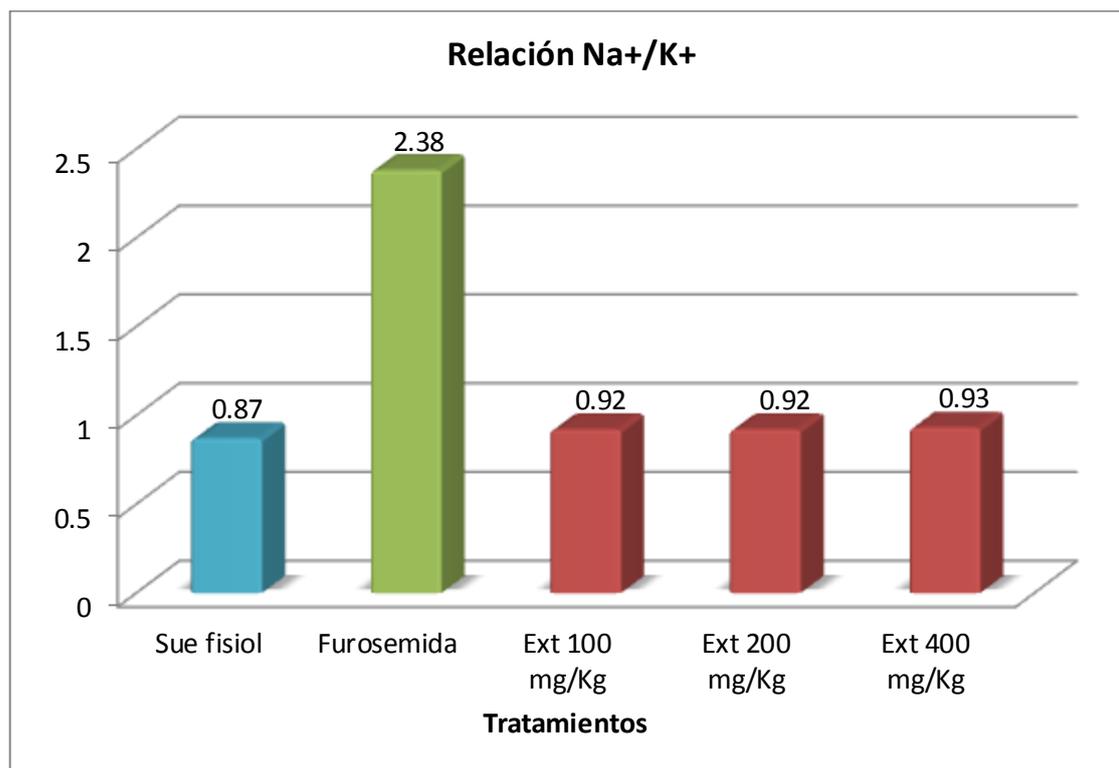


Gráfico 6-3: Relación Na^+/K^+ de los diferentes tratamientos.

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

Se analizó la relación Na^+/K^+ observándose un incremento no muy evidente de los tratamiento frente al blanco, en cambio la furosemida posee un valor muy elevado frente a los tratamiento como es de esperarse. Según (Daud, A, 2007) se conoce que el cociente Na^+/K^+ serviría como indicador para comparar el efecto de los diferentes diuréticos, es así que la furosemida que es el diurético de alta eficacia tiene un valor mayor a 1 debido a la alta eliminación de ambos iones en orina.

Para las tiazidas este cociente es menor que 1 ya que aumenta la concentración urinaria de K^+ alterando la relación Na^+/K^+ (Daud, A 2007). En el caso de los ahorradores de potasio el cociente es mayor que 1 ya que la concentraciones de este ión en orina se encuentran disminuidas (Ratnasooriya W. et al, 2004). Es así que la relación Na^+/K^+ obtenida en todos los

extractos de *Chuquiraga jussieui* es menor que 1 sugiere que el efecto diurético es similar a las tiazidas ya que la concentración de K^+ se encuentra aumentada.

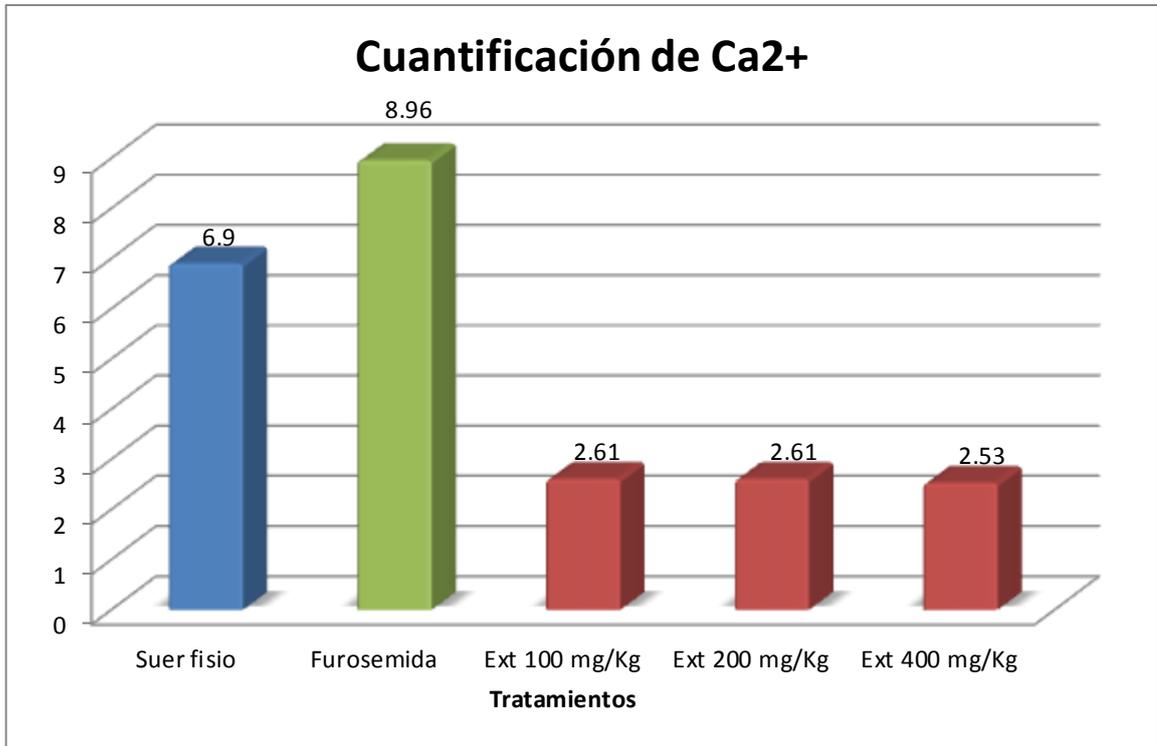


Gráfico 7-3: Cuantificación de Ca^{+2} de los diferentes tratamientos.
Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

En cuanto a la excreción de calcio podemos observar que en la furosemida y el blanco se encuentra dentro de los límites normales, en cambio hay una disminución de este ión en los tratamientos comprándolos con los valores de referencia.

Según Formulario Modelo de la OMS 2004 dice que los diuréticos tiazídicos reducen la excreción urinaria de calcio, y este efecto se utiliza de manera ocasional en el tratamiento de la hipercalcemia idiopática en pacientes con litiasis de calcio, con lo cual podemos decir que el extracto de *Chuquiraga jussieui* tiene un comportamiento similar a las tiazidas mencionado anteriormente.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó para los volúmenes promedio finales a las 6 horas de ensayo farmacológico para cada uno de los tratamientos estudiados, los valores estadísticos presentados fueron obtenidos mediante la utilización del software G-STAT Student el cual

también se utilizó para el análisis de varianza ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples TUKEY.

Cuadro 11-3: Análisis estadístico (promedio, error estándar y probabilidad) del volumen de orina a cada hora de los tratamiento del extracto de *Chuquiraga jussieui*. ESPOCH. Junio 2015

Variables	Tratamientos					E.E.	Prob.
	BLANCO (SF)	CONTROL POSITIVO	T1	T2	T3		
1	0.00 b	6.27 a	1.33 b	1.17 b	1.77 b	0.47	3.0E-05
2	0.13 a	1.83 a	1.23 a	1.23 a	1.43 a	0.51	0.26
3	0.17 a	0.10 a	0.23 a	0.33 a	0.20 a	0.11	0.68
4	0.00 b	0.10 b	0.00 b	0.40 a	0.07 b	0.05	1.9E-03
5	0.13 a	0.10 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.03	0.02
6	0.03 a	0.03 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.02	0.58
TOTAL	0.47 c	8.47 a	2.80 b	3.13 b	3.47 b	0.20	9.6E-10

E.E: Error Estandar, Prob: Probabilidad.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

En este cuadro está representado la media de cada tratamiento a las 6 horas del ensayo, con lo cual podemos decir que el control positivo tuvo mayor cantidad de excreción de orina con un promedio de volumen final de 8.47 mL, seguido del T3 con 4.47 mL, T2 con 3.13 mL, T1 con 2.80 y por último el blanco con 0.47. También podemos observar la probabilidad y el error estándar en el cual según los datos expuestos vemos que no hay mucha variabilidad entre los elementos del grupo.

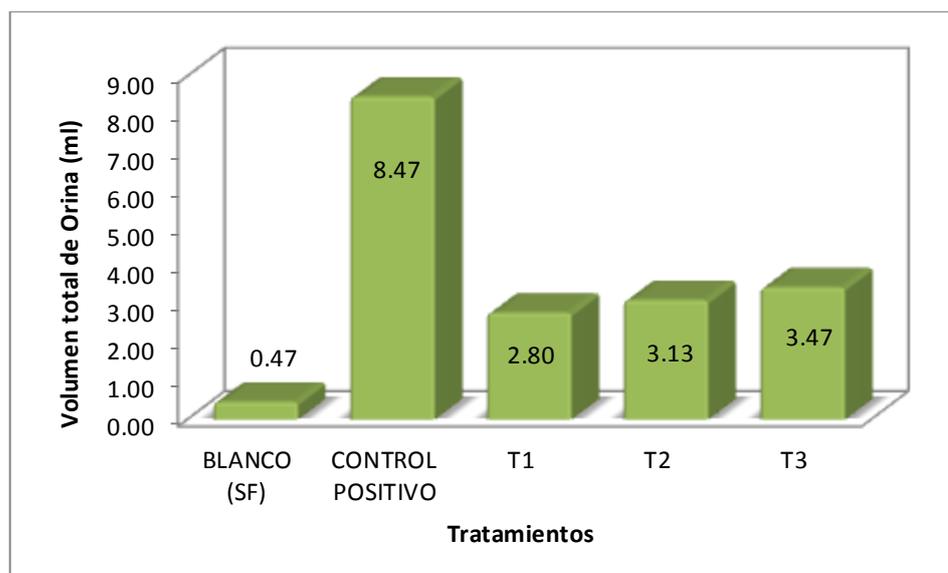


Gráfico 8-3: Promedio del volumen de orina final de los diferentes tratamientos.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

Cuadro 12-3: Análisis de varianza ANOVA para los volúmenes promedio finales de cada tratamiento. ESPOCH. Junio 2015

ANOVA					
F. Var	Gl	S. Cuad	C. Medio	F-valor	p-valor
Total	14.00	104.21			
Tratamientos	4	103.07	25.77	224.71	9.5878E-10
Error	10.00	1.15	0.11		
CV %			9.24		
Media			3.67		

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

En el cuadro observamos el análisis de ANOVA para el estudio farmacológica de diuresis obteniendo con un valor de $p=9.5878E-10$ a un nivel de significancia de 0,05 lo que significa que los resultados de los tratamientos estadísticamente tienen diferencias altamente significativas y por tanto rechazaríamos al Hipótesis nula (H_0) de que todos los tratamientos son iguales y no presentan diferencias, aceptando así la Hipótesis alternativa (H_a) la cual nos indica que al menos uno de los grupos son diferentes.

Cuadro 13-3: Análisis de comparaciones múltiples (test de Tukey), para el volumen promedio final de cada tratamiento. ESPOCH. Junio 2015

Separación de Medias según Tukey ($P < 0.05$)		
Tratamientos	Media	Rango
BLANCO (SF)	0.47	c
CONTROL POSITIVO	8.47	a
T1	2.80	b
T2	3.13	b
T3	3.47	b

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

El cuadro 12 observamos el análisis de comparaciones múltiples (TUKEY) a un nivel de confianza del 95%, mostrando que el control positivo y el blanco presentan grupos diferentes a los demás tratamientos en cuanto a su media, siendo el control positivo el de mayor actividad en volumen de orina y el blanco el de menor actividad, los tratamientos T1, T2 y T3 forman un grupo homogéneo ya sus medias son similares, siendo T3 el de mayor actividad dentro del grupo, seguido del T2 y por último el T1.

3.9. Toxicidad aguda en dosis repetida del extracto de *Chuquiraga jussieui*

Para el estudio de la toxicidad oral aguda se utilizó 4 ratas, tres a una dosis de 400 mg/Kg de masa corporal mediante intubación intragástrica (tratamiento con mayor concentración de extracto de *Chuquiraga jussieui*), así como una rata para el grupo control negativo al cual se le administró agua destilada por la misma vía, se realizó la observación durante 14 días.

Cuadro 14-3: Parámetros evaluados en la toxicidad aguda. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Mayo 2015

Signos de Toxicidad	Valoración	Blanco	R1	R2	R3
Actividad general	4	4	4	4	4
Grito	0	0	0	0	0
Irritabilidad	0	0	0	0	0
Respuesta al toque	4	4	4	4	4
Huida	4	4	4	4	4
Contorsiones	0	0	0	0	0
Patas posteriores	0	0	0	0	0
Enderezamiento	0	0	0	0	0
Tono corporal	4	4	4	4	4
Actividad prensil	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflejo corneal	4	4	4	4	4
Reflejo pineal	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsiones	0	0	0	0	0
Lagrimación	0	0	0	0	0
Micción	4	4	4	4	4
Defecación	4	4	4	4	4
Piloerección	0	0	0	0	0
Números de muertos	0	0	0	0	0
Estimulaciones	4	4	4	4	4
Hipnosis	0	0	0	0	0
Hipotermia	0	0	0	0	0
Respiración	4	4	4	4	4
Cianosis	0	0	0	0	0

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

Se atribuyó arbitrariamente los valores de los parámetros de 0 y 4 a partir de aquellos que son calificados normales. Así los parámetros cuyos valores iniciales reciben una anotación de 4, pueden disminuir hasta 0, en el caso de desaparición de una respuesta analizada, o aumentar hasta 4, en el caso de un aumento de respuesta.

Para aquellas respuestas con una anotación 0 sólo podrán haber un aumento del efecto analizado, que pueden tener un récord máximo de 4.

Mientras mayor es la distancia entre el máximo obtenido y el valor normal original más tóxica es la sustancia. (SARAVIA, 2005, pp. 543-549)

Luego del ensayo se mostró que no hubo efectos colaterales ni muertes en los parámetros de evaluación en el grupo control ni en el grupo tratado, por lo tanto se puede decir que el extracto de *Chuquiraga jussieui* utilizado, no posee ningún efecto tóxico por vía oral como muestran trabajos realizados por Dueñas *et al* (2014) y Castro (1998).

Cuadro 15-3: Valores obtenidos de la medición del peso en gramos durante el análisis de toxicidad aguda en dosis repetida. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Mayo 2015.

GRUPO	DIAS							
	1	3	5	7	9	11	13	14
Blanco	256.5	256.5	256.4	256.4	256	255.8	254.3	254.2
R1	285.5	285.1	285	285.5	284.7	284.2	283.2	282.8
R2	264	263.8	263.1	262.2	262	261.6	261.1	260
R3	243	243	242.6	242.1	242	241.7	240.4	239.8

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

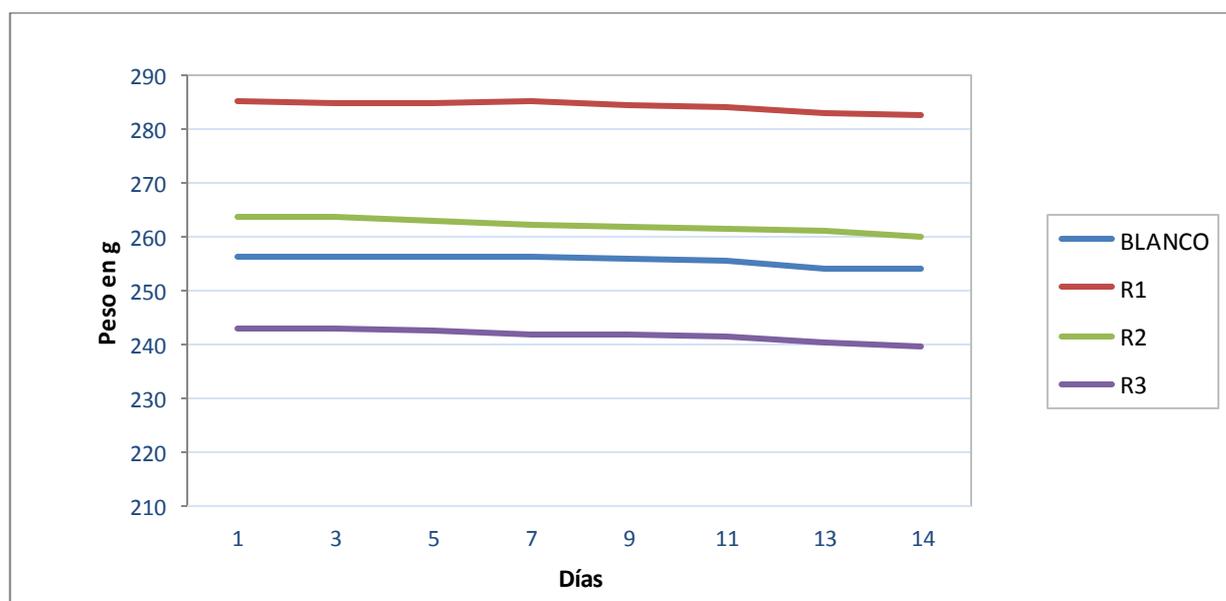


Gráfico 9-3: Peso de las ratas durante el análisis de toxicidad aguda.

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

Durante el ensayo toxicológico el peso corporal de las cuatro ratas presentaron una leve disminución, en los tratamientos el peso disminuyó de la misma manera que en la rata del blanco, esto puede ser debido al ayuno en las ratas o a la diuresis del extracto.

CONCLUSIONES

- En la determinación de los parámetros físico-químicos de control de calidad de la droga vegetal cruda de *Chuquiraga jussieui* confirmó que los valores obtenidos estaban dentro de los límites generales admitidos por la Farmacopea española, con una humedad de 10.95%, Cenizas totales 2.10%, cenizas solubles en agua 5.65% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 0.9%.
- Se obtuvo el extracto hidroalcohólico de *C. jussieui* el cual indico un color verde oscuro, aspecto líquido, olor característico, sabor amargo, densidad de 0.854 g/mL, índice de refracción 1.243, pH de 4.95 y sólidos totales 6.15%.
- En el tamizaje fitoquímico se confirmó la presencia de flavonoides, saponinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, taninos, alcaloides, azúcares reductores, fenoles, principios amargos y compuestos grasos.
- El análisis cromatográfico del extracto de *C. jussieui* realizado sobre placa Sílica Gel F254 con el sistema de solventes cloroformo-acetona-ácido fórmico (75:16.5:8.5), dio tres Rf 0.23, 0.82 y 0.76 que comparados con los Rf de referencia según Wagner pertenecen posiblemente a los flavonoides rutina, quercetina y kaempferol.
- Mediante cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales por el método del AlCl₃ expresados como porcentaje de rutina se determinó el contenido de flavonoides en el extracto de *C. jussieui* el cual obtuvimos 0.4%.
- Se comprobó el efecto diurético del extracto de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en las tres dosis administradas, efecto que posiblemente se le atribuye a los flavonoides. Con respecto al blanco los tres tratamientos tuvieron efecto diurético muy elevado, es así que el tratamiento tres tuvo un 638 % siendo el de mayor actividad. Con relación al control positivo (furosemida) los tratamientos tuvieron menor actividad, con 43 % para el tratamiento tres (400 mg/Kg) que fue el de mayor porcentaje.
- En el estudio de la excreción de electrolitos, la cantidad de sodio en los tres tratamientos de extracto fueron muy inferiores a la furosemida y superior al grupo control, estando dentro del rango normal, la excreción de potasio en los tratamientos fue mayor a la furosemida y al grupo control, siendo mayor al valor de referencia, la cantidad de calcio en los extractos tuvo

una disminución con respecto al valor de referencia, a la furosemina y al grupo control. La relación Na^+/K^+ fue menor a 1 argumentando así que el extracto de *Chuquiraga jussieui* tiene un efecto diurético similar a las tiazidas.

- El ensayo toxicológico a dosis repetida no evidenció efectos colaterales para el extracto de *C. jussieui* a una dosis de 400 mg/kg durante 14 días, por lo cual se puede considerar como no tóxico.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con el fin de determinar los mecanismos de acción de extracto de *C. jussieui*.
- Ejecutar estudios relacionados a la interacción de la planta con medicamentos de uso frecuente.
- Publicar los resultados de la investigación a la comunidad científica y a la población en general proporcionando la utilidad adecuada de la planta.
- Efectuar estudios farmacológicos de la *C. jussieui* en relación a las propiedades terapéuticas que se le atribuyen que aún no estén comprobadas.

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ, J., *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769., Medellín-Colombia., 2005., p.5
<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Rattusnorvegicus00.pdf>
2015-07-17

ARRIAGA, I., Caracterización, extracción y estabilidad de los colorantes naturales presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de Jamaica) como alternativa del consumo como colorante artificial., (TESIS)., Universidad San Carlos de Guatemala., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Química Farmacéutica., San Carlos-Guatemala., 2007., pp. 4, 24
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2554.pdf
2015-01-10

AVENDAÑO, H., Nefrología clínica., 3a ed., Madrid-España., Medica panamericana S.A., 2009., pp 3,22, 801
<https://books.google.com.ec>
2015-01-06

BALLVÉ, C & NORMA, S., Plantas medicinales de uso popular, atlas Farmacognóstico., 1a ed., Sao paulo-Brasil., Ulbra., 2004., pp. 17-18
<https://books.google.com.br>
2015-01-08.

BERMÚDEZ, P., Análisis químico de plantas aromáticas y medicinales., Madrid-España., 2009., pp. 10-13
<http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
2015-01-09

BOLAÑOS, D., La chuquiragua., Santiago de Composte-España., 2014
<http://vivirecuador.com/blog/509/la-chuquiragua>
2015-04-06

CACERES, A., Plantas de uso medicinal en Guatemala., San Carlos-Guatemala., Editorial Universitaria., 1999., pp. 322-324

CARRIÓN, A & GARCÍA, C., Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica., (TESIS)., Universidad de Cuenca., Facultad de Ciencias Químicas., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Bioquímica y Farmacéutica., Cuenca – Ecuador., 2010., pp. 10-22

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>

2015-04-10

CASTILLO, E., Manual de fitoterapia., Barcelona-España., Elsevier Masson., 2007., pp. 57-63, 69

<https://books.google.com.ec>

2015-04-15

CHIMBO, M., Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos de las hojas de caña agria (*Costus spicatus*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con edemas inducidas por carragenina., (TESIS)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad De Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Bioquímica Farmacéutica., Riobamba – Ecuador., 2014, p. 37

COLOMA. J., Evaluación de la actividad diurética del jugo de caña agria (*Costus spicatus*) en ratas (*Rattus norvegicus*)., (TESIS)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad De Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Bioquímica Farmacéutica., Riobamba – Ecuador., 2015, p. 40

DIAS, M., Insuficiencia renal aguda., 1a ed., México., Limusa., 1991., p. 123

<https://books.google.com.ec>

2015-01-08

DUEÑAS, A. et al., Análisis fitoquímico y de seguridad de los extractos de *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmell., Portoviejo-Ecuador., Feijóo., 2014., pp. 79-84

http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V41-Numero_2/cag132141977.pdf

2015-01-12

MANUAL DE OPERACIONES DEL ANALIZADOR DE ELECTROLITOS 9180

[http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/photometer/user_manuals/Roch e%209180%20Electrolyte%20Analyzer%20-%20User%20manual.pdf](http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/photometer/user_manuals/Roch%20e%209180%20Electrolyte%20Analyzer%20-%20User%20manual.pdf)

2015-04-01

FALCONÍ, E., Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza., Juárez-México., 2010., p.11

http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo_animales.pdf

2015-07-20

GAIBOR, D., Determinación de la actividad gastroprotectora de savia de sande (*Brosimum utile*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con lesiones gástricas inducidas., (TESIS)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Bioquímico Farmacéutico., Riobamba-Ecuador., 2013., pp. 78-79

GARCIA, M., Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales.

http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf

6-01-2015

HERNÁNDEZ, S., El modelo animal en las investigaciones biomédicas., 2006

<http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf>

2015-07-10

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA

[file:///C:/Users/SYSTEMarket/Downloads/564113864.introduccion%20cromatografia%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/SYSTEMarket/Downloads/564113864.introduccion%20cromatografia%20(1).pdf)

f

2015-03-07

KOMAITIS., Agric Food Chem., Análisis de los componentes polifenólicos de extractos de plantas., Londres-Inglaterra., Universitaria., 2005., pp. 1190-1195.

LISTA DE LAS ESPECIES DE PLANTAS MEDICINALES

<http://www.unprg.edu.pe/portal/archivos/PLANMED3.pdf>

2015-02-10

LOPEZ, M., Plantas medicinales con acción diurética

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pident_articulo=13761&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=04v20n01a01015pdf001.pdf&ty=81&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es

2015-01-08

LÜLLMANN, H. et al., Farmacología Texto y Atlas., Madrid-España., Médica panamericana., 2010., p. 162.

<https://books.google.com.ec>

28-04-2015

MARCANO, D Y MASAHISA, H., Fitoquímica orgánica., 2da ed., Caracas-Venezuela., Universitaria., 2002., pp. 29, 32, 61, 81, 84

MARTÍNEZ, S. et al., Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L en ratas. *Rev Cubana Plant Med.* Volumen 9 N° 1., La Habana-Cuba., 2004., p. 3

http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/actividad_diuretica_y_antipiretica_de_un_extracto_fluido_de_rosmarinus_officinalis_l_en_ratas.pdf

2015-05-02

MIRANDA, M., Farmacognosia y Productos naturales. La Habana-Cuba., Panamericana., 2000., pp. 40-60

MUÑOZ, J. et al., La habilidad para sujetar y manejar animales de laboratorio no se adquiere fácilmente. *REDVET.* Volumen 12 N° 5B., Zacatecas-México., 2010., pp. 6-9

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511B/051116.pdf>

2015-06-05

NARANJO, A., Evaluación de la actividad diurética y cuantificación de polifenoles de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) cultivada en Pomona Pastaza-Ecuador., (TESIS)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Bioquímico Farmacéutico., Riobamba-Ecuador., 2013., p. 49

NICANDRO, P., Farmacología médica., México DF-México., Medica panamericana., 2008., pp. 529-531

<https://books.google.com.ec>

2015-03-13

OLAYA, M Y ALZAMORA J., Guía de Prácticas y Productos Medicinales., Bogotá-Colombia., Convenio Andrés Bello., 2003., p. 5

ORQUERA, G., Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de chuquiragua (*Chuquiraga jussieu*) a partir de yemas apicales y axilares., (TESIS)., Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE., Departamento de Ciencias de la Vida., Ingeniería en Biotecnología., Ingeniero en Biotecnología., Sangolquí-Ecuador., 2013., pp.5-8

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7167/1/T-ESPE-047408.pdf>

2015-02-08

PALOMINO, L. et al., Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Vol. 16, No. 3. Antioquia-Colombia., 2009., pp. 1-8

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci_arttext

2015-07-26

PÉREZ, M. et al., Validación de un método in vivo para evaluar la actividad diurética. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. Vol. 30, No. 3. Villa Clara- Cuba., 2011., pp. 335

http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol30_3_11/ibi04311.htm

2015-08-17

REMLINGTON, J., Farmacia., 20ava edición., Buenos Aires-Argentina., Medica Panamericana., 2003., pp. 1588-1593

<https://books.google.com.ec>

2015-04-08

ROSALES, M., Los diuréticos: aspectos básicos y clínico terapéuticos., Caracas-Venezuela., Med-ULA., 1994., pp. 75 -78

http://previous.revistanefrologia.com/revistas/ANTIGUO/1990_10_S1_3.pdf

2015-05-21

SARAVIA, A., Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos experimentales in vivo e in vitro., Guatemala., Ed. Universitaria-Universidad de San Carlos de Guatemala., 2005., pp. 65-109; 543-549

SHARAPIN N., Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos., Medellín-Colombia., CAB., 2000., Pp. 20-22, 40, 50-53

<https://books.google.com.ec>

2015-02-12

VANACLOCHA, B., Fitoterapia Vademécum de Prescripción., 3a ed., Madrid-España., MASSON S.A., 2003., pp. 29

<https://books.google.com.ec>

2015-6-12

VASEY, C., La importancia del equilibrio ácido-básico., Madrid España., Madrid Edaf., 2001., pp. 154-155.

<https://books.google.com.ec>

2015-07-09

YÚFERA, E., Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria., 2da ed., Barcelona- España., Editorial Reverté S.A., 2007., pp. 916-918

<https://books.google.com.ec/>

2015-05-06

ANEXOS

Anexo A: Materia prima



Fotografía 9: Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*)



Fotografía 10: Recolección de la materia prima

Anexo B: Preparación de extractos



Fotografía 11: Maceración de la materia prima



Fotografía 12: Obtención de la muestra madre

Anexo C: Control de calidad del vegetal y del extracto



Fotografía 13: Determinación de humedad y cenizas

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015



Fotografía 14: Determinación de pH



Fotografía 15: Determinación del índice de refracción



Fotografía 16: Determinación de la densidad relativa del extracto alcohólico

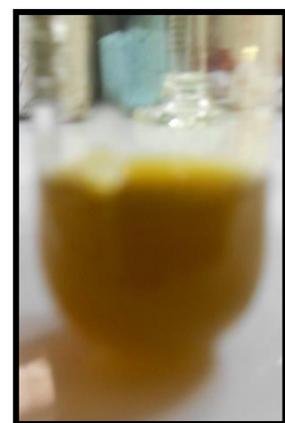
Anexo D: Tamizaje fitoquímico



Fotografía 17: Molienda de la materia prima



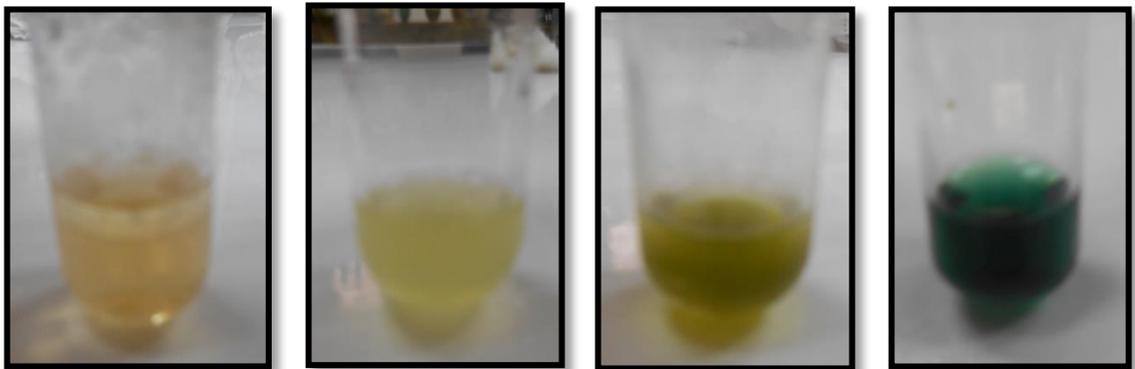
Fotografía 18: Materia prima molida



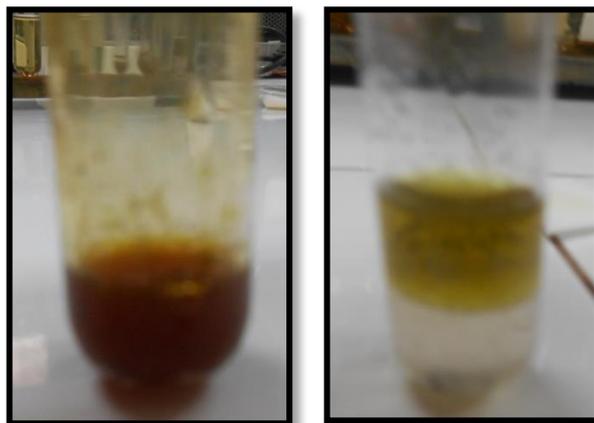
Fotografía 19: Ensayos de Sudan (+), Baljet (+) y Liebermann Buchard (+) en extracto etéreo



Fotografía 20: Ensayos de Fehling (+), Espuma (+), Baljet (+) en extracto alcohólico



Fotografía 21: Ensayos de Shinoda (+), Mayer (+), Dragendorff (+) y Cloruro férrico (+) en extracto alcohólico



Fotografía 22: Ensayos de Shinoda (+) y Wagner (+) en extracto acuoso

Fuente: BARRERA., ANA., 2015

Anexo E: Cromatografía en capa fina



Fotografía 23: Corrido del solvente en la placa



Fotografía 24: Revelado de la placa

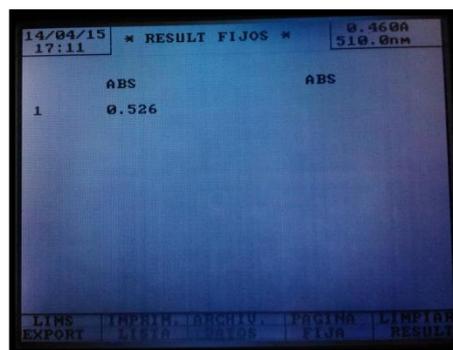
Anexo F: Cuantificación de flavonoides totales



Fotografía 25: Preparación de materiales y reactivos para la cuantificación



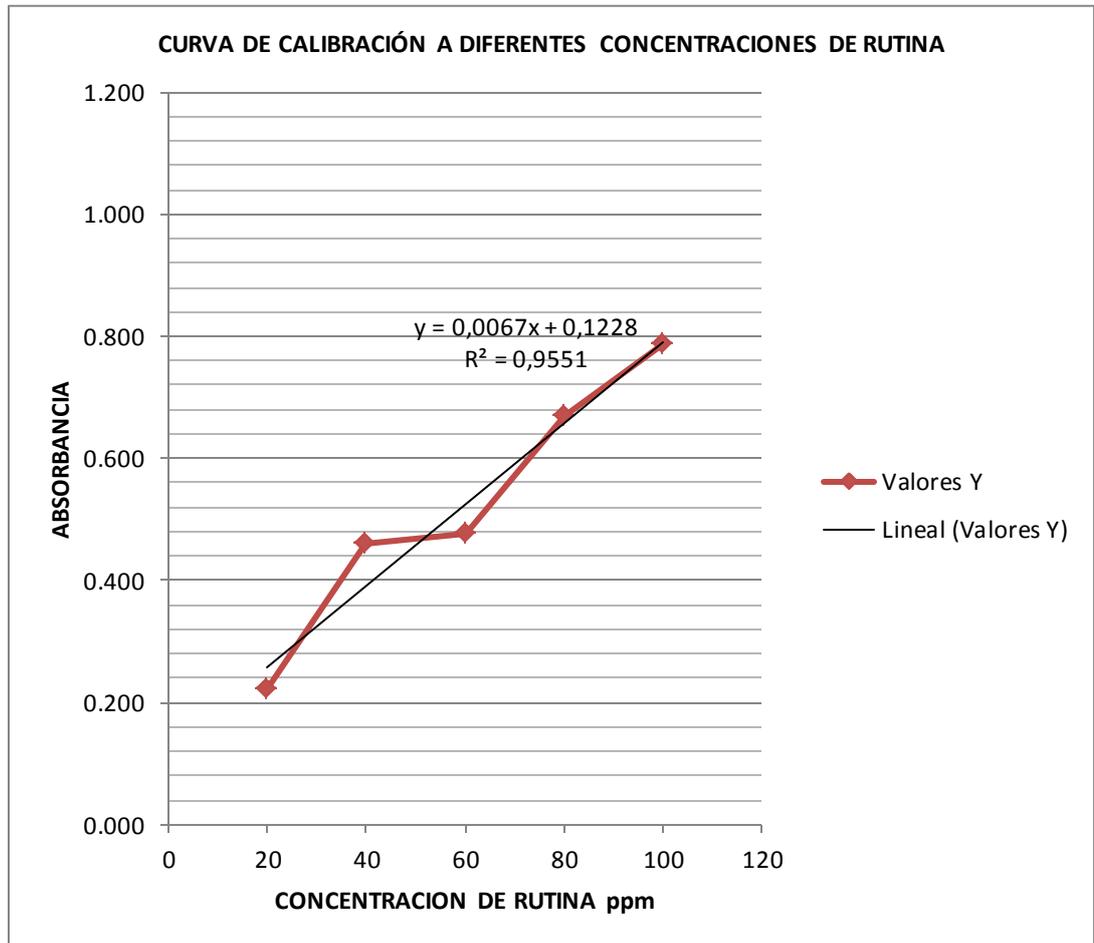
Fotografía 26: Introducción de la celda en el espectrofotómetro UV – visible



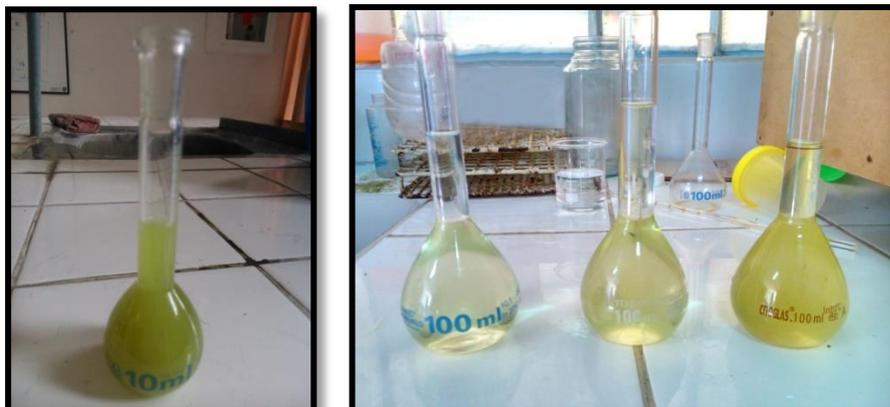
Fotografía 27: Lectura de la absorbancia

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015

Anexo G: Curva de calibración obtenida de rutina a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm



Anexo H: Ensayo de la actividad diurética del extracto de *Chuquiraga jussieui*



Fotografía 28: Preparación de las diferentes concentraciones de extracto a administrar

Fuente: BARRERA., ANA., 2015



Fotografía 29: Administración en ratas por vía oral de extracto de *Ch. jussieui*



Fotografía 30: Administración en ratas por vía parenteral del medicamento furosemida



Fotografía 31: Recolección de orina de las ratas en jaulas metabólicas

Anexo I: Medición de electrolitos Na^+ , K^+ y Ca^{2+}



Fotografía 32: Equipo para determinación de electrolitos AVL 6380

Fuente: BARRERA., ANA., 2015


LACFE LABORATORIOS CLINICOS AUTOMATIZADOS
 


Dr. Francisco Vallejos Y. Dra. Eufemia Quisiguiña A.
 BIOQUIMICOS FARMACEUTICOS UNIVERSIDAD CENTRAL QUITO

Dirección:
 1.- España 19-54 y Olmedo Telefax: 2963-793 E-mail: lacfe@latinmail.com
 2.- Primera Constituyente 34-35 y Diego de Ibarra (Parque Barriga) Telf.: 2947214

RESULTADOS EN 1 HORA EMERGENCIAS LAS 24 HORAS

Fecha: 30/03/2015 15:25 Página: 1
 Paciente: Barrera Basantes Ana Id: 1600577272 Sexo: F Edad: 0 D
 Médico : ..
 Fecha de recepción: 30/03/2015 09:34 Recepción número: 0008249
Resultados Valores de ref.

QUÍMICA SANGUÍNEA		
1	CALCIO EN ORINA	2.53 mg/dL 5.0 a 40.0
2	POTASIO EN ORINA	128.6 mEq/L 25 a 125
3	SODIO EN ORINA	119.4 mEq/L 40 a 200
	Sodio en Orina	


LACFE LABORATORIOS CLINICOS AUTOMATIZADOS
 Dra. Eufemia Quisiguiña A. Dr. Francisco Vallejos Y. Dr. Francisco Vallejos Y.

Fotografía 33: Examen de electrolitos en orina de rata a dosis de 400 mg/Kg de extracto de *Chuquiraga jussieui*

Fuente: BARRERA.,ANA., 2015