



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DE  
*Oreocallis grandiflora* EN RATAS (*Rattus norvegicus*)”**

**AUTORA:** ANGÉLICA ALEXANDRA ALLAUCA ALLAUCA

**TUTOR:** BQF. DIEGO VINUEZA T., M.Sc.

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Previo a la obtención del Título de:**

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Riobamba-Ecuador**

**2017**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo Angélica Alexandra Allauca Allauca declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el texto que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

---

Angélica Alexandra Allauca Allauca.  
CI. 060406533-4

**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: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DE *Oreocallis grandiflora* EN RATAS (*Rattus norvegicus*)” de responsabilidad de la señorita egresada Angélica Alexandra Allauca Allauca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza, M.Sc.  
**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Elizabeth Escudero, Mg.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DERECHOS DE AUTORÍA**

El trabajo de grado que presento es original y basado en el proceso de investigación y/o adaptación tecnológica establecido en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En tal virtud, los fundamentos teóricos, científicos y los resultados son de exclusiva responsabilidad de los autores. El patrimonio intelectual le pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

---

Angélica Alexandra Allauca Allauca.  
CI. 060406533-4

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a todas las personas que formaron parte de mi vida principalmente a Dios por haberme entregado una familia maravillosa que ha llenado mi vida de felicidad, amor y sabiduría.

A mis padres, Olga y Ángel por su apoyo incondicional, por brindarme su amor a pesar de las adversidades, y luchar día a día en su trabajo para entregarnos la mejor educación.

A mis hermanos por darme el ejemplo de que todo en la vida se puede alcanzar si uno se propone y lucha por conseguirlo, por sus consejos y por estar siempre a mi lado apoyándome en los buenos y malos momentos.

A todos mis compañeros que han formado parte de mi vida académica al igual que los profesores que han pasado a lo largo del tiempo, ya que me han dejado grandes enseñanzas.

Angy

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por haber sido un pilar fundamental en mi formación académica.

Al Laboratorio de Productos Naturales como también al Bioterio de la Facultad de Ciencias por permitirme el uso de sus equipos y el espacio necesario para la realización del presente trabajo.

Un agradecimiento especial a mi tutor de tesis BQF. Diego Vinueza M.Sc., por su apoyo y dedicación, enseñarnos a tener espíritu científico y aspirar grandes sueños en el futuro, lo cual es alcanzable mediante la investigación y lectura centrada con base científica.

A todas las personas que me apoyaron para que este trabajo se culmine exitosamente.

Angy

## TABLA DE CONTENIDOS

|                   |      |
|-------------------|------|
| RESUMEN.....      | xvi  |
| SUMMARY.....      | xvii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1    |

### CAPITULO I

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>1</b>        | <b>MARCO TEÓRICO.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1.1</b>      | <b>Diuréticos: .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.1.1</b>    | <i>Diuresis: .....</i>  | <b>4</b>  |
| <b>1.1.2</b>    | <i>Plantas medicinales con acción diurética.....</i>                          | <b>5</b>  |
| <b>1.1.3</b>    | <i>Clasificación de drogas diuréticas .....</i>                               | <b>6</b>  |
| <b>1.1.3.1.</b> | <i>Diuréticos de eficacia elevada.....</i>                                    | <b>6</b>  |
| <b>1.1.3.2.</b> | <i>Diuréticos de eficacia moderada.....</i>                                   | <b>7</b>  |
| <b>1.1.3.3.</b> | <i>Diuréticos de eficacia escasa.....</i>                                     | <b>7</b>  |
| <b>1.1.4</b>    | <i>Diuréticos en la hipertensión arterial: .....</i>                          | <b>8</b>  |
| <b>1.2</b>      | <b>Electrolitos sodio, potasio y calcio.....</b>                              | <b>8</b>  |
| <b>1.3</b>      | <b>Oreocallis grandiflora .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.3.1</b>    | <i>Taxonomía .....</i>  | <b>9</b>  |
| <b>1.3.2</b>    | <i>Descripción taxonómica: .....</i>  | <b>10</b> |
| <b>1.3.3</b>    | <i>Usos terapéuticos: .....</i>   | <b>10</b> |
| <b>1.4</b>      | <b>Compuestos fenólicos: .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.4.1</b>    | <i>Clasificación de los compuestos fenólicos .....</i>                        | <b>11</b> |
| <b>1.4.2</b>    | <i>Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos:.....</i>                    | <b>12</b> |
| <b>1.4.3</b>    | <i>Actividad antioxidante de los fenoles .....</i>                            | <b>13</b> |
| <b>1.4.4</b>    | <i>Mecanismo de acción de antioxidantes fenólicos.....</i>                    | <b>13</b> |
| <b>1.4.5</b>    | <i>Flavonoides .....</i>  | <b>13</b> |
| <b>1.4.6</b>    | <i>Acción farmacológica de los flavonoides.....</i>                           | <b>14</b> |
| <b>1.4.7</b>    | <i>Biodisponibilidad de los flavonoides .....</i>                             | <b>14</b> |
| <b>1.5</b>      | <b>Rattus norvegicus.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.5.1</b>    | <i>Información taxonómica: .....</i>  | <b>16</b> |
| <b>1.5.2</b>    | <i>Inmovilización del animal .....</i>  | <b>16</b> |
| <b>1.5.3</b>    | <i>Volúmenes de dosificación para diferentes vías de administración .....</i> | <b>17</b> |
| <b>1.5.4</b>    | <i>Factores que pueden influir en la biodisponibilidad.....</i>               | <b>18</b> |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.5.4.1. | <i>Vehículo</i> .....                    | 18 |
| 1.5.4.2. | <i>Tasa de absorción</i> .....           | 19 |
| 1.5.4.3. | Factores externos.....                   | 19 |
| 1.5.4.4. | <i>Habitación y adiestramiento</i> ..... | 19 |
| 1.5.4.5. | Irritante/pH.....                        | 19 |
| 1.5.5    | <i>Vías de administración:</i> .....     | 19 |

## CAPITULO II

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2        | <b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....   | 21 |
| 2.1      | <b>Lugar de investigación</b> .....   | 21 |
| 2.2      | <b>Recolección del material vegetal</b> .....   | 21 |
| 2.3      | <b>Identificación del material vegetal</b> .....  | 21 |
| 2.4      | <b>Materiales, equipo y reactivos:</b> .....  | 21 |
| 2.4.1    | <i>Material vegetal</i> .....   | 22 |
| 2.4.2    | <i>Material biológico</i> .....   | 22 |
| 2.4.3    | <i>Fármaco de referencia</i> .....  | 22 |
| 2.4.4    | <i>Materiales de laboratorio</i> .....  | 22 |
| 2.4.5    | <i>Equipos</i> .....  | 23 |
| 2.4.6    | <i>Reactivos</i> .....  | 24 |
| 2.5      | <b>Técnicas y métodos</b> .....   | 25 |
| 2.5.1    | <b>Control de calidad de droga cruda</b> .....  | 25 |
| 2.5.1.1. | <i>Determinación de Humedad</i> .....   | 26 |
| 2.5.1.2. | <i>Determinación de cenizas totales</i> .....   | 27 |
| 2.5.1.3. | <i>Determinación de cenizas solubles en agua</i> .....  | 28 |
| 2.5.1.4. | <i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i> .....   | 29 |
| 2.5.2    | <b>Tamizaje fitoquímico:</b> .....  | 29 |
| 2.5.3    | <b>Control de calidad del extracto hidroalcohólico de <i>Oreocallis grandiflora</i></b> .....                       | 32 |
| 2.5.3.1. | <i>Determinación de requisitos organolépticos</i> .....   | 33 |
| 2.5.3.2. | <i>Determinación de la densidad relativa</i> .....  | 33 |
| 2.5.3.3. | <i>Determinación del índice de refracción</i> .....   | 34 |
| 2.5.3.4. | <i>Determinación del pH</i> .....   | 34 |
| 2.5.3.5. | <i>Determinación de solidos totales</i> .....   | 35 |
| 2.5.4    | <b>Determinación de fenoles totales</b> .....   | 35 |
| 2.5.5    | <b>Determinación de flavonoides:</b> .....  | 35 |
| 2.5.6    | <b>Determinación del potencial antioxidante de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> por el método DPPH</b> ..... | 36 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.5.7 | <i>Evaluación de la actividad diurética de las flores de Oreocallis grandiflora</i> ..... | 36 |
| 2.5.8 | <i>Determinación de electrolitos en orina</i> .....                                       | 37 |
| 2.5.9 | <i>Análisis estadístico:</i> .....  | 38 |

### CAPITULO III

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3   | <b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.</b>   | 39 |
| 3.1 | <b>Control de calidad de la droga cruda</b> .....   | 39 |
| 3.2 | <b>Tamizaje fitoquímico</b> .....   | 40 |
| 3.3 | <b>Control de calidad del extracto hidroalcohólico de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i></b><br>42                               |    |
| 3.4 | <b>Cuantificación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu:</b><br>43  |    |
| 3.5 | <b>Cuantificación de flavonoides totales:</b> .....   | 44 |
| 3.6 | <b>Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante el método de DPPH.</b> .....                                  | 45 |
| 3.7 | <b>Evaluación de la actividad diurética de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> en ratas (<i>rattus norvergicus</i>)</b> ..... | 46 |
| 3.8 | <b>Evaluación de los Electrolitos urinarios</b> .....   | 48 |
| 3.9 | <b>Análisis estadístico</b> .....   | 51 |
|     | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 54 |
|     | <b>RECOMENDACIONES</b> .....  | 55 |
|     | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   |    |
|     | <b>ANEXOS</b>   |    |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-1:</b> La nefrona y lugar de acción de los diuréticos.....  | 5  |
| <b>Figura 2-1:</b> <i>Oreocallis grandiflora</i> .....  | 9  |
| <b>Figura 3-1:</b> Estructura química general de los flavonoides. ....  | 14 |
| <b>Figura 4-1:</b> <i>Rattus norvegicus</i> .....   | 15 |
| <b>Figura 5-1:</b> Técnica de sujeción de ratas con dos manos .....   | 16 |
| <b>Figura 1-2:</b> Procedimiento para determinar el contenido de humedad, utilizando el método gravimétrico .....                       | 26 |
| <b>Figura 2-2:</b> Procedimiento para determinar cenizas totales .....  | 27 |
| <b>Figura 3-2:</b> Procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas solubles en agua.....   | 28 |
| <b>Figura 4-2:</b> Procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....                         | 29 |
| <b>Figura 5-2:</b> Extracción sucesiva del material vegetal .....   | 30 |
| <b>Figura 6-2:</b> Ensayos para determinar las clases o grupos de compuestos en el extracto etéreo                                      | 31 |
| <b>Figura 7-2:</b> Ensayos para determinar las clases o grupos de compuestos en el extracto alcohólico.....                             | 31 |
| <b>Figura 8-2:</b> Ensayos para determinar las clases o grupos de compuestos en el extracto acuoso .....                                | 31 |
| <b>Figura 9-2:</b> Metodología para determinar la densidad relativa.....  | 32 |
| <b>Figura 10-2:</b> Metodología para determinar el índice de refracción. ....   | 33 |
| <b>Figura 11-2:</b> Metodología para determinar el contenido de sólidos totales en el extracto vegetal .....                            | 34 |
| <b>Figura 1-3:</b> Excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio por influencia de las diferentes dosis administradas..... | 48 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1-1:</b> Descripción taxonómica de la <i>Oreocallis grandiflora</i> .....   | 10 |
| <b>Tabla 2-1:</b> Información taxonómica de <i>rattus norvergicus</i> : .....  | 16 |
| <b>Tabla 3-1:</b> Calibre de aguja y volumen de dosificación recomendado para diferentes vías de administración.....   | 18 |
| <b>Tabla 1-2:</b> Materiales .....   | 22 |
| <b>Tabla 2-2:</b> Equipos.....   | 23 |
| <b>Tabla 3-2:</b> Reactivos .....  | 24 |
| <b>Tabla 4-2:</b> Condiciones en las que se mantuvieron los animales de experimentación.....   | 37 |
| <b>Tabla 1-3:</b> Resultados del control de calidad físico-químico de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> .....  | 39 |
| <b>Tabla 2-3:</b> Tamizaje fitoquímico de los extractos de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> .....   | 40 |
| <b>Tabla 3-3:</b> Control de calidad del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> .....   | 42 |
| <b>Tabla 4-3:</b> Resultados de la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de flores las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> .....  | 43 |
| <b>Tabla 5-3:</b> Resultados de la cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de flores las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> .....  | 44 |
| <b>Tabla 6-3:</b> Concentración del extracto de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> capas de inhibir la concentración inicial del DPPH en un 50% .....   | 45 |
| <b>Tabla 7-3:</b> Efecto de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> en el volumen de orina utilizando ratas de laboratorio en un intervalo de 6 horas.....   | 46 |
| <b>Tabla 8-3:</b> Volumen de orina excretada por las ratas de laboratorio por influencia del extracto de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> .....   | 47 |
| <b>Tabla 9-3:</b> Efecto de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> sobre la excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio en muestras de orina de 6 horas: .....                             | 48 |
| <b>Tabla 10-3:</b> Efecto natriurético, salurético e inhibición de la anhidrasa carbónica de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> en ratas de laboratorio en muestras de orina recogidas por 6 horas. . | 49 |
| <b>Tabla 11-3:</b> Efecto de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> sobre la excreción urinaria de iones calcio en ratas de laboratorio en muestras de orina recogida por 6 horas.....                    | 50 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| <b>GRÁFICO 1-3:</b> Excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio por influencia de la diferentes dosis administradas..... | 48 |
| <b>GRÁFICO 2-3:</b> Dosis administrada vs volumen de orina excretada durante un un periodo de 6 horas .....                             | 51 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Recolección, secado y trituración de las flores de *Oreocallis grandiflora*
- ANEXO B.** Determinación del contenido de humedad del material vegetal
- ANEXO C.** Determinación del contenido de Cenizas totales (Gráfico 1C), cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico del material vegetal. (Gráfico 2C).
- ANEXO D.** Tamizaje fitoquímico de los extractos: etéreo (Gráfico 1D), metanólico (Gráfico 2D) y acuoso de las flores de *Oreocallis grandiflora*. (Gráfico 3D).
- ANEXO E.** Extracción y obtención del extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora*
- ANEXO F.** Control de calidad del extracto hidroalcohólico de la muestra de ensayo.
- ANEXO G.** Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de tricloruro de aluminio (Gráfico 1G) y flavonoides mediante el método de Folin Ciocalteau (Gráfico 2G).
- ANEXO H.** Curva de calibración del ácido gálico (Gráfico 1H) y de la quercetina (Gráfico 2H) utilizados para la cuantificación de fenoles totales y fenoles respectivamente.
- ANEXO I.** Determinación del potencial antioxidante de flores de *Oreocallis grandiflora* mediante el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)
- ANEXO J.** Porcentaje de inhibición del DPPH por influencia de la concentración del ácido gálico.
- ANEXO K.** Porcentaje de inhibición del DPPH por influencia de la concentración del extracto de flores de *Oreocallis grandiflora*.
- ANEXO L.....** Coeficiente de determinación lineal y actividad antioxidante del extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* (Gráfico 1L) y el estándar ácido gálico (Gráfico 2L)
- ANEXO M.** ...Valores de IC<sub>50</sub> para la determinación de la actividad antioxidante de las flores de *Oreocallis grandiflora* (Gráfico 1M) y el estándar ácido gálico (Gráfico 2M).
- ANEXO N.** Ambientación de los animales de experimentación
- ANEXO. Ñ.** Volumen de dosificación en función del peso de los animales de experimentación para los diferentes tratamientos.
- ANEXO O.** Evaluación de la actividad diurética en *rattus norvergucicus*: sustancias de ensayo (Gráfico 1O), administración por vía oral (Gráfico 2O), caja metabólica (Gráfico 3O) y recolección de la muestra (Gráfico 4O).
- ANEXO P.** Prueba de normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (Gráfico 1P) y homogeneidad mediante el test de homogeneidad de varianzas (Gráfico 2P) utilizando un factor (dosis) y una variable respuesta (la excreción urinaria).

**ANEXO Q.** Test ANOVA de un factor (Gráfico 1Q) y test de Tukey, en el cual se encuentra el cuadro de comparaciones múltiples (Gráfico 2Q) y el cuadro de subconjuntos homogéneos (Gráfico 3Q).

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las flores de cucharilla (*Oreocallis grandiflora*) sobre ratas (*Rattus norvegicus*) utilizado como modelo animal. Para evaluar la actividad diurética se utilizaron 25 ratas de laboratorio con pesos comprendidos entre 180-250 g, a las cuales se administraron por vía oral tres diferentes dosis (25, 100 y 200 mg/kg), furosemida (10 mg/kg) como control positivo y carboximetil celulosa 0,9 % p/v como vehículo. Posteriormente, se midió el volumen de orina total excretada y electrolitos a un intervalo de 6 horas después de la administración de los tratamientos. Además, se comprobó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, lactonas, cumarinas, triterpenos y esteroides por medio de un tamizaje fitoquímico. El contenido de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico fue de  $12,01 \pm 0,21\%$ , mientras que el de flavonoides de  $15,85 \pm 1,53\%$ . La actividad captadora de radicales libres del extracto obtuvo un  $IC_{50}$  de  $907,003 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la del ácido gálico utilizado como referencia alcanzó un  $IC_{50}$  de  $35,1985 \mu\text{g/mL}$ . Se comprobó el efecto diurético del extracto obtenido a partir de las flores de *Oreocallis grandiflora* a las tres dosis administradas. Se verifica una relación inversamente proporcional entre la dosis y el efecto diurético a las concentraciones empleadas en el ensayo. La dosis de 25 mg/kg de extracto hidroalcohólico no presenta diferencias significativas con respecto a la referencia en relación al volumen de orina excretado, sin embargo, se evidenciaron concentraciones menores de sodio y calcio, aunque mayores de potasio excretadas en el mencionado tratamiento con respecto al control positivo. Por lo anterior, el extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora* podría constituirse en un diurético tipo tiazida. Se recomienda realizar análisis posteriores para investigar los activos responsables de la actividad y comprender el mecanismo del efecto diurético a nivel molecular.

**PALABRAS CLAVE:** <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <DIURESIS>, <ELECTROLITOS>, <FENOLES>, <FLAVONOIDES>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE>.

## SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the diuretic activity of the hydroalcoholic extract from cucharilla (*Oreocallis grandiflora*) flowers in rats (*Rattus norvegicus*) used as animal model. In order to evaluate the diuretic activity, 25 lab rats were used, the average weight was between 180-250 grams, three different doses were administered (25, 100, 200 mg/kg), furosemide (10 mg/kg) as positive control and carboxymethyl cellulose 0,9 weight/volume as vehicle. Then, the urine total volume and electrolytes were measured at an interval of 6 hours after the treatment administration. Additionally, the presence of phenolic, flavonoids, quinones, lactones, coumarins, triterpenes compounds and steroids was verified by means of a phytochemical screening. The phenolic compounds content in the hydroalcoholic extract was  $12,01 \pm 0,21\%$ , while the flavonoids were  $15,85 \pm 1,53\%$ . The sensor activity for free radicals of the extract obtained a  $LC_{50}$  (Lethal concentration) of 907,003 micrograms/milliliters, while the gallic acid which was used as a referenced reached  $LC_{50}$  of 35,1985 micrograms/milliliters. The diuretic effect of the *Oreocallis grandiflora* flowers was proved in the three administered doses. An inversely proportional ratio between the doses and the diuretic effect in the applied concentrations is verified in the test. The doses of 25 mg/kg of the hydroalcoholic extract does not present significant differences with respect to the reference related to the volume of the urine; however, lower sodium and calcium concentrations were evidenced, even though the potassium amount is higher in the treatment in relation to the positive control. In conclusion, the *Oreocallis grandiflora* hydroalcoholic extract could become a diuretic type thiazide. It is recommended to develop further analyses to research the active compounds which are responsible for the activity and understand the mechanism of the diuretic effect at the molecular level.

KEY WORDS: BIOCHEMISTRY, PHARMACOLOGY, DIURESIS, ELECTROLYTES, PHENOLS, FLAVONOIDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY.

## INTRODUCCIÓN

La OMS tiene la misión de ayudar a salvar vidas y mejorar la salud mediante el apoyo a la investigación estratégica en la medicina tradicional, para lo cual respalda los proyectos de investigación y aboga por el uso racional mediante el fomento de su utilización basada en pruebas científicas, siendo así importante la presente investigación tanto a nivel científico como a nivel social por contribuir a la salud de la población. (Organización Mundial de la Salud, 2013, p.16)

Los diuréticos son fármacos utilizados en el tratamiento de estados edematosos asociados a enfermedades como la hipertensión arterial sistémica, la falla cardiaca, la nefritis, la ascitis, el edema pulmonar y el edema cerebral. (Maghrani *et al.*, 2005, p.31)

Sin embargo, el uso concomitante de los diuréticos puede causar reacciones adversas en el organismo como: desequilibrio hidroelectrolítico, alteraciones metabólicas, desarrollo de nuevos casos de diabetes, activación del sistema neuroendocrino renina-angiotensina-aldosterona, deterioro de la función sexual y disfunción renal como es el caso de los diuréticos de asa como la furosemida. (Model, 2016, a, p.1)

En este sentido, aún existe la necesidad de buscar nuevos agentes diuréticos con menores efectos adversos, que incrementen el arsenal terapéutico y que sean, además, de fácil acceso para poblaciones de bajos recursos económicos.

La presión arterial es una patología que constituye uno de los principales factores de riesgo de derrames cerebrales y una de las mayores causas de insuficiencia renal, es una enfermedad difícil de controlar y que afectan a una gran parte de la población de manera silenciosa. Estudios recientes han dado a conocer que las plantas con acción diurética provocan una disminución de la presión arterial motivo por el cual es importante investigar plantas con acción diurética como también sus compuestos. (Noriega santizo, 2015, p.9)

Actualmente, los diuréticos tiazídicos constituyen un estándar de oro en la hipertensión primaria ya que son fármacos que se caracterizan por producir un efecto terapéutico a bajas concentraciones llegando a ser de primera elección en pacientes hipertensos, incluso en ancianos ya que reducen los efectos adversos mejorando la calidad de vida del paciente. (Model, 2016, b, p.2)

La mayoría de fármacos sintéticos son derivados de hierbas medicinales y al ser el Ecuador un país biodiverso y contar con innumerables especies vegetales se debe realizar investigaciones a nivel físico, químico y molecular para determinar nuevos principios activos y posteriormente diseñar un fármaco para tratar enfermedades que vayan desde un simple dolor hasta tratamientos contra el cáncer

*Oreocallis grandiflora* es un arbusto localizado al sur del Ecuador, estudios etnobotánicos realizados por investigadores de la Universidad Técnica de Particular Loja determinan que las flores administradas por vía oral son utilizadas para el tratamiento de enfermedades a nivel del sistema respiratorio, sistema genitourinario, sistema digestivo y está relacionado a síndromes ligados al cultivo ("mal de ojo", "malvado aire", y "calor encerrado"), además, se le atribuyen propiedades diuréticas que serán evaluadas en el presente trabajo de investigación. (Tinitana *et al.*, 2016, a, p.13)

Por otra parte, estudios preliminares realizados del extracto metanólico de las flores de *Oreocallis grandiflora* para determinar la actividad antioxidante y antihiper glucemiante reportan una concentración de compuestos fenólicos totales de  $174 \pm 0.004$  mg de ácido gálico por gramo de extracto y un  $IC_{50}$  15  $\mu$ g/ml. El elevado contenido de compuestos fenólicos y la baja concentración inhibitoria media se le atribuye a la planta de estudio varias propiedades farmacológicas como: antioxidante, antiinflamatoria, etc. (Br, 2013, p.64)

El presente estudio tiene como objetivo determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de flores de *Oreocallis grandiflora* en *Rattus norvegicus* y medir la concentración de electrolitos presentes en orina después de la administración del extracto en un periodo de 6 horas.

Esta determinación podría medir el potencial medicinal a nivel renal, con lo cual podríamos brindar alternativas terapéuticas a través de fitomedicamentos para las personas que padecen enfermedades renales o arteriales y que han encontrado efectos adversos con el uso de medicamentos sintéticos como la furosemida proporcionando al paciente una mejor calidad de vida.

## CAPITULO I

### 1 MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Diuréticos:

Los diuréticos son fármacos que promueven la diuresis, decreciendo la reabsorción y aumentando la eliminación de agua y sodio por la orina. (Mora, 2015, a: p.29)

La principal función de los diuréticos se dirige al tratamiento de edemas, sin embargo, directa o indirectamente pueden modificar otros iones y alterar funciones del organismo, por lo que resultan útiles en otro tipo de enfermedades como:

- La hipertensión arterial,
- La hipercalcemia,
- La diabetes insípida,
- El glaucoma,
- Las intoxicaciones, entre otras. (Machín and Morón Rodríguez, 2011, a: p.2)

A estos elementos, su uso es limitado ya que produce una amplia gama de efectos secundarios que se enuncia a continuación:

- Hipopotasemia,
- Hipocalcemia,
- Hipomagnesemia,
- Hiperuricemia,

- Hipernatremia,
- Deshidratación y,
- Ototoxicidad.

De la revisión bibliográfica analizada (Ding et al., 2016, a, p.3); los principales síntomas de los diuréticos son:

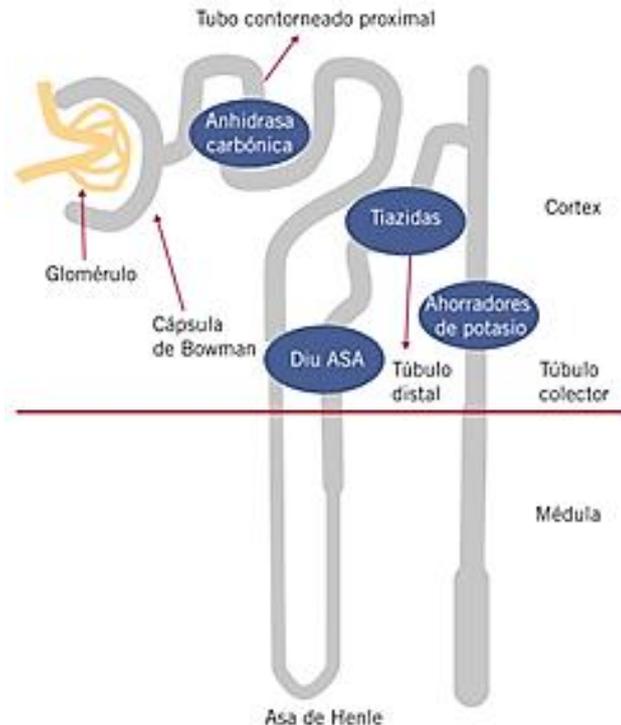
- Mareos,
- Dolor de cabeza y,
- Trastornos gastrointestinales.

### ***1.1.1 Diuresis:***

La diuresis se produce por la modificación del transporte iónico a lo largo de la nefrona, lo que hace posible determinar su efectividad, mientras tanto la eficacia dependerá también de la duración del efecto así como de la cantidad de sal ingerida. (Mora, 2015, b: pp.29-30)

Los fármacos diuréticos no solo se restringen a eliminar sodio, a la vez también pueden modificar otros cationes como:  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ , asimismo aniones como:  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $H_2PO_4$  y ácido úrico; además de que suelen alterar directamente la hemodinámica renal. (Machín and Morón Rodríguez, 2011, b, p.3)

La respuesta antinatriurética es un mecanismo compensatorio de sodio, además de que está mediada por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, de igual manera también por el sistema nervioso simpático, por este motivo con las primeras dosis se obtiene como resultado a una eficacia máxima y altos efectos adversos, no obstante, estas alteraciones electrolíticas tienden a minimizarse mientras transcurre el tiempo (en las 4 primeras semanas). (Mora, 2015, c : p.29-36)



**Figura 1-1.** La nefrona y lugar de acción de los diuréticos  
**Fuente:** (Mora, 2015, p.30)

### 1.1.2 Plantas medicinales con acción diurética

Los extractos de varias plantas medicinales pueden producir efecto diurético, causado por principios activos de naturaleza química muy variada. Los principales principios activos que pueden intervenir en la acción diurética son: aceites esenciales, flavonoides, saponósidos, bases xantínicas y sales de potasio. (Pérez *et al.*, 2011, a, p.4)

Desde un punto de vista químico las plantas que presentan actividad diurética se clasifican en:

- **DROGAS CON SAPONÓSIDOS:** poseen propiedades tensioactivas y con llevan a un incremento de la permeabilidad de la membrana filtrante glomerular acompañado de una congestión local.
- **DROGAS CON FLAVONOIDES:** afectan la permeabilidad de la membrana celular, inhiben a la fosfatasa renal, todo ello complementado por el efecto vasoprotector.
- **DROGAS CON BASES XÁNTICAS:** específicas en el edema cardíaco.
- **DROGAS CON GLÚCIDOS:** algunos aumentan la diuresis por mecanismos osmóticos

(manitol) y otros actúan como natriuréticos inhibiendo la reabsorción activa de  $\text{Na}^+$  en el túbulo proximal. (Pérez *et al.*, 2011, b, p.5)

### ***1.1.3 Clasificación de drogas diuréticas***

Tradicionalmente se ha utilizado la clasificación denominada “por el lugar de acción” (donde cada diurético altera la reabsorción de  $\text{Na}^+$ ), dado que éste es un determinante mayor de la potencia del diurético, actualmente se plantea una clasificación mixta que incluye el concepto de eficacia diurética y estructura química. (Fernández-Fresnedo, Sánchez Santiago and Arias Rodríguez, 2003, a, p.1)

#### ***1.1.3.1 Diuréticos de eficacia elevada***

En esta categoría se encuentran los diuréticos de asa que actúan en el segmento ascendente del asa de Henle, la eliminación del ion sodio es superior al 15%. Poseen el máximo efecto diurético y comprenden un conjunto heterogéneo de fármacos entre los más importantes se enuncia los siguientes:

- Sulfamoi benzoatos: (furosemida, bumetanida, piretanida, azosemida);
- El derivado de la sulfonilureas (torasemida);
- El derivado del ácido fenoxiacético (ácido etacrínico) y
- Otros como (etozolina y muzolimina).

Aquellos son fármacos que producen diuresis de corta duración ya que absorben un 25 % de  $\text{Na}^+$  filtrado provocando un rápido incremento de la eliminación urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , además se absorben bien por vía oral con una biodisponibilidad del 50%; inicia su acción por esta vía de 10 a 30 minutos posteriores a su administración y alcanza su máxima actividad de 1 a 2 horas, asimismo su máximo efecto terapéutico tiene una duración de 6 a 8 horas. (National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse, 2009, a, p.5)

Se ha encontrado concordancia entre la eliminación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y el volumen de orina, aproximadamente en similar proporción con valores cercanos a 1 al calcular el cociente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . (Machín and Morón Rodríguez, 2011, c, p.3)

### 1.1.3.2 *Diuréticos de eficacia moderada*

Aquellos diuréticos actúan a nivel del primer segmento de túbulo contorneado distal, y en la porción terminal del segmento diluyente cortical; la eliminación de  $\text{Na}^+$  es del 5 al 10%. A este grupo pertenecen las benzodiazepinas (tiazidas e hidrotiazidas); igualmente la clorotiazida, hidroclorotiazida, metozalona, clortalidona, quinetazona, entre otros diuréticos de eficacia escasa: la fracción de eliminación de  $\text{Na}^+$  es inferior al 5%.

Los diuréticos tiazídicos como la hidroclorotiazida se consideran de primera elección y de uso prioritario en el tratamiento de la hipertensión arterial.

Las tiazidas a diferencia de los diuréticos de asa muestran una actividad farmacológica de 2 horas después de su administración proporcionando un efecto terapéutico más prolongado apreciándose diuresis aun a las 8 horas de tratamiento.

La relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  determinada para este tipo de control en varios estudios indican valores menores a uno, con un incremento de la excreción de potasio en la orina. (Pérez *et al.*, 2011, c, p.4).

### 1.1.3.3 *Diuréticos de eficacia escasa*

Su mecanismo de acción está basado en inhibir los canales de  $\text{Na}^+$  del epitelio renal, este bloqueo puede ser competitivo o no competitivo dando como resultado que la membrana luminal pierda su potencia transmembrana y se hiperpolarise, por otra parte, inhiben la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y reducen la secreción de  $\text{K}^+$ . Producen una saluresis moderada disminución en la eliminación de  $\text{K}^+$  y como consecuencia el pH de la orina es elevado. Se subclasifican en función del sitio de acción en:

- **Diuréticos ahorradores de potasio:** actúan en el último segmento del túbulo contorneado distal y en la porción inicial del túbulo colector, estos fármacos a pesar de ser beneficiosos tienen un débil efecto diurético ya que solo inhiben la reabsorción de un 5% del sodio filtrado por lo que se debe utilizar conjuntamente con otros fármacos para evitar los efectos de hipopotasemia que estos producen. (Fernández-Fresnedo, Sánchez Santiago and Arias Rodríguez, 2003, b, p.48).
- **Inhibidores de la anhidrasa carbónica:** actúan a nivel del túbulo contorneado distal facilitando la eliminación del anión bicarbonato.

- **Agentes osmóticos:** tiene la capacidad de actuar en varios segmentos de la nefrona siendo el principal sitio el asa de Henle y el túbulo proximal, son utilizados en circunstancias de envenenamiento para aumentar la excreción del agente envenenador. (Mora, 2015, d, p.33). (Aziz *et al.*, 2014, p.2).

#### **1.1.4 Diuréticos en la hipertensión arterial:**

Las tiazidas son los diuréticos que más frecuentemente se utiliza en el tratamiento de la hipertensión arterial, la disminución de la tensión arterial se produce a causa de la reducción del volumen plasmático, consecuentemente del gasto cardíaco, aunque instantáneamente se activa el sistema renina angiotensina y el sistema adrenérgico, que ocasiona una recuperación del gasto cardíaco y del volumen extracelular.

Son fármacos que reducen la hipertensión arterial e incrementan el efecto de otros antihipertensivos, tienen una curva plana en relación dosis-respuesta es decir que al incrementar la dosis no resulta proporcional sobre el aumento del efecto antihipertensivo, pero si produce un aumento de los efectos adversos es por ellos que actualmente se recomienda utilizar dosis bajas. (Morales-Olivas, 2013, a, p.16).

### **1.2 Electrolitos sodio, potasio y calcio**

El  $\text{Na}^+$  es un ion que otorga aproximadamente el 80% de la concentración osmolar, y como se encuentra principalmente en el líquido extracelular, su función es asegurar y mantener el volumen de líquido extracelular.

Si los riñones eliminan el exceso de sales de  $\text{Na}^+$  con pérdida simultánea de agua, se generaría una rápida disminución del volumen del líquido extracelular, y a la inversa, la excesiva reabsorción de sales de  $\text{Na}^+$  y agua llevarían rápidamente a un incontrolable edema. (Machín and Morón Rodríguez, 2011, d, p.4).

El  $\text{Na}^+$  es un macromineral que se encuentra en la sal y otros alimentos. Además, este elemento en la dieta puede aumentar la presión arterial de una persona, así que las personas con enfermedades a nivel renal crónicas deberán limitar los alimentos que contengan elevados niveles de  $\text{Na}^+$ .

Entre los alimentos con alto contenido de  $\text{Na}^+$  se encuentra los siguientes elementos como:

- Alimentos enlatados o procesados
- Como comida congelada y hot dogs. (National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse, 2009, b, p.6).

El  $K^+$  cumple un papel importante en la excitabilidad neuromuscular, de ahí que los cambios por aumento o por defecto de sus valores sanguíneos ( $[K^+] = 4.5-5 \text{ mmol/L}$ ), pueden dar como resultado trastornos graves de la conductibilidad y contractibilidad cardiacas. (Machín and Morón Rodríguez, 2011, e, p.4).

La hipocalcemia (descenso del  $Ca^{++}$  sanguíneo) aumenta la excitabilidad neuromuscular. El  $Ca^{++}$  es un elemento químico que al filtrarse en el glomérulo es reabsorbido a lo largo del túbulo renal, a excepción del segmento contorneado distal, donde su reabsorción sucede en presencia de la paratohormona, hormona hipercalcemiente la cual es secretada por las glándulas paratiroides. (Morales-Olivas, 2013, b, p.17).

### 1.3 *Oreocallis grandiflora*



**Figura 2-1:** *Oreocallis grandiflora*  
Realizado por: Angélica Allauca, 2017

Una de las especies de recolección silvestre es el cucharillo o conocida por su nombre científico como *Oreocallis grandiflora*, la flor se considera un ingrediente indispensable para la tradicional bebida conocida como horchata. Esta planta pertenece a la familia milenaria Proteaceae, localizada en la zona andina sur del Ecuador hasta la parte norte del Perú, en el Ecuador se desarrolla a una altura 1000 a 4000 m s.n.m., se ha registrado en las provincias de

Loja, Azuay, Zamora Chinchipe y en Chimborazo desarrollándose naturalmente en bosques y matorrales. (Morocho, 2012, a, p.2).

### 1.3.1 Taxonomía

**Tabla 1-1:** Descripción taxonómica de la *Oreocallis grandiflora*

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

Fuente: (Morocho 2012)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

### 1.3.2 Descripción taxonómica:

#### 1.3.2.1 *Oreocallis grandiflora*

Es un arbusto o árbol recubierto ligeramente por una sustancia de aspecto parecido a la cera que tiene una altura de 3 a 5 m, sus raíces son horizontales, posee un tallo cilíndrico con corteza lisa en plantas jóvenes y rugoso color café oscuro en plantas viejas, en bosques naturales pueden llegar a medir entre 10 y 15 cm. La lámina o el limbo de las hojas es duro y espeso de formas ovadas, el pecíolo es alargado dispuesto en espiral, la cara superior o el haz de la hoja presenta una coloración verde brillante y su envés verde claro o blanquecino. Sus flores crecen en un promedio de 60 a 80 por árbol, presentan coloraciones blancas rojizas o violáceas visibles sobresalientes ante la visibilidad del espectador con aspecto ceroso, el tubo del perianto se abre por un costado en la síntesis, el limbo es globoso con los segmentos separados y recurvados; además de anteras ovadas, disco hipóginio semianular, carnoso y ligeramente lobulado; posee un ovario estipitado con numerosos óvulos imbricados en dos series; estilo largo, oblicuo, disciforme en el ápice y con un pequeño orificio estigmático. El folículo es oblongo-cilíndrico, largamente estipitado, coriáceo, pruinoso, y mide entre 7 y 10 cm. (Morocho, 2012, b, p.6).

### 1.3.3 Usos terapéuticos:

*Oreocallis grandiflora* es un arbusto con estudios fitoquímicos escasos, se ha encontrado únicamente información etnobotánica preliminar que manifiesta el uso de flores, corteza y hojas

en infusión acuosa para usos terapéuticos como: dolor de cabeza, dolores hepáticos, diabetes, fiebre, problemas del riñón, y tos. (Tene *et al.*, 2007, a, p.74)

Se utiliza la decocción de flores para tratar hemorragias a nivel vaginal, de ovario e inflamación del útero. (Monigatti, Bussmann and Weckerle, 2013, p.9), (Bussmann and Glenn, 2010, p.9)

Además, se utiliza las flores por administración oral para el tratamiento de enfermedades más comúnmente presentes en la provincia de Loja a nivel del sistema respiratorio, sistema genitourinario, sistema digestivo y está relacionado a síndromes ligados al cultivo ("mal de ojo", "malvado aire", y "calor encerrado"). (Tinitana *et al.*, 2016, b, p.13)

#### **1.4 Compuestos fenólicos:**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios provenientes de las plantas, estos compuestos cumplen un rol importante en el crecimiento y reproducción, proporcionando protección contra patógenos y depredadores, además de contribuir al color y características sensoriales de frutas y vegetales. (Balasundram, 2006, a, p.2)

Los compuestos fenólicos a concentraciones bajas pueden actuar como antioxidantes, sin embargo, a concentraciones altas sus productos de concentración pueden interactuar con carbohidratos, proteínas y minerales. (Taylor and Karakaya, 2010, a, p.2).

Abarcan un grupo extenso y diverso de compuestos aromáticos caracterizados por presentar en su estructura un anillo de benceno y uno o más grupos hidroxilos. Generalmente la clasificación de los compuestos fenólicos se basa en el número de átomos de carbono presentes en la molécula. (Bhattacharya, Sood and Citovsky, 2010, a, p.2)

Los fenoles son compuestos importantes ya que contribuyen a la salud humana y a sus múltiples efectos biológicos tales como: actividad antioxidante, antimutagénica, anticarcinógena, antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotectora y vasodilatadora. (Bhattacharya, Sood and Citovsky, 2010, b, p.3)(Taylor and Karakaya, 2010, b, p.3)

##### ***1.4.1 Clasificación de los compuestos fenólicos***

Aunque existe una gran variedad de fenoles, la mayoría de estos compuestos surgen de los aminoácidos fenilalanina o tirosina. Estos aminoácidos son desaminados e ingresan a las diferentes rutas biosintéticas. Un paso clave en la ruta biosintética es la introducción de uno o

más grupos hidroxilos en el anillo fenilo como resultado, se deriva un esqueleto de carbono común: la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> fenilpropanoide. (Pereira *et al.*, 2009, a, p.2)

Los fenoles se clasifican en función de su origen, existen tres diferentes rutas biosintéticas: la ruta shikimato que produce los derivados fenilpropanoides, el acetato/malonato que produce los fenilpropanoides alargados de cadena lateral, incluyendo el grupo grande de flavonoides y algunas quinonas y la vía de acetato/mevalonato, que produce los terpenoides aromáticos, en su mayoría monoterpenos, por reacciones de deshidrogenación. (Bhattacharya, Sood and Citovsky, 2010, c, p.4)

#### **1.4.2 Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos:**

Los compuestos fenólicos se encuentran en alimentos, bebidas y plantas en diversas formas químicas que determinan su absorción a nivel intestinal. Entre los factores que pueden afectar su absorción y con ellos la biodisponibilidad tenemos: la conjugación con otros compuestos fenólicos, el grado de glicosilación/acilación, el tamaño de la molécula, y el coeficiente de partición. (Balasundram, 2006, b, p.194)

El coeficiente de partición desempeña un papel importante en la absorción de compuestos fenólicos que no tiene ningún sustituto de azúcar o ácidos orgánicos en sus estructuras. Es importante para determinar si un compuesto se difundirá pasivamente a través de una membrana biológica y cumple un rol eficaz en la absorción de compuestos fenólicos hidrófobos que tienen sustituciones de azúcar o ácidos orgánicos y ligados a esteres en su estructura, mientras que los fenoles hidrófilos de estructura similar se degradan por esterases producidas por la microflora del colon. (Scalbert and Williamson, 2000, a, p.7)

El número de moléculas de azúcar parece desempeñar un papel importante en la absorción de compuestos fenólicos. Si los compuestos fenólicos contienen una molécula de azúcar como: glucosa, galactosa o xilosa, se absorberá a través del intestino delgado por medio de la enzima citosólica-glucosidasa. La absorción también se relaciona con la especificidad de los portadores. (Taylor and Karakaya, 2010, c, p.462)

Los compuestos fenólicos que tienen en su estructura ramnosa no se absorben a nivel del intestino delgado, se degradan en el colon ya que las enzimas ramnosidasas que degradan estos compuestos se localizan a este nivel.

#### ***1.4.3 Actividad antioxidante de los fenoles***

Los compuestos antioxidantes de origen natural son flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y ácidos orgánicos polifuncionales, entre otros. Las fuentes de antioxidantes naturales son principalmente fenólicos vegetales que pueden ocurrir en todas las partes de las plantas. Se pueden encontrar en frutas, verduras, nueces, semillas, hojas, harinas, raíces y cortezas. (Balasundram, 2006, c, p.198)

Estos compuestos muestran una amplia gama de actividades antioxidantes in vitro y se cree que ejercen efectos protectores contra enfermedades como: el cáncer, enfermedades cardiovasculares. El estrés oxidativo impuesto por las especies reactivas del oxígeno (ROS) juega realmente un papel crucial en la fisiopatología asociada con la neoplasia, la aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. (Shahidi and Ambigaipalan, 2015, a, p.10)

#### ***1.4.4 Mecanismo de acción de antioxidantes fenólicos***

El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos radica en el número y disposición de los grupos hidroxilos en las moléculas de interés. Los antioxidantes fenólicos (AH) pueden donar átomos de hidrogeno a los radicales lipídicos dando como producto derivados de compuestos lipídicos y radicales antioxidantes, que estarán más estables y menos disponibles para promover autoxidación.

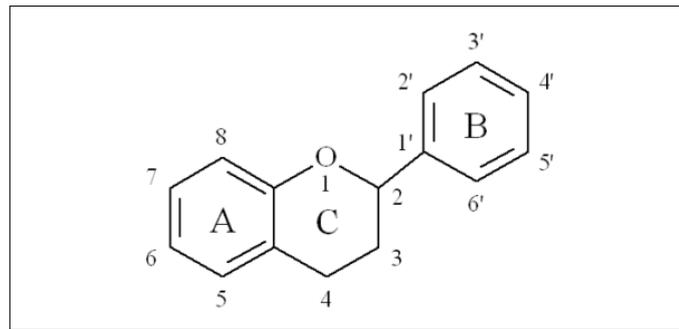
El efecto de la concentración de antioxidantes depende de muchos factores, incluyendo la estructura del antioxidante, las condiciones de oxidación y la naturaleza de la muestra. A menudo, los antioxidantes fenólicos pierden su actividad a altas concentraciones y se comportan como pro-oxidantes por su participación en las reacciones de iniciación.

Los antioxidantes fenólicos son más eficaces en extender el período de inducción cuando se añaden a cualquier aceite que no se ha deteriorado en gran medida. Sin embargo, son ineficaces para retardar la descomposición de lípidos ya deteriorados. (Shahidi and Ambigaipalan, 2015, b, p.3)

#### ***1.4.5 Flavonoides***

Los flavonoides forman parte de los compuestos fenólicos, pertenecientes a la categoría de polifenoles. Son sustancias hidroxiladas y se sabe que son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección microbiana. Los científicos han descubierto más de 7000 flavonoides y la lista de nuevos flavonoides sigue creciendo. (Thilakarathna, et al, 2013, a, p.2)

La estructura química de los flavonoides consta de dos anillos de benceno, unidos a través de una pirámide heterocíclica. Se dividen en 6 clases comunes: flavonas (por ejemplo, flavona, apigenina y luteolina), flavonoles (por ejemplo, quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina), flavanonas (por ejemplo, flavanona, hesperetina y naringenina), isoflavonas, flavan-3-ols (taninos monoméricos y condensados) y antocianinas, la mayoría de estos compuestos se encuentran como glucósidos a excepción de los flavan-3-ols. (Kumar, et al, 2013, a,p.2)



**Figura 3-1:** Estructura química general de los flavonoides.  
Fuente: (Kumar & Pandey 2013)

#### 1.4.6 Acción farmacológica de los flavonoides

Los flavonoides tienen una amplia gama de actividades biológicas como: antiinflamatorios, anticancerosos, cardioprotectores, antioxidantes, hepatoprotectores, antimicrobiano, antiviral, antialérgicos, vasodilatadores, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y efecto diurético principalmente atribuida por la presencia de compuestos polifenólicos principalmente flavonoides y derivados del ácido cafeico. Se informó que inhiben diversas enzimas como hidrolasas, hialuronidasa, lipasa, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa y quinasa. (Balasundram, 2006, d, p.5)

#### 1.4.7 Biodisponibilidad de los flavonoides

Existen números factores que afectan la biodisponibilidad de los flavonoides, entre estos factores podemos mencionar la absorción que juega un papel fundamental: la estructura química, peso molecular, glicosilación y esterificación.

- El peso molecular es un factor importante que afecta a la absorción y por tanto está directamente relacionada con la biodisponibilidad de ciertos flavonoides , por ejemplo para las proantocianidinas de alto peso molecular la absorción sería prácticamente imposible.(Thilakarathna and Rupasinghe, 2013, b, p.3378)

- La absorción de algunos glicósidos puede ser muy rápida, algunos pueden ser muy lentos y por tanto afectaran la biodisponibilidad.
- Una vez ingeridos los flavonoides interactúan con las enzimas de conjugación humana en los enterocitos y en el hígado. La conversión metabólica es el principal factor que afecta la biodisponibilidad de flavonoides. La sulfatación, la metilación y la glucoronidación se producen en los enterocitos y en el hígado y, en general, la mayoría de los flavonoides experimentan estas conversiones metabólicas. (Mullen, Edwards and Crozier, 2017, p.2)
- La interacción de los compuestos flavonoides con la microflora colónica influyen en la biodisponibilidad. Se ha descrito en artículos científicos que una cantidad significativa de los flavonoides ingeridos no fueron absorbidos en el intestino delgado, llegando al intestino grueso y se degradaron por la microflora colónica en ácidos fenólicos simples que fueron absorbidos en el sistema circulatorio, lo ideal para mejorar la biodisponibilidad seria cambiar el sitio de absorción del intestino grueso a que se pueda absorber en el intestino delgado (Rezzi, 2012, p.4781)

### 1.5 *Rattus norvegicus*



**Figura 4-1.** *Rattus norvegicus*

**Fuente:** (Hau & Hoosier n.d, 2003, p.359)

Son consideradas como especies numerosas de ratones y son utilizados como animales de experimentación que presenta pelaje grueso y áspero con orejas prominentes y cola sin pelaje prácticamente desnuda; la cola es más corta en comparación con el cuerpo. En promedio estas

llegan a medir 400 mm haciendo referencia que la medida es de nariz a cola y su peso varía entre 140 hasta 500 g. (Medellín et al. 2005)

Las ratas de sexo masculino se caracterizan por presentar un tamaño mayor en comparación a las hembras, en general presenta una coloración gris o café en las partes superiores mientras que el vientre es de color claro grisáceo, existen cepas criadas en cautiverio que pueden adquirir color marrón, negro o blanco.

### 1.5.1 Información taxonómica:

**Tabla 2-1:** Información taxonómica de *Rattus norvegicus*:

|                   |                          |
|-------------------|--------------------------|
| Reino             | Animalia                 |
| Phylum            | Chordata                 |
| Clase             | Mammalia                 |
| Orden             | Rodentia                 |
| Familia           | Muridae                  |
| Nombre científico | <i>Rattus norvegicus</i> |
| Nombre común      | Rata noruega             |

Fuente: (Rat 2016)

Realizado por: Angelica Allauca, 2017

### 1.5.2 Inmovilización del animal



**Figura 5-1:** Técnica de sujeción de ratas con dos manos

Fuente: (Hau & Hoosier n.d. 2013, p.360)

Las ratas responden adecuadamente a la manipulación suave. Su inclinación al esconderse y entrar en pequeños orificios se puede utilizar para tener una moderación adecuada. No se recomienda guantes pesados debido a la disminución de manejabilidad del manipulador como también por peligro a que los animales se rasguen las uñas de los pies.

Un animal agresivo o nervioso puede ser agarrado con una toalla o franela. Las ratas pueden ser manejadas por la cola para el inicio de la sujeción, pero se debe tener cuidado al manejar cerca de la punta de la cola ya que se puede romper su piel. En general, las ratas se sienten incómodas al ser agarradas por la cola por lo que esta técnica únicamente se utiliza para transferencia rápida de un lado a otro. (Diehl *et al.*, 2001, a, p.19)

Las ratas colocadas sobre una superficie sólida como el antebrazo del manipulador se pueden agarrar fácilmente. No se recomienda colocarlas sobre las celdas de alambre ya que su sujeción es muy fuerte pudiendo dañar las uñas de los animales, Para realizar procedimientos que requieren un control directo de la cabeza, las ratas pueden ser capturadas por el cuello.

La piel sobre el cuello, incluida la piel en la base de las orejas, están firmemente sostenidas por el dedo índice y el pulgar para controlar la cabeza, y la piel de la espalda es sostenida por los otros tres dedos. Se cuida que el agarre no restrinja la capacidad de la rata para respirar. (Hau and Hoosier, 2003, a, p.358)

### ***1.5.3 Volúmenes de dosificación para diferentes vías de administración***

La dosificación del animal de experimentación debe tener exactitud y precisión como también ser la más apta para cuidar su bienestar ya que volúmenes elevados podrían restringir la validez científica por reacciones a nivel fisiológico como a la vez dañar el bienestar biológico de los animales de experimentación.

Las administraciones de grandes volúmenes pueden sobrecargar el estómago produciendo reflujo esofágico causando neumonía aguda o puede pasar inmediatamente al intestino delgado alterando los resultados de la investigación. (Diehl *et al.*, 2001, b, p.16)

La siguiente tabla muestra los volúmenes de administración para las vías comúnmente empleadas en las especies más frecuentemente utilizadas

**Tabla 3-1:** Calibre de aguja y volumen de dosificación recomendado para diferentes vías de administración.

| Especie                   | Subcutánea       |              | Intraperitoneal  |              | Intramuscular    |                | Oral             |              |
|---------------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|----------------|------------------|--------------|
|                           | Calibre de aguja | Volumen (mL) | Calibre de aguja | Volumen (mL) | Calibre de aguja | Volumen (mL)   | Calibre de aguja | Volumen (mL) |
| Ratón 25 g                | 25               | 0,25         | 25               | 0,5          | 27               | 0,05 por sitio | 20               | 0,25         |
| Rata 200 g                | 25               | 1            | 25               | 2            | 25               | 0,1 por sitio  | 18               | 2            |
| Conejillo de indias 200 g | 23               | 1            | 25               | 2            | 25               | 0,1 por sitio  | 18               | 2            |
| Conejo 4 Kg               | 23               | 4            | 23               | 20           | 25               | 1              | 13 o 8           | 15           |
| Cerdo 25 Kg               | 22               | 25           | 20               | 25           | 23               | 6,25           | 22               | 150          |

Fuente: (Hau and Hoosier, 2013, b, p.373)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

En la planificación de un protocolo de dosificación se debe considerar la frecuencia de dosificación, volumen, pH y el vehículo (acuoso u oleoso). Los animales no son anestesiados antes de la dosificación, porque el mantenimiento de los reflejos de la mordaza son importantes para detectar la colocación apropiada del tubo y disminuir las posibilidades de reflujo y aspiración después de la dosificación. (Laboratory Animals, 2001, a, p.5)

#### **1.5.4 Factores que pueden influir en la biodisponibilidad**

##### **1.5.4.1 Vehículo:**

Es un factor importante en todas las investigaciones con animales. Deben ofrecer una exposición óptima, pero no deben influir en los resultados, y como tales, deberían idealmente ser biológicamente inertes, no tener efecto sobre las propiedades biofísicas del compuesto y no tener efectos tóxicos sobre los animales. Los vehículos utilizados son: soluciones, sistemas co-disolventes, suspensiones y aceites. (Diehl *et al.*, 2001, c, p.17)

##### **1.5.4.2 Tasa de absorción:**

El efecto terapéutico o toxicológico de una sustancia puede estar directamente relacionada con su tasa de absorción, la cual se encuentra influenciada por propiedades físicas como: conformación molecular, carga, tamaño de partícula, solubilidad lipídica, estructura cristalina, tasa de desintegración, forma salina, grado de ionización. Además, dependerá de la vía de administración. (Laboratory Animals, 2001, b, p.5)

#### *1.5.4.3 Factores externos:*

Variación en la temperatura ambiental, estado nutricional y en el momento de aplicar las dosis respecto al ritmo circadiano, el cual normalmente está controlado por el ciclo de luz/oscuridad. (Escobedo *et al.*, 2011, a, p. 6)

#### *1.5.4.4 Habitación y adiestramiento:*

Existen animales que pueden tener poca o ninguna experiencia acerca de ser inmovilizados o manejados, de modo que es probable, que se encuentren asustados e inquietos en la primera ocasión. Esta hace que sea difícil el manejo para el operario y se vuelve un procedimiento estresante para el animal con lo cual es muy probable que los resultados se vean alterados por variaciones relacionados con el estrés. (Laboratory Animals, 2001, c, p.7)

#### *1.5.4.5 Irritante/pH:*

La sustancia administrada puede causar daños en piel, tejidos, músculos o membranas mucosas. Se puede observar en dependencia de la vía de administración. Se recomienda un pH neutro entre 4.5 y 8, ya que los extremos bajo o alto son perjudiciales para los tejidos. El orden de tolerancia del pH en dependencia de su vía de administración es: oral >intravenosa >intramuscular>subcutánea. Hay que considerar que el pH no es el único indicador irritante, ya que también depende del punto de ionización (pK) y de la concentración de los compuestos. (Laboratory Animals, 2001, d, p.11)

### ***1.5.5 Vías de administración:***

#### *1.5.5.1 Intramuscular:*

Se sujeta a la rata y se inyecta en los miembros posteriores, introduciendo la aguja en forma paralela al fémur, las agujas utilizadas son las de calibre 25 y 27. En estudios de dosis múltiple los sitios de administración deben ser rotados además es necesario considerar la aparición de inflamación y secuelas. (Diehl *et al.*, 2001, d, p.17)

#### *1.5.5.2 Intraperitoneal:*

Se basa en colocar el medicamento por vía abdominal. La cavidad abdominal imaginariamente se divide en 4 secciones y la aplicación de la inyección se realiza en las dos regiones

posteriores, inclinando al animal hacia el cráneo e introduciendo la aguja en un ángulo de 35° aproximadamente para no tocar las vísceras y causar peritonitis mortal. (Escobedo *et al.*, 2011, b, p.8)

#### *1.5.5.3 Subcutánea:*

Se estira la piel del abdomen o dorso del animal y se introduce la aguja esta vía de administración es muy utilizada. (Diehl *et al.*, 2001, e, p.16)

#### *1.5.5.4 Intravenosa:*

Las venas de la cola (son tres) se dilatan con un poco de agua caliente. Se localiza una de estas venas para realizar la administración. Para esta ruta debe distinguirse entre inyección en bolo, inyección intravenosa lenta o infusión intravenosa. (Escobedo *et al.*, 2011, c, p.17)

#### *1.5.5.5 Vía oral:*

Se sujeta al animal en forma vertical, se coloca la sonda o cánula en la boca y se le introduce con movimientos suaves observando el movimiento de deglución del animal, se administra el volumen requerido y posteriormente se extrae con movimientos firmes y suaves. (Escobedo *et al.*, 2011, d, p.18)

En ocasiones, es necesario restringir la ingesta de alimentos de los animales antes de la dosificación. Este factor puede afectar la absorción. Se ha demostrado que grandes volúmenes de dosis (40 mililitros por kilogramo) sobrecargan la capacidad del estómago y pasan inmediatamente al intestino delgado. (Diehl *et al.*, 2001, f, p.16)

## CAPITULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Lugar de investigación

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales y en el Bioterio de la Facultad de Ciencias en la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2 Recolección del material vegetal

Las flores de *Oreocallis grandiflora* fueron recolectadas al sur del Ecuador en la provincia de Loja a 1451 m.s.n.m. en el cantón Olmedo, en las siguientes coordenadas:

Latitud: 3°56'24.67" S

Longitud: 79°35'54.803" O

#### 2.3 Identificación del material vegetal

Previo a su identificación se recolecto la planta y se colocó en papel periódico, entre dos tablas triplex sus hojas con el envés hacia arriba y las flores totalmente extendidas bajo presión. Una vez seca se llevó para su identificación al herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a cargo del Ing. Jorge Caranqui para su respectiva identificación.

#### 2.4 Materiales, equipo y reactivos:

Los materiales, equipos y reactivos utilizados en la presente investigación se detallan a continuación:

#### **2.4.1 Material vegetal**

Para esta investigación se utilizó las flores de *Oreocallis grandiflora*. La planta fue secada en la estufa a 120 ° por 12 horas y triturada hasta obtener pequeñas partículas entre 2 a 3 milímetros, denominándose material vegetal seco y triturado el cual se utilizó en los parámetros físicos químicos como también para determinar la actividad diurética.

El material vegetal triturado fue almacenado en fundas de papel las cuales fueron selladas herméticamente con cinta adhesiva.

#### **2.4.2 Material biológico**

Ratas (*Rattus norvegicus*) pertenecientes al Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### **2.4.3 Fármaco de referencia**

Se utilizó Furosemida como control positivo comparativo en el ensayo para determinar la actividad diurética.

#### **2.4.4 Materiales de laboratorio.**

**Tabla 1-2: Materiales**

| <b>MATERIALES</b>        |
|--------------------------|
| Cápsulas de porcelana    |
| Reverbero                |
| Espátula                 |
| Crisoles de porcelana    |
| Picnómetro               |
| Vidrio reloj             |
| Varilla de agitación     |
| Piseta                   |
| Pinzas para cápsula      |
| Frascos ámbar de 1000 MI |
| Trípode                  |
| Embudo                   |

|                                   |
|-----------------------------------|
| Vasos de precipitación de 250 MI  |
| Tubos de ensayo                   |
| Gradilla                          |
| Pipetas de 10mL, 5mL y 1 mL       |
| Embudo de separación              |
| Kitasato de 500 MI                |
| Embudo Büchner                    |
| Probeta de 50 mL                  |
| Probeta de 10 mL                  |
| Micropipeta automática de 1000 uL |
| Micropipeta automática de 100 uL  |
| Puntas azules de 1000 uL          |
| Puntas amarillas de 100 uL        |
| Pipetas Pasteur                   |
| Balones aforados de 25 mL         |
| Balones aforados de 10 mL         |
| Animal Feeding needle curved 18 G |
| Cofia                             |
| Guantes                           |
| Mascarilla                        |
| Jaula metabólica                  |
| Mandil                            |
| Mortero con pistilo               |
| Papel filtro                      |
| Papel aluminio                    |
| Pera de succión                   |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

#### 2.4.5 Equipos

**Tabla 2-2: Equipos**

| <b>EQUIPOS</b>                 |
|--------------------------------|
| Molino Arthur H.Thomas C.O     |
| Estufa Memmert SNB400          |
| Mufla IVYMEN N 8 LITROS 1100°C |
| Desecador                      |

|   |
|---|
| Sonicador Marca Branson 2510                      |
| Balanza analítica Radwag                          |
| Congelador  |
| Rotavapor BUCHI R110 & B 465 Water Bath           |
| Vórtex mixet MRC S1 – 100                         |
| Liofilizador Thermo Scientific                    |
| pH-metro  |
| Bomba de vacío                                    |
| Refractómetro                                     |
| Cámara UV Chromato vue modelo cc20                |
| Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220 |
| Cronómetro  |

**Realizado por:** Angélica Allauca, 2017

#### 2.4.6 *Reactivos*

**Tabla 3-2:** Reactivos

| <b>REACTIVOS</b>                  |
|-----------------------------------|
| Reactivo Mayer                    |
| Reactivo de Wagner                |
| Reactivo de Dragendorff           |
| Reactivo de Baljet                |
| Reactivo de catequinas            |
| Reactivo de Fehling               |
| Reactivo de resinas               |
| Reactivo de Liberman Burchard     |
| Reactivo de Borntrager            |
| Reactivo de FeCl <sub>3</sub>     |
| Reactivo de antocianidinas        |
| Reactivo de Shinoda               |
| Magnesio metálico                 |
| Cloruro de sodio                  |
| Etanol 70 %                       |
| Agua destilada                    |
| Soluciones estándar de quercetina |
| Metanol 98%                       |

|                               |
|-------------------------------|
| Nitrito de sodio al 5%        |
| Tricloruro de aluminio al 10% |
| Hidróxido de sodio 1 M        |
| Soluciones de ácido gálico    |
| Reactivo de Folin-Ciocalteu   |
| Carbonato sódico 7,5%         |
| Solución DPPH                 |
| Solución de furosemida        |
| Carboximetil celulosa sódica  |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

## 2.5 Técnicas y métodos

### 2.5.1 Control de calidad de droga cruda

Los parámetros físicos son útiles en la identificación y detección de constituyentes presentes en las plantas. Se realizó por triplicado los siguientes parámetros: humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico

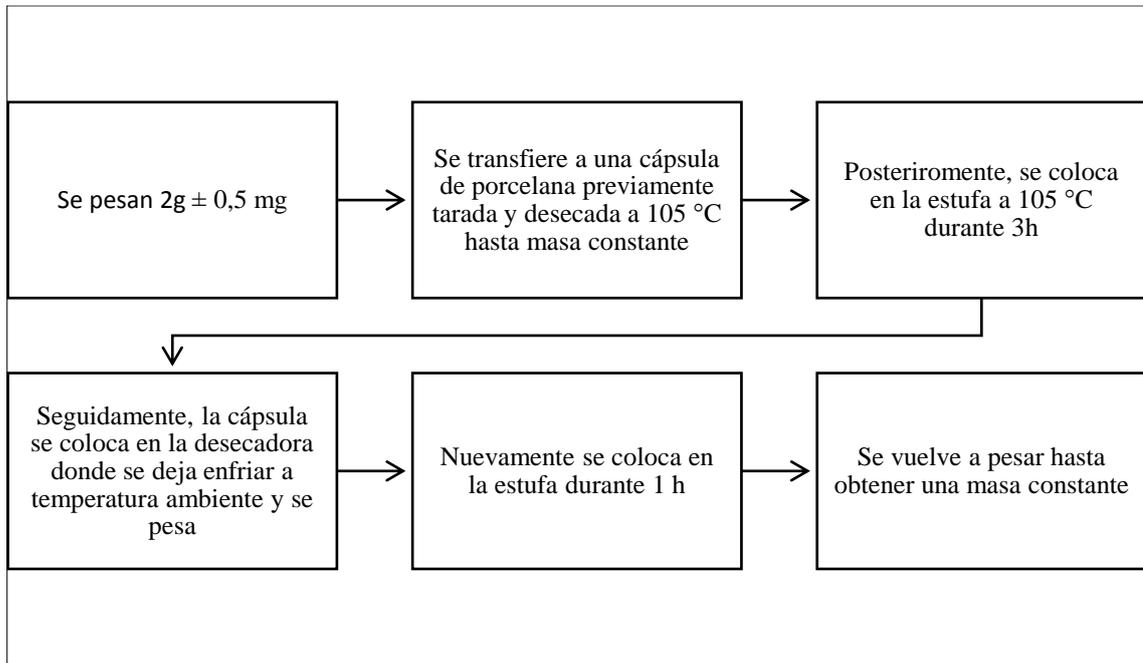
#### 2.5.1.1 Determinación del contenido de humedad

El elevado contenido de agua en el material vegetal estimula el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro del mismo por procesos de hidrólisis. Es un parámetro importante para vegetales que absorben humedad fácilmente o se deterioran rápidamente en presencia de agua. (Ahmad *et al.*, 2014, a, p.6)

Los límites de agua usualmente establecidos en las farmacopeas oscilan entre 8 a 14% con pocas discrepancias entre ellas, aunque de manera general una droga vegetal debe contener un contenido de humedad menor a 10%. (Villar, 1994, p.72)

Para determinar el contenido de humedad se han propuesto tres métodos: Método I (Volumétrico), el Método II (Azeotrópico) y el Método III (Gravimétrico). (Ame *et al.*, 2007, A, P.422)

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL:



**Figura 1-2:** Procedimiento para determinar el contenido de humedad, utilizando el método gravimétrico

Fuente: (Miranda, 2006, P.38-64)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

#### CÁLCULOS:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} * 100 \quad \text{Ecuación (1).}$$

Donde:

Hg=porcentaje de pérdida de peso por desecación

M<sub>2</sub>= peso en gramos de la muestra de ensayo más la cápsula

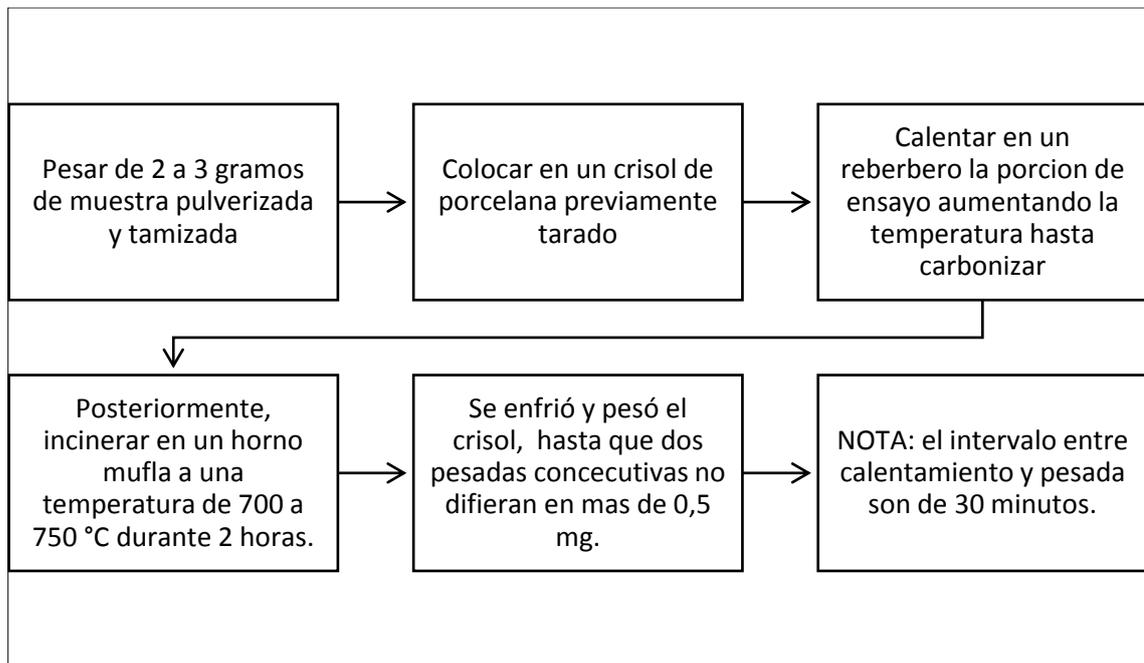
M<sub>1</sub>=peso en graos de la muestra de ensayo desecada más la cápsula

M=masa de la cápsula vacía

100=factor matemático

#### 2.5.1.2 Determinación de cenizas totales:

Metodología experimental:



**Figura 2-2:** Procedimiento para determinar cenizas totales

Fuente: (Miranda, 2006, p.38-64)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

#### CÁLCULOS:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

*Ecuación (2).*

Donde:

C= porcentaje de cenizas totales

M= peso en gramos del crisol vacío

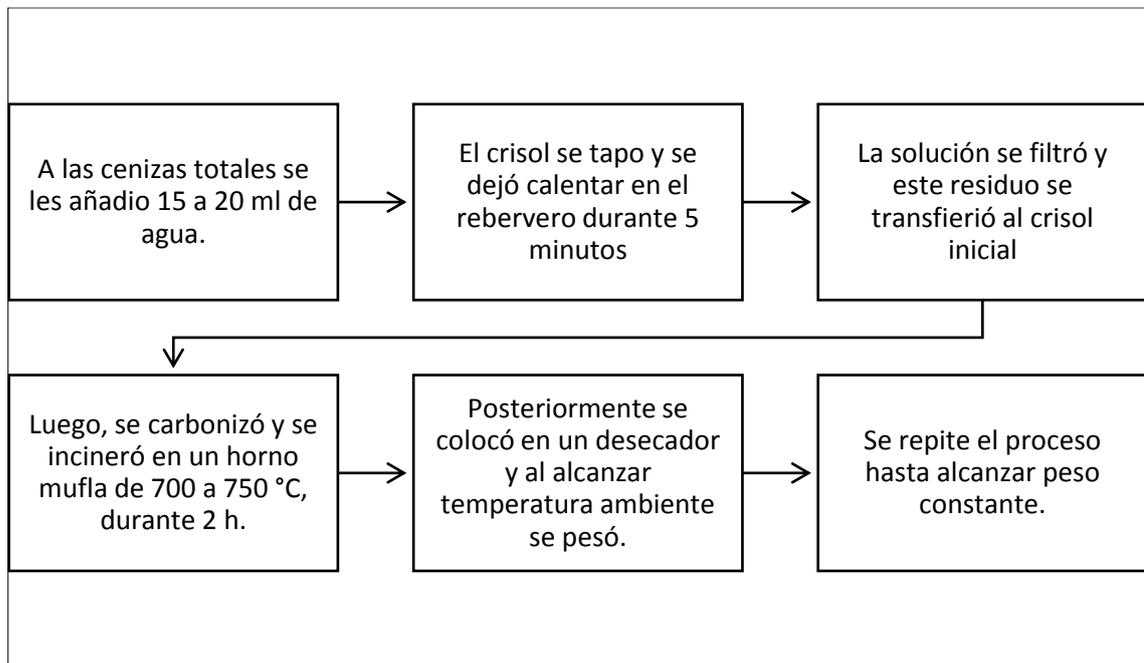
M<sub>1</sub>=peso en gramos de la porción de ensayo más el crisol

M<sub>2</sub>=peso de la ceniza más el crisol

100=factor matemático

#### 2.5.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua

#### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL:



**Figura 3-2:** Procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas solubles en agua.

Fuente: (Miranda, 2006, p.38-64)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

#### CÁLCULOS:

$$Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} * 100$$

*Ecuación (3).*

Donde:

Ca=porcentaje de ceniza soluble en agua

M<sub>2</sub>= peso en gramos de las cenizas totales más el crisol

M<sub>a</sub>=peso en gramos de las cenizas insolubles en agua más el crisol

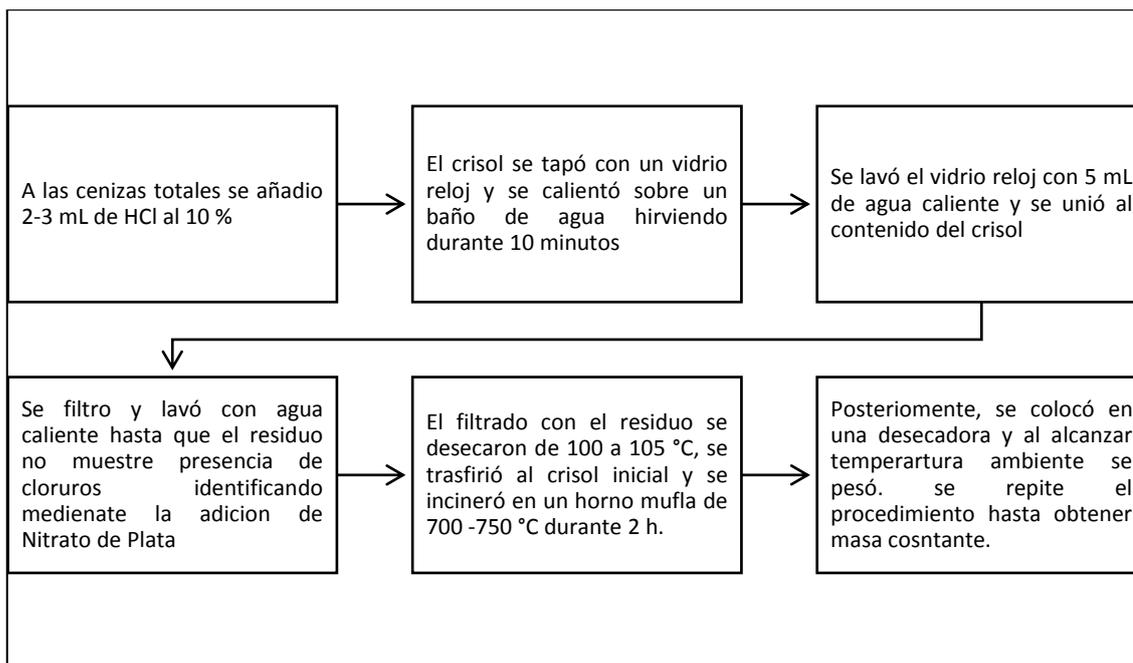
M<sub>1</sub>=peso en gramos de la muestra de ensayo más el crisol

M=masa del crisol vacío

100=factor matemático

#### 2.5.1.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Metodología experimental:



**Figura 4-2:** Procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

**Fuente:** (Miranda, 2006, p.38-64)

**Realizado por:** Angélica Allauca, 2017

## CÁLCULOS:

$$\%Cia = \frac{M2-M}{M1-M} * 100 \quad \text{Ecuación (4).}$$

### Donde:

M2= masa en gramos de la cápsula con las cenizas totales

M1= masa en gramos de la cápsula con la muestra seca

M= masa en gramos de la cápsula vacía

100= factor matemático.

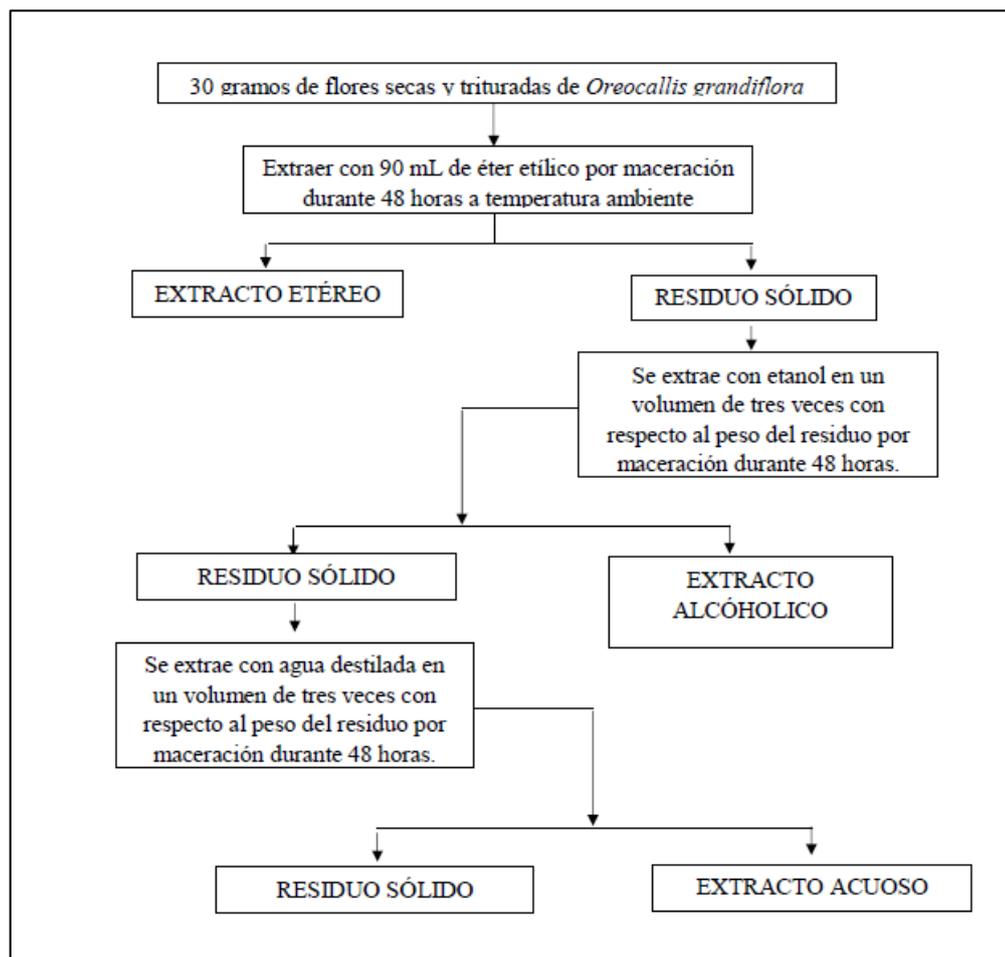
### 2.5.2 Tamizaje fitoquímico:

El tamizaje fitoquímico o screening es una técnica preliminar rápida y sencilla que identifica cualitativamente determinados grupos de compuestos, mediante pruebas de precipitación y de coloración.

Estas reacciones se caracterizan porque detectan la mínima cantidad posible siendo selectivos para determinadas clases y grupos de compuestos en investigación, además se utilizan un reducido número de equipos de laboratorio.

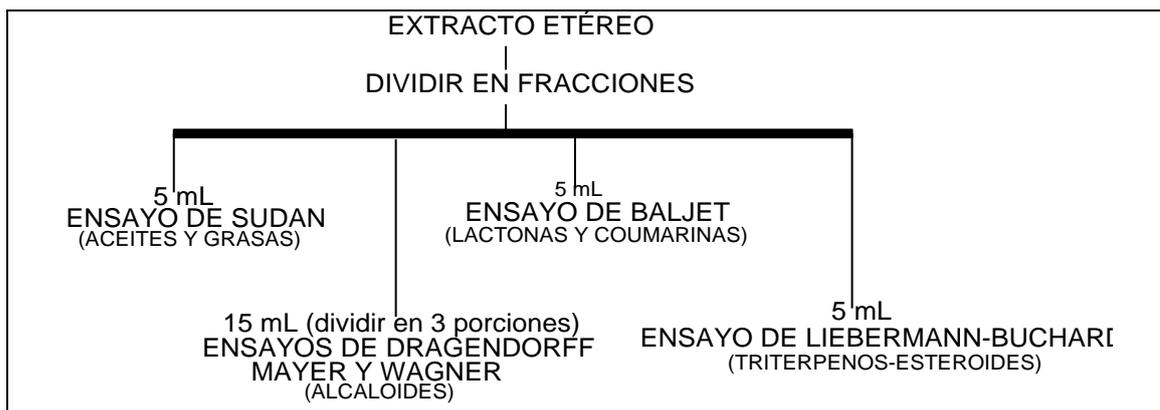
#### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL:

Las flores anteriormente secas y trituradas fueron sometidas a extracciones sucesivas con solventes de mayor a menor polaridad como se muestran en el esquema a continuación basado en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. (Miranda, 2006, a, p.38-64)

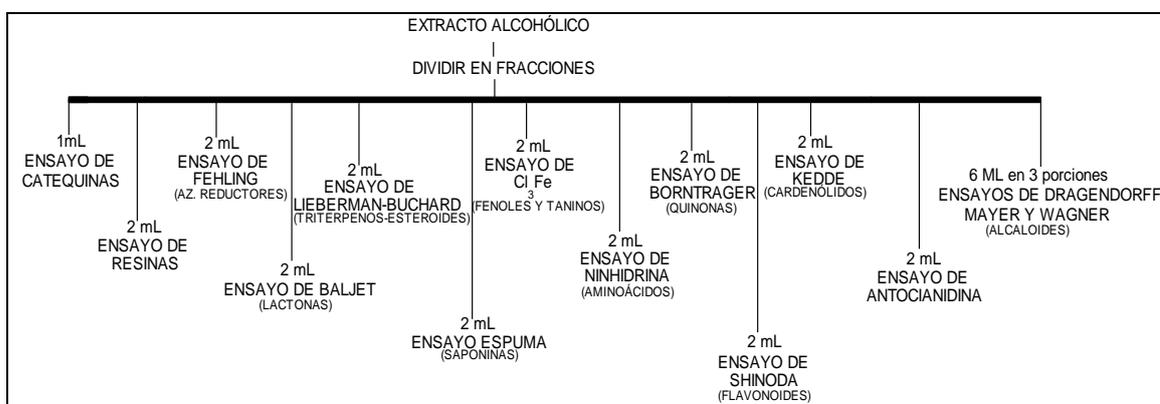


**Figura 5-2:** Extracción sucesiva del material vegetal  
Realizado por: Angélica Allauca, 2017

En cada uno de los extractos obtenidos anteriormente se realizó los siguientes ensayos mencionados basados en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. (Miranda, 2006, b, p.38-64)



**Figura 6-2:** Ensayos para determinar las clases o grupos de compuestos en el extracto etéreo  
**Fuente:** (Miranda, 2006, p.38-64)



**Figura 7-2:** Ensayos para determinar las clases o grupos de compuestos en el extracto alcohólico  
**Fuente:** (Miranda, 2006, p.38-64)



**Figura 8-2:** Ensayos para determinar las clases o grupos de compuestos en el extracto acuoso  
**Fuente:** (Miranda, 2006, p.38-64)

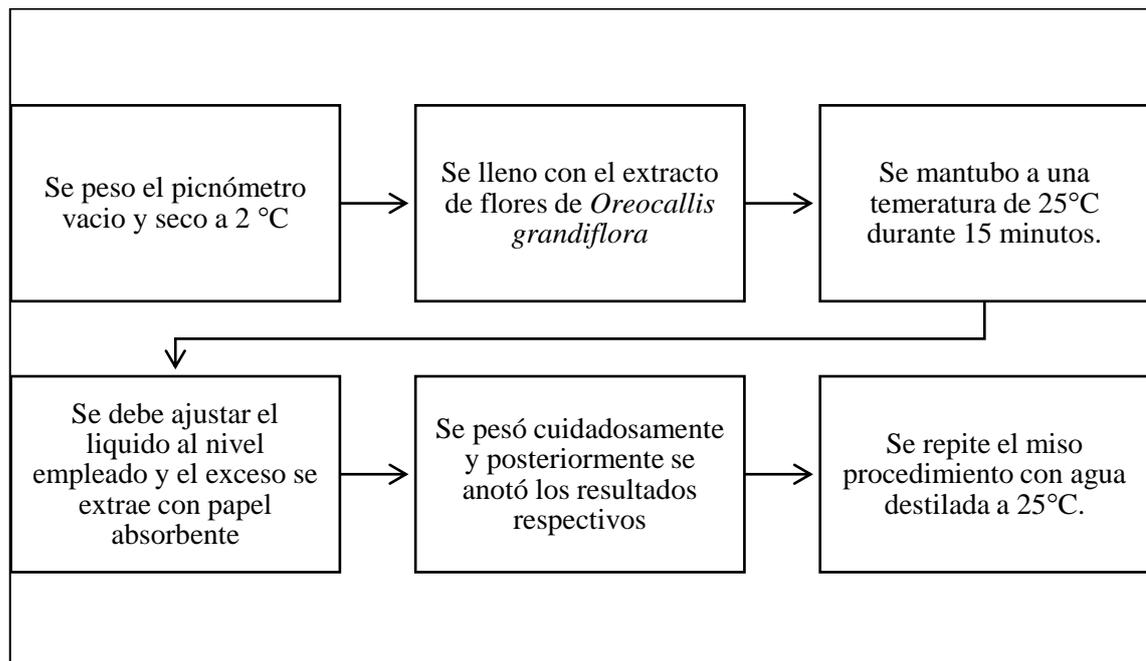
### 2.5.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora*

#### 2.5.3.1 Determinación de requisitos organolépticos

- Determinación de olor: se tomó papel secante en una medida aproximadamente de 10 cm de largo por 1 cm de ancho, posteriormente se introdujo el extremo en la muestra de ensayo y se determinó si el olor corresponde a las características del producto mediante el olfato.
- Determinación del color: en un tubo limpio y seco se colocó la muestra de ensayo hasta completar las tres cuartas partes del mismo, posteriormente se informó los resultados visualizando el color, la transparencia, la separación de capas y la presencia de partículas.

#### 2.5.3.2 Determinación de la densidad relativa:

Metodología experimental:



**Figura 9-2:** Metodología para determinar la densidad relativa

Fuente: (Miranda, 2006, p.38-64)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

CÁLCULOS:

$$D = \frac{M1-M}{M2-M}$$

Ecuación (5).

**Donde:**

M1: peso en gramos del extracto más el picnómetro

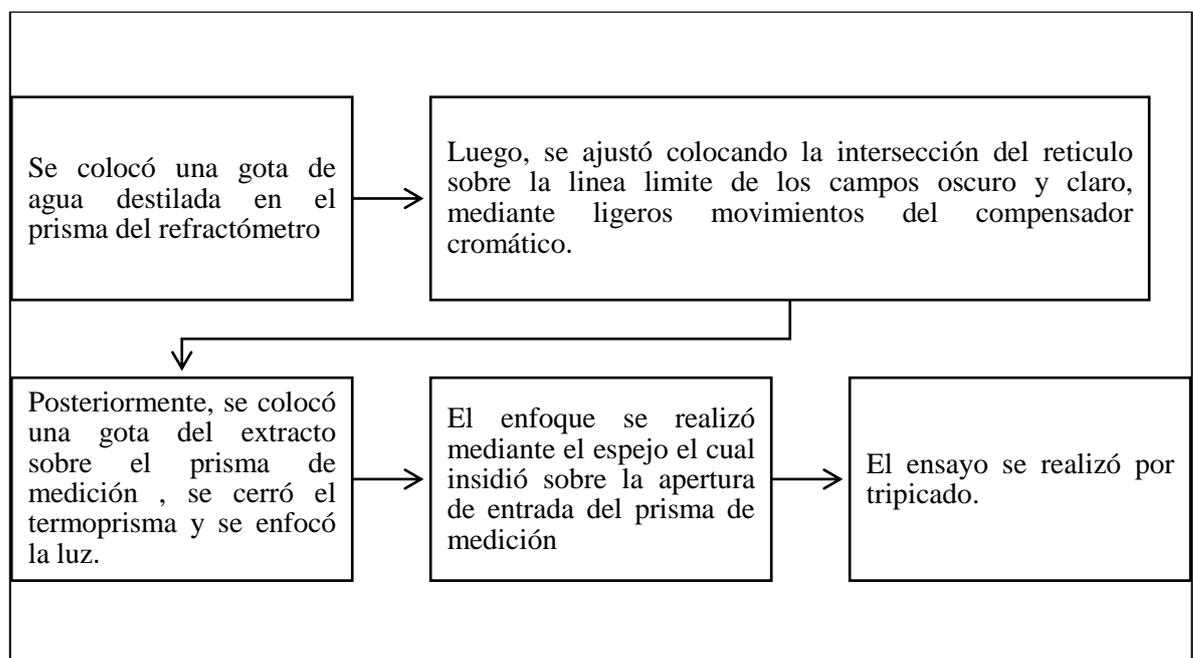
M2: peso en gramos del picnómetro conjuntamente con el agua

M: peso en gramos del picnómetro vacío

**2.5.3.3 Determinación del índice de refracción:**

El índice de refracción constituye un parámetro del control de calidad el cual proporciona un criterio indirecto de la concentración del extracto.

Metodología experimental:



**Figura 10-2:** Metodología para determinar el índice de refracción.

Fuente: (Miranda, 2006, p.38-64)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

**2.5.3.4 Determinación del pH**

El pH es un índice numérico que indica la acidez o alcalinidad de soluciones acuosas y se encuentra en función de sus iones hidrogeno.

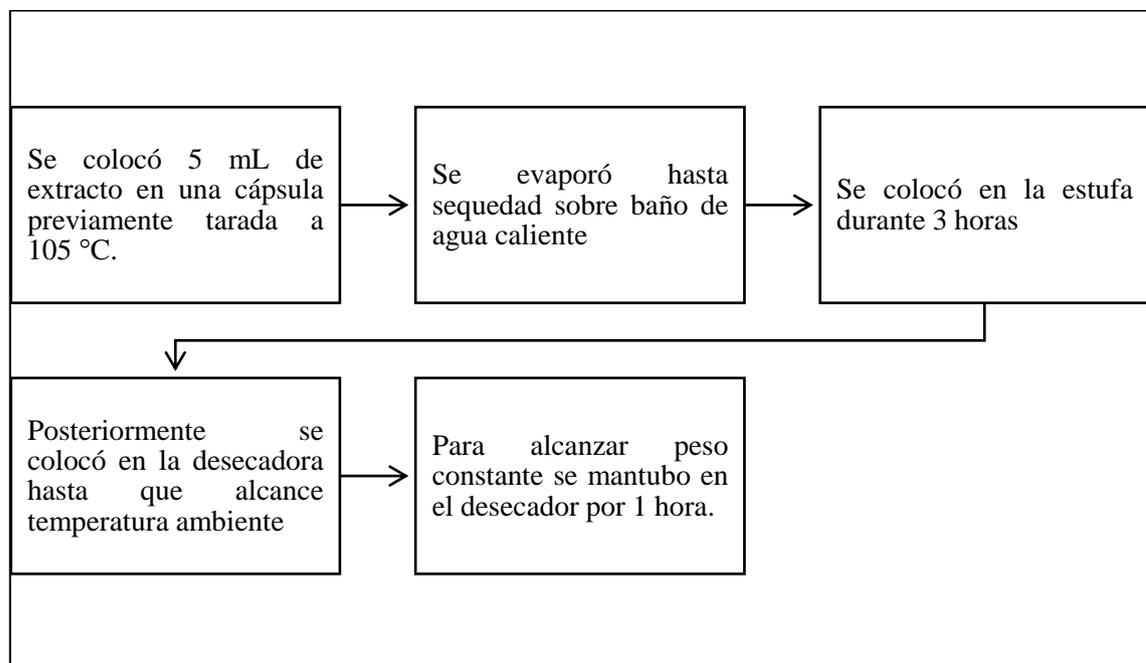
Metodología experimental:

Para la medición del pH se utilizó un pH-, metro digital, el cual fue calibrado con una solución reguladora de pH, posteriormente se registró el valor del pH del extracto de *Oreocallis grandiflora*. (Miranda, 2006, c, p.38-64)

#### 2.5.3.5 Determinación de sólidos totales:

Los sólidos totales consisten en el cambio de la masa por influencia del calor mediante la evaporación y el secado de la solución de ensayo hasta una masa constante.

Metodología experimental:



**Figura 11-2:** Metodología para determinar el contenido de sólidos totales en el extracto vegetal

Fuente: (Miranda, 2006, p.38-64)

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

#### CÁLCULOS:

$$St = \frac{Pr-P}{V} * 100$$

Ecuación (6).

**Donde:**

$P_r$  = masa en gramos del residuo más la cápsula

$P$  = masa en gramos de la cápsula vacía

V= volumen del extracto

100= factor matemático.

#### **2.5.4 Determinación de fenoles totales**

Se realizó la cuantificación de los fenoles totales del extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora* utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC). Este reactivo está constituido por una mezcla de ácido fosfotúngstico y el ácido fosfomolibdico, que por oxidación de los fenoles se reduce a óxido de tungsteno y molibdeno produciendo una coloración azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes, siendo susceptible a ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm.

Se preparó una solución madre de 100 mg/L a partir de esta disolución se preparó 10 mL de disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 20 a 100 ppm luego se procedió de la siguiente manera tanto para el extracto como para las diferentes soluciones de ácido gálico:

Se tomó 250 uL de cada disolución de ácido gálico o del extracto y se colocó en un matraz de 25 ml, luego se añadió 15 ml de agua destilada y 1.25 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, inmediatamente se procedió a homogenizar el contenido de los matraces en el vortex ,8 minutos después se adicionó a cada matraz 3.75 ml de disolución de carbonato sódico al 7.5% y se aforó a un volumen final de 25 ml con agua destilada, se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm y se trazó la curva de calibración en función de la concentración vs la absorbancia. (Toma *et al.*, 2001, p.4751)

#### **2.5.5 Determinación de flavonoides:**

Se preparó soluciones de quercetina utilizando como disolvente metanol a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. El procedimiento que se muestra a continuación fue similar tanto para el extracto como para las soluciones estándar.

Se tomó 1 mL de muestra y se añadió 4 mL de agua destilada conjuntamente con 300 uL de nitrato de sodio al 5%, después de 5 minutos se colocó 300 uL de Tricloruro de Aluminio al 10%, se dejó en la obscuridad por 6 minutos transcurrido este tiempo se adicionó 2 ml de

hidróxido de sodio 1 M, se dejó en obscuridad y a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. (Boukhris *et al.*, 2012, p.2)

Los resultados fueron expresados en miligramos de quercetina por 100 gramos de planta y en porcentaje.

#### ***2.5.6 Determinación del potencial antioxidante de flores de Oreocallis grandiflora por el método DPPH***

Para elaborar de la curva de calibración se preparó disoluciones de ácido gálico utilizando como disolvente metanol a diferentes concentraciones: 10, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm.

Se tomó 3.9 mL de reactivo de DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) y se añadió 100 uL de solución de ácido gálico o del extracto respectivamente y se dejó en obscuridad durante 1 hora, posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. (Bouaziz *et al.*, 2010, p.897)

#### ***2.5.7 Evaluación de la actividad diurética de las flores de Oreocallis grandiflora***

##### ***2.5.7.1 Preparación del extracto del material vegetal y la dosis de furosemida:***

Se preparó una solución madre de 60 mg/mL utilizando como disolvente carboximetil celulosa sódica al 0.9%, a partir de esta se procedió a formular las disoluciones para los diferentes tratamientos: 25, 100 y 200 mg/kg.

Como grupo control negativo se utilizó carboximetil celulosa sódica al 0.9%

Como grupo control positivo se utilizó furosemida sólido oral de 40 mg, a una dosis de 10 mg/kg disuelta en carboximetil celulosa sódica 0,9%. (Al-saikhan and Ansari, 2016, p.2)

##### ***2.5.7.2 Animales experimentales:***

Se utilizó ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*) hembras, de pesos comprendidos entre 180 a 250 gramos provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias y mantenidas a las especificaciones que se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4-2:** Condiciones en las que se mantuvieron los animales de experimentación

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>Temperatura</b>                  | 22 ± 2 °C   |
| <b>Humedad</b>                      | 50 ± 10 %   |
| <b>Período de fotoluminiscencia</b> | 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.                        |
| <b>Alimentación</b>                 | Pellets de balanceado para roedor 20 g al día y agua purificada |

Realizado por: Angelica Allauca, 2017

### 2.5.7.3 Protocolo experimental para determinar la actividad diurética

Para determinar la actividad diurética se dividió en grupos completamente al azar. Se privó de alimento pero no de agua a las ratas de laboratorio 12 horas antes de la prueba, a continuación, a cada una se administró oralmente 5 ml/ 100 g de peso corporal de solución salina isotónica (Na<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> 0.9% p/v) para imponer una carga uniforme de agua. (Ghelani, Chapala and Jadav, 2016, p.115)

Cuarenta y cinco minutos después las ratas fueron divididas en 5 grupos y se realizó una administración por vía oral de la siguiente manera: grupo 1: 1 mL de Carboximetil celulosa al 0,9%; grupo 2: 1 ml de furosemida 10 mg/kg ; grupo 3,4 y 5 : 1ml de extracto liofilizado de las flores de *Oreocallis grandiflora* a concentraciones de 25, 100 y 200 mg/kg, luego se colocó en cajas metabólicas para realizar la recolección de orina durante un periodo de 6 horas, posteriormente se midió el volumen final de orina excretada en mL y finalmente se procedió a medir la concentración de electrolitos (Sadki *et al.*, 2010, p.353)

### 2.5.8 Determinación de electrolitos en orina

La medición de electrolitos se realizó con el analizador de electrolitos versátil AVL 9180 del laboratorio clínico bacteriológico NOVALAB-Riobamba. Cuenta con electrodos intercambiables, los cuales permiten configurar el equipo en 7 perfiles diferentes.

Método: por electrodo de ion selectivo.

Análisis: se levanta la puerta para que la muestra sea automáticamente aspirada.

Volumen de muestra: 95 µL

Tipo de muestra: orina

Tiempo de análisis: 50 segundos

Temperatura: 15-32°C

Humedad relativa: 5%-95%

#### **2.5.9 *Análisis estadístico:***

Los datos de esta investigación se tabularon en el sistema estadístico SPSS y Excel. Los resultados fueron analizados mediante el test de ANOVA y un post test, pudiendo ser Tukey o Dunnet según los requerimientos. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si  $p < 0,05$ .

## CAPITULO III

### 3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Control de calidad de la droga cruda

**Tabla 1-3:** Resultados del control de calidad físico-químico de las flores de *Oreocallis grandiflora*.

| PARÁMETRO                     | Flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> (%) | Límites de referencia | Normativa                |
|-------------------------------|---|-----------------------|--------------------------|
| Humedad (%)                   | 12.56±0.067                                 | 14                    | Real Farmacopea Española |
| Cenizas totales (%)           | 2.4±0.060                                   | 5                     | Real Farmacopea Española |
| Cenizas solubles en agua (%)  | 0.60±0.035                                  | 2                     | Real Farmacopea Española |
| Cenizas insolubles en HCl (%) | 0.28±0.035                                  | 1                     | Real Farmacopea Española |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

El control de calidad de la droga cruda es fundamental para determinar que se encuentra libre de contaminación inorgánica como polvo, la excreta de los animales; y la contaminación orgánica como insectos, etc.

El contenido de humedad fue de 12.56 %, encontrándose dentro del rango de referencia lo cual es fundamental para mantener la estabilidad e inhibir el crecimiento microbiano, la presencia de hongos e hidrólisis. Además, constituye en parámetro importante para garantizar la calidad de la droga vegetal y eficacia del proceso de desecación.

Un elevado contenido de cenizas totales indica la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en el material vegetal como: fosfatos, carbonatos, nitrito de sodio, cloruros, calcio, etc. Estos compuestos pueden provenir tanto de la ceniza fisiológica, que se deriva del propio tejido vegetal, como la ceniza no fisiológica, que constituye la materia extraña como la arena o la tierra adherida a la superficie de la planta. (Folashade, Omoregie and Ochogu, 2012, p.103)

El contenido de ceniza insoluble en ácido clorhídrico proporciona información de la cantidad de sílice presente en el material vegetal (arena o sílice), mientras que el contenido de cenizas solubles en agua permite determinar la cantidad de sales solubles en agua.

Las flores de *Oreocallis grandiflora* presentaron  $2.4 \pm 0.060$  de cenizas totales;  $0.60 \pm 0.035$  de cenizas solubles en agua y  $0.28 \pm 0.035$  de cenizas insolubles en ácido clorhídrico porcentajes que se encuentran dentro de los valores de referencia indicando la ausencia de materia extraña como tierra, arena o sílice. (REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA, 2003, p.95)

### 3.2 Tamizaje fitoquímico

**Tabla 2-3:** Tamizaje fitoquímico de los extractos de flores de *Oreocallis grandiflora*

| TIPO DE ENSAYO     | COMPUESTO IDENTIFICADO   | EXTRACTO ETÉREO | EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO | EXTRACTO ACUOSOS |
|--------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|
| CATEQUINAS         | Catequinas               | N/A             | +                        | N/A              |
| RESINAS            | Resinas                  | N/A             | -                        | N/A              |
| BALJET             | Lactonas y cumarinas     | +               | +++                      | N/A              |
| BORNTRAGER         | Quinonas                 | N/A             | +++                      | N/A              |
| FEHLING            | Azúcares                 | N/A             | ++                       | ++               |
| LIBERMANN-BOUCHARD | Triterpenos y esteroides | +               | ++                       | N/A              |
| ESPUMA             | Saponinas                | N/A             | ++                       | ++               |
| FeCl <sub>3</sub>  | Compuestos fenólicos     | N/A             | +++                      | +++              |
| ANTOCIANIDINAS     | Antocianidinas           | N/A             | ++                       | N/A              |
| DRAGENDORFF        | Alcaloides               | -               | -                        | -                |
| MAYER              | Alcaloides               | -               | -                        | -                |
| WAGNER             | Alcaloides               | -               | -                        | -                |
| SHINODA            | Flavonoides              | N/A             | ++                       | ++               |
| SUDAN              | Grasas                   | +               | N/A                      | N/A              |
| PRINCIPIOS AMARGOS |                          | N/A             | N/A                      | +                |
| MUCILAGOS          | Polisacáridos            | N/A             | N/A                      | +                |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

El tamizaje fitoquímico realizado en las flores de *Oreocallis grandiflora* con diferentes solventes mostraron la presencia cualitativa de algunos metabolitos secundarios como: lactonas, cumarinas, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides que se puede observar en la tabla 2-3.

Las plantas sintetizan diferentes metabolitos secundarios que se caracterizan por su efecto farmacológico y curativo, los cuales pueden ser sintetizados para formular nuevos fármacos que mejoren la salud de la población. El mayor número de compuestos se presentó en el extracto hidroalcohólico siendo los siguientes:

Flavonoides y fenoles los cuales son compuestos que cumplen funciones importantes en las plantas como: proporcionar hermosos colores a las flores. (Zhu *et al.*, 2012, p.2). Según varios informes estos compuestos presentan actividad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. (Agati *et al.*, 2012, p.67). La actividad antioxidante de los flavonoides *in vitro* puede llegar a ser más fuerte que la vitamina C y E, dependiendo de las concentraciones utilizadas. (Quality, 2010, p.115).

Además, los flavonoides tienen una amplia gama de actividades biológicas como: antiinflamatorios, anticancerosos, cardioprotectora, hepatoprotector, antimicrobiano, antiviral, antialérgicos, vasodilatadores, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y efecto diurético, este último atribuido principalmente a la presencia de flavonoides y derivados del ácido caféico. (Balasundram, 2006, e, p.5)

Se encontraron triterpenos y esteroides que son compuestos de interés farmacológico debido a su estrecha relación con las hormonas, incluidas las hormonas sexuales. Los esteroides se han utilizado como agentes antiinflamatorios y analgésicos en situaciones clínicas modernas. (Shantabi *et al.*, 2014, p.6)

Se ha demostrado la presencia de saponinas las cuales poseen propiedades de formación de espuma, lo cual explica su comportamiento similar al jabón en el agua, por lo tanto, pueden ser utilizadas como detergentes. Además, son compuestos alelopáticos los cuales actúan como defensa contra patógenos e insectos en las plantas. (J, 2015, p.6).

Se ha comprobado que las saponinas poseen propiedades farmacológicas como: antimicrobianas, antiplasmodial, antiproliferativas, antimaláricas, antiaterosclerosis, antialérgicas, insecticidas, antidiabéticas, anticancerosas y antiinflamatorias. También se ha informado que son activas contra la obesidad. (Mroczek, 2015, p.5)

Los resultados obtenidos en la tabla 2-3 son comparables con aquellos de investigaciones de plantas emparentadas de la misma familia (Proteaceae) como *Macadamia integriflora*, *Hakea salicifolia* y *Hakea sericeae*, las cuales reportan la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides terpenos y taninos en cantidades abundantes. (Madureira *et al.* 2012, p.41), (Boyer & Cock 2013, p.6).

El efecto diurético de las flores de *Oreocallis grandiflora* podría ser atribuido a la presencia de grupos fitoquímico tales como flavonoides, terpenoides y saponinas ya que proporcionan efectos favorables sobre los procesos fisiológicos del riñón, probablemente: aumentando la capacidad de ahorro de potasio, la unión con el receptor de adenosina A1 o mediante la inhibición de la reabsorción tubular de agua y los aniones. (Aziz *et al.*, 2014, a, p.4)

### 3.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de flores de *Oreocallis grandiflora*

**Tabla 3-3:** Control de calidad del extracto hidroalcohólico de las flores de *Oreocallis grandiflora*

| PARÁMETRO                                | Extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> |
|--|---|
| <b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>    |   |
| <b>Olor</b>                              | Alcohólico aromático  |
| <b>Color</b>                             | Amarillo  |
| <b>Aspecto</b>                           | Transparente  |
| <b>Sabor</b>                             | Amargo ligeramente astringente  |
| <b>CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS</b> |   |
| <b>Índice de refracción</b>              | 1.37±0.00   |
| <b>pH</b>                                | 5.62±0.01   |
| <b>Densidad relativa</b>                 | 0.82±0.01   |
| <b>Solidos Totales (%)</b>               | 1.82±0.05   |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

La identificación de las plantas medicinales está basada en determinar sus características macroscópicas y microscópicas. Sus características microscópicas incluyen olor, tamaño, sabor, forma y características especiales de la planta. Esta evaluación proporciona un medio simple y rápido para establecer la identidad de la planta como también determinar su calidad y pureza.

El extracto hidroalcohólico de flores de *Oreocallis grandiflora* presentó un olor alcohólico aromático que se relaciona probablemente a su alto contenido de compuestos fenólicos. (Oil, 2016, p.7), mostró coloración amarilla propia del material vegetal utilizado, aspecto transparente y sabor amargo ligeramente astringente que se relaciona con su pH ácido de 5.62±0,01. (Romero and Navarro, 2005, p.4-10). El pH muestra características acidas débiles relacionadas con la presencia de compuestos extraídos tales como: flavonoides, fenoles, taninos, etc. (Pacheco *et al.*, 2013, p.5)

El porcentaje de sólidos totales fue  $1,82 \pm 0,05$  y de  $1,37 \pm 0,00$  para el índice de refracción encontrándose dentro de los valores de referencia según la farmacopea francesa de 1989, que establece que el porcentaje no debe ser menor a 1,20, estos parámetros indican una buena solubilidad de los metabolitos en el solvente utilizado.

La densidad relativa del extracto hidroalcohólico fue de  $0,82 \pm 0,01$ , mientras que la densidad del solvente empleado (alcohol al 96%) fue de 0,789 g/mg lo cual indica que existen sustancias disueltas en el extracto.

### 3.4 Cuantificación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu:

La concentración de fenoles en el extracto metanólico de flores de *Oreocallis grandiflora* fue cuantificado mediante el método de Folin-Ciocalteu, para lo cual se elaboró una curva de calibración de ácido gálico, proporcionando la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0.0026x + 0.00286$ , con  $R^2 = 0.9991$

La concentración de fenoles totales se obtuvo al interpolar el valor obtenido de la absorbancia de la muestra en la curva de calibración en las siguientes unidades: miligramos de ácido gálico por 100 g de extracto liofilizado y en porcentaje:

**Tabla 4-3:** Resultados de la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de flores las flores de *Oreocallis grandiflora*

| Extracto   | Fenoles totales expresados como g de Acido gálico/100 g de extracto liofilizado de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> | Porcentaje         |
|------------|--|--------------------|
| Metanólico | $12.013 \pm 0.210$   | $12.013 \pm 0.210$ |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

La concentración de fenoles totales en el extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora* en solvente metanólico es de  $12.013 \pm 0.210$  mg de ácido gálico por cada 100 g de extracto liofilizado. Este valor muestra la presencia de una gran cantidad de compuestos fenólicos en su composición.

Es importante mencionar que existen estudios anteriores realizados por la Universidad Técnica Particular de Loja en la cual reportan un contenido de fenoles en extracto metanólico de 17.4 g de ácido gálico por cada 100 g de extracto. Los estudios anteriores muestran un valor superior

de fenoles totales ya que se utilizaron hojas mientras que en esta investigación se utilizaron las flores. (Br 2013, a, p. 65)

Además, es comparable en mayor o menor cantidad con otros estudios de la misma familia proteaceae como *Grevillea robusta* que presenta un contenido de fenoles de 10.104 y *Protea cynaroides* L. de 4.209 gramos de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto. (Wei et al. 2012, p.222) (Wu, H. C. Du Toit 2011, p.12544)

### 3.5 Cuantificación de flavonoides totales:

La concentración de flavonoides en el extracto metanólico de flores de *Oreocallis grandiflora* fue cuantificado mediante técnicas espectrofotométricas con tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró una curva de calibración de quercetina, proporcionando la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0.00212x + 0.00256$ , con  $R^2 = 0.999$ .

La concentración de flavonoides se obtuvo al interpolar el valor obtenido de la absorbancia de la muestra en la curva de calibración en las siguientes unidades: miligramos de quercetina por 100 g de extracto liofilizado y en porcentaje:

**Tabla 5-3:** Resultados de la cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de flores las flores de *Oreocallis grandiflora*

| Extracto | Flavonoides totales expresados como g de quercetina /100 g de extracto liofilizado de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> | Porcentaje  |
|----------|---|-------------|
| Metanol  | 15.852±1.53   | 15.852±1.53 |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

El extracto metanólico de flores de *Oreocallis grandiflora* presentó un contenido de flavonoides totales de 15.852±1.53 miligramos de quercetina por 100 gramos de extracto liofilizado. Este valor muestra un alto contenido de flavonoides.

Su alto contenido de flavonoides podría estar relacionado con la actividad diurética debido a que según bibliografía estos compuestos actúan a nivel de la nefrona aumentando la excreción urinaria. (Aziz et al. 2014, b, p.14)

El contenido de flavonoides totales de las flores de *Oreocallis grandiflora* es superior en comparación a otros estudios realizados con plantas de la misma familia (Proteaceae) como

*Embothrium coccineum* cuyo extracto etanólico presento 0.502 o con *Helicia nilagarica bedd* de 5.6 gramos de quercetina por 100 gramos de material vegetal seco. (Leyton et al. 2015, p.264). (Lalawmpui et al. 2014, p.248)

Además, la concentración de flavonoides es superior al de fenoles totales, lo cual podría estar influenciado por la polaridad del solvente de extracción y por la solubilidad de los flavonoides en el disolvente de extracción, en este caso los flavonoides son más solubles en extracto metanólico que los fenoles totales. (Babbar et al. 2014, p.4)

### 3.6 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

**Tabla 6-3:** Concentración del extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* capas de inhibir la concentración inicial del DPPH en un 50%

|             | Flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> | Ácido gálico |
|-------------|---|--------------|
| IC 50 ug/mL | 907.003                                 | 35.20        |

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

La actividad antioxidante por el método de inhibición del DPPH reporta sus resultados como IC<sub>50</sub> o también denominada concentración media inhibitoria, es decir, la concentración efectiva del antioxidante necesario para inhibir la concentración inicial de DPPH en un 50%. (Shahidi and Zhong, 2015, p.6).

La actividad captadora de radicales libres en el extracto hidroalcohólico de las flores de *Oreocallis grandiflora* presentó un IC<sub>50</sub> de 907,003 ug/mL considerado bajo frente al ácido gálico de 35,20 µg/mL.

Con los resultados obtenidos para fenoles y flavonoides se esperaba un IC<sub>50</sub> bajo comparable al del ácido gálico, pero los resultados no fueron significativos, esto quizá se deba a que el ácido gálico es un compuesto puro a diferencia del extracto el cual contiene diferentes metabolitos los cuales podrían actuar de manera sinérgica o inhibitoria en este caso quizá produciendo actividad pro-oxidante que se contrapone al potencial antioxidante. (Saravanan et al. 2014, p.56-64)

Al comparar con otra planta como *Protea elliottii* (Proteaceae) la cual en extracto metanólico reporta un IC<sub>50</sub> de 14.20 µg/ml o a su vez al comparar con *Passiflora alata* en extracto etanólico la cual presenta un IC<sub>50</sub> de 1061.2 ± 8.5 µg/ml se puede concluir que las flores de *Oreocallis grandiflora* posee una actividad antioxidante media. (Lawal et al. 2017, p.33)(Wasicky et al. 2015, p.409)

Además, estudios anteriores realizados en hojas de *Oreocallis grandiflora* utilizando diferentes solventes metanol, acetato de etilo y hexano reportan un IC<sub>50</sub> de 15.69 y 134 µg/ml, respectivamente lo cual demuestra que las hojas son potencialmente más antioxidantes que las flores. Sin embargo, se puede decir que las flores a concentraciones elevadas poseen una inhibición muy promisoría. (Br 2013, b, p.64)

La capacidad antioxidante del extracto analizado podría estar relacionado con su alto contenido de flavonoides y fenoles ya al ser compuestos que contienen en su estructura una serie de grupos hidroxilos pueden actuar como agentes reductores, antioxidantes, donadores de hidrógeno y desactivadores de oxígeno, lo cual lo realizan por la disponibilidad de sus iones hidrógeno funcionando como captadores y donadores de hidrógeno responsables de la actividad antioxidante. (Acids, 1996, p.934). (Mira, 2002, p.1219)

### 3.7 Evaluación de la actividad diurética de las flores de *Oreocallis grandiflora* en ratas (*Rattus norvegicus*)

**Tabla 7-3:** Efecto de las flores de *Oreocallis grandiflora* en el volumen de orina utilizando ratas de laboratorio en un intervalo de 6 horas.

| GRUPO                 | 6 horas después de la administración de la droga |                       |                  |                     |
|-----------------------|--|-----------------------|------------------|---------------------|
|                       | Dosis  | Volumen de orina (mL) | Acción diurética | Actividad diurética |
| Control negativo      | 5 mL/g   | 2.12±0.303            | 1                | -                   |
| Furosemida (10 mg/kg) | 10 mg/Kg   | 4.86±0.888            | 2.30             | 1                   |
| ELFOG                 | 25 mg/Kg   | 4.62±0.768            | 2.17             | 0.94                |
| ELFOG                 | 100 mg/kg  | 4.14±0,483            | 1.95             | 0.85                |
| ELFOG                 | 200 mg/kg  | 3.62±0,449            | 1.72             | 0.75                |

ELFOG=extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora*

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

El presente estudio examinó la eficacia diurética del extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora* en ratas de laboratorio. Se eligió la vía de administración oral ya que es la más utilizada en la medicina tradicional, su efecto farmacológico se comparó con la furosemida que es un diurético ampliamente utilizado en la práctica clínica perteneciente a los diuréticos de tipo asa. (Sadki *et al.*, 2010, p.355)

Previo al tratamiento se administró a los animales una carga de solución salina necesaria para producir un aceptable grado de diuresis simulando condiciones edematosas para así poder demostrar su efectividad en presencia de agua y electrolitos. (Nedi, Mekonnen and Urga, 2004, a, p.60)

Después de la administración oral de las tres diferentes dosis (25, 100 y 200 mg/kg) se produce efectos diuréticos notables en comparación al grupo control (furosemida 10 mg/kg) proporcionando una base cuantitativa para explicar su uso como diurético en la medicina tradicional, este efecto farmacológico podría ser atribuido a la presencia de grupos fitoquímico tales como flavonoides, terpenoides y saponinas determinados anteriormente en el tamizaje fitoquímico.

Además, se puede observar que al aumentar la dosis disminuye el efecto diurético, demostrando un doble efecto sobre la función renal, incluyendo el incremento e inhibición de la actividad diurética, diferenciándolo de los diuréticos comúnmente utilizados en medicina natural. (Chen *et al.*, 2014, p.117)

Se verifica una relación inversamente proporcional entre la dosis y el efecto diurético a las diferentes concentraciones empleadas en el ensayo, probablemente debido a que en esta investigación se utilizó un extracto bruto el cual al estar compuesto por diferentes sustancias pueden haber provocado interferencia a medida que aumentaba su concentración. Las sustancias coextraídas en el extracto bruto pueden interferir con la absorción, distribución o unión al receptor de los componentes activos. (Nedi, Mekonnen and Uрга, 2004, b, p. 60)

**Tabla 8-3:** Volumen de orina excretada por las ratas de laboratorio por influencia del extracto de flores de *Oreocallis grandiflora*

| GRUPO                                    | 1 hora    | 2 horas   | 3 horas   | 4 horas   | 5 horas   | 6 horas   | Volumen Total |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| Control negativo (CMC 0,9%) <sup>o</sup> | 0.98±0.59 | 0.32±0.31 | 0.64±0.97 | 0.04±0.09 | 0.04±0.05 | 0.1±0.14  | 2.12±0.30     |
| Furosemida (10 mg/kg)                    | 3.74±0.85 | 0.62±0.23 | 0.32±0.26 | 0.12±0.18 | 0.04±0.09 | 0.02±0.04 | 4.86±0.89     |
| ELFOG (25 mg/k)                          | 2.52±0.54 | 0.76±0.26 | 0.4±0.42  | 0.14±0.13 | 0.3±0.34  | 0.5±0.14  | 4.62±0.77     |
| ELFOG (100 mg/kg)                        | 1.54±0.80 | 0.68±0.66 | 0.44±0.48 | 0.22±0.27 | 0.7±1     | 0.56±0.35 | 4.14±0.48     |
| ELFOG (200 mg/kg)                        | 0.84±0.78 | 1.2±0.66  | 0.1±0.10  | 0.52±0.69 | 0.06±0.13 | 0.9±0.45  | 3.62±0.45     |

CMC: carboximetilcelulosa. ELFOG: extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora*

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

La tabla 8-3 muestra que la furosemida posee un efecto diurético instantáneo a la primera hora después de la administración en comparación al control negativo y a las dosis utilizadas en el ensayo lo cual está relacionado directamente con la alta biodisponibilidad que posee la furosemida. (Vargo *et al.*, 1995, p.608).

Esta diferencia horaria del efecto diurético entre la furosemida y las diferentes dosis del extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* utilizadas en el ensayo, esta probablemente relacionado con las características de absorción gastrointestinal de los componentes del extracto o a que contenga metabolitos activos que posean una larga vida pudiendo ser incluso de acción prolongada en el sitio de acción (Holford and Sheiner, 1981, p.444)

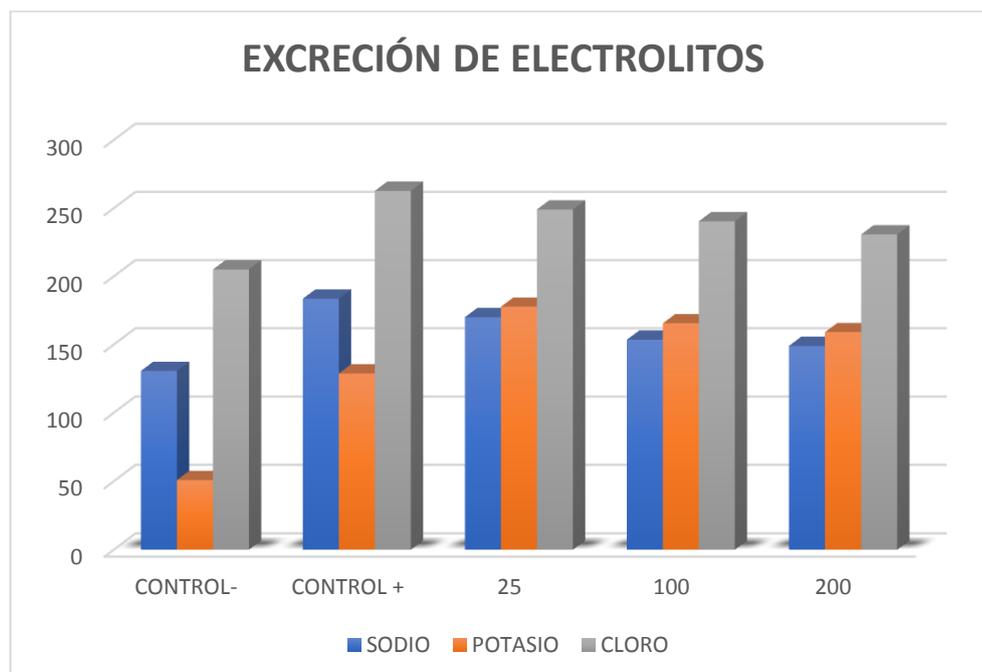
### 3.8 Evaluación de los Electrolitos urinarios

**Tabla 9-3:** Efecto de las flores de *Oreocallis grandiflora* sobre la excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio en muestras de orina de 6 horas:

| Grupos     | Dosis     | Na <sup>+</sup> en orina (mmol/L) | K <sup>+</sup> en orina (mmol/L) | Cl <sup>-</sup> en orina (mmol/L) | Na <sup>+</sup> index | K <sup>+</sup> index | Cl <sup>-</sup> Index |
|------------|-----------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| CMC        | 0,9%      | 130.6±9.99                        | 50.78±2.77                       | 205±14.80                         | 1                     | 1                    | 1                     |
| Furosemida | 10 mg/Kg  | 183.6±12.34                       | 128.76±18.22                     | 262.67±9.50                       | 1.41                  | 2.54                 | 1.28                  |
| ELOG       | 25 mg/kg  | 170±10.38                         | 177.66±9.55                      | 249±17.34                         | 1.30                  | 3.50                 | 1.21                  |
| ELOG       | 100 mg/kg | 153.5±11.32                       | 165.52±8.19                      | 240.33±14.57                      | 1.18                  | 3.26                 | 1.17                  |
| ELOG       | 200 mg/kg | 148.94±8                          | 159.06±6.28                      | 230.67±14.29                      | 1.14                  | 3.13                 | 1.13                  |

CMC: carboximetilcelulosa. ELOG: extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora*. INDEX= excreción en el grupo de ensayo / excreción en el grupo de control.

Realizado por: Angélica Allauca, 2017



**GRAFICO 1-3:** Excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio por influencia de la diferentes dosis administradas

Realizado por: Angélica Allauca, 2017

El extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* mostró un aumento significativo en la concentración de iones sodio, potasio y cloro, por lo tanto, posee importantes efectos saluréticos y natriuréticos. La mayoría de los diuréticos excepto los ahorradores de potasio causan un aumento en la excreción de iones sodio y potasio. Esto se debe a la inhibición de la reabsorción de sodio en el segmento proximal de la nefrona aumentando la secreción de potasio en el lumen tubular en el segmento distal de manera dependiente del flujo. (Shinkawa, 1993, p.323)

La concentración de electrolitos se relaciona directamente con el volumen de orina excretado es decir que al disminuir el volumen urinario disminuye de manera similar la concentración de electrolitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . La concentración elevada de electrolitos se relaciona con los diuréticos de tipo asa como la furosemida que actúan inhibiendo el cotransportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  situado en la porción gruesa del asa de Henle, inhibiendo así la reabsorción de los electrolitos. (Novaes *et al.*, 2014, p.527).

Sin embargo, se evidencian concentraciones menores de calcio y sodio, aunque mayores de potasio excretadas en el mencionado tratamiento con respecto al control positivo, además el tiempo de acción es más prolongado al comparar con el fármaco de referencia (furosemida).

Por lo anteriormente mencionado, se podría deducir que el extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* pertenece al grupo de los tiazídicos y dentro de este grupo a los derivados de las sulfamidas los cuales no incrementan su efecto diurético al aumentar la dosis, aunque se requieren estudios adicionales para determinar su mecanismo de acción. (Morales-Olivas, 2013, a, p.15) (Manuel and Jarillo, 2017, p.19)

**Tabla 10-3:** Efecto natriurético, salurético e inhibición de la anhidrasa carbónica de las flores de *Oreocallis grandiflora* en ratas de laboratorio en muestras de orina recogidas por 6 horas.

| Grupos     | Dosis    | Efecto salurético | Efecto natriurético | Salurético index | Natriurético índice |
|------------|----------|-------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| CMC        | 0,9%     | 337.67±16.50      | 2.58±0.26           | 1                | 1                   |
| Furosemida | 10mg/Kg  | 449.33±6.43       | 1.45±0.23           | 1.33             | 0.56                |
| ELOG       | 25mg/kg  | 425.40±12.04      | 0.96±0.07           | 1.26             | 0.37                |
| ELOG       | 100mg/kg | 402.97±16.09      | 0.93±0.09           | 1.19             | 0.36                |
| ELOG       | 200mg/kg | 385.03±11.44      | 0.94±0.03           | 1.14             | 0.36                |

**ELFOG:** Extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora* **CMC:** carboximetilcelulosa **INDEX:** excreción en el grupo de ensayo / excreción en el grupo de control.

**Realizado por:** Angélica Allauca, 2017

El efecto salurético de las flores de *Oreocallis grandiflora* a una dosis de 25 mg/kg es de  $425.40 \pm 12.04$ , el cual es menor al compararlo con el fármaco de referencia que reporta un efecto salurético de  $449.33 \pm 6.43$ .

El extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* podría pertenecer a un diurético tiazídico ya que son fármacos que se caracterizan por actuar en la porción inicial del túbulo contorneado distal inhibiendo moderadamente el cotransportador Na y Cl aumentando así la excreción renal de ambos iones, además actúan como natriurético moderado visiblemente menos potente que la furosemida. (Jentzer *et al.*, 2010, p.1528). (Morales-Olivas, 2013, b, p.14)

El efecto natriurético de las flores de *Oreocallis grandiflora* a una dosis de 25 mg/kg es de  $0.96 \pm 0.07$ , mientras que la furosemida posee un valor de  $1.45 \pm 0.23$ , esta disminución del efecto natriurético entre el fármaco de referencia y el extracto de ensayo se debe a que existe una mayor excreción del ion potasio en comparación al sodio.

Por lo tanto, el extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* podría pertenecer a un diurético tipo tiazida los cuales se caracterizan por producir una mayor pérdida del ion potasio acción que se produce por una reabsorción de ion sodio estimulando así la excreción de potasio o a su vez la disminución de la concentración del ion calcio hace que se activen los canales de sodio favoreciendo la excreción de potasio produciendo hipocalemia por lo cual son fármacos que también podrían ser utilizados para reducir la presión arterial. (Ellison and Loffing, 2010, p.1-2)

**Tabla 11-3:** Efecto de las flores de *Oreocallis grandiflora* sobre la excreción urinaria de los iones calcio en ratas de laboratorio en muestras de orina recogida por 6 horas.

| GRUPO      | DOSIS     | Concentración de Ca |
|------------|-----------|---------------------|
| CMC        | 0.9%      | $7.17 \pm 0.16$     |
| Furosemida | 10 mg/kg  | $9.30 \pm 0.19$     |
| ELFOG      | 25 mg/kg  | $5.36 \pm 0.17$     |
| ELFOG      | 100 mg/kg | $5.32 \pm 0.16$     |
| ELFOG      | 200 mg/kg | $5.31 \pm 0.15$     |

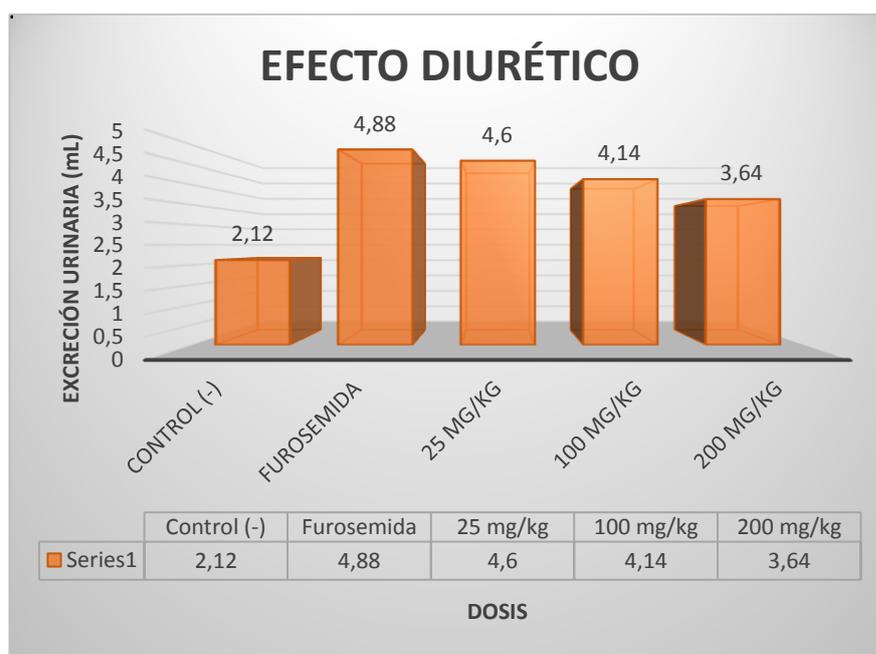
CMC: carboximetilcelulosa. ELFOG: extracto liofilizado de *Oreocallis grandiflora*  
 Realizado por: Angélica Allauca, 2017.

En el cuadro anterior se puede analizar que los tratamientos (25, 100 y 200 mg/kg) de flores de *Oreocallis grandiflora* eliminan una concentración menor de iones calcio frente al control positivo (furosemida) incluso menor que el control negativo (carboximetil celulosa 0.9%).

Al reducir la concentración de ion calcio podría poseer la característica de impedir la formación y agregación de pierdas de oxalato de calcio inhibiendo el posterior crecimiento de cálculos renales, además es una base científica para catalogarlo como un diurético tipo tiazida ya que estos se caracterizan por eliminar menor cantidad de calcio en orina, aunque se requiere la medición de otros iones como: fosfato, ácido úrico, urea y creatinina para que se le otorgue estas características. (Ghelani et al. 2016)

Por consiguiente, el extracto hidroalcohólico de las flores de *Oreocallis grandiflora* podría constituirse en un diurético tipo tiazida. Se requieren análisis posteriores para investigar los activos responsables de la actividad y comprender el mecanismo del efecto diurético a nivel molecular.

### 3.9 Análisis estadístico



**GRAFICO 2-3:** Dosis administrada vs volumen de orina excretada durante un periodo de 6 horas  
**Realizado por:** Angélica Allauca, 2017

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad diurética fueron analizados utilizando el software estadístico IBM SPSS 22 mediante el diseño completamente aleatorio el cual trabaja con un factor (dosis) y una variable respuesta (excreción urinaria en mL).

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de homogeneidad de varianzas para determinar normalidad y homogeneidad respectivamente, mediante los cuales se estableció ser

una distribución normal aceptando la hipótesis nula con  $p=0.112$ , proporcionando información necesaria para aplicar estadística paramétrica, aplicando el test ANOVA de un factor.

El test ANOVA de un factor dio como resultado  $p=0.000$ , por lo cual se acepta la hipótesis alternativa ( $p<0.05$ ), es decir existen diferencias significativas en la excreción urinaria por causa de la dosis administrada.

Al aceptar la hipótesis alternativa mencionada anteriormente existe la necesidad de determinar la mejor dosis mediante el uso del test de Tukey, en donde se analizó el cuadro de comparaciones múltiples el cual explica que existe un cambio estadístico en la excreción urinaria entre el control negativo y los tratamientos utilizado es decir existe una mayor excreción urinaria de la furosemida y las diferentes concentraciones de los extractos de flores de *Oreocallis grandiflora* con respecto al control negativo.

Posteriormente, se analizó el cuadro de subconjuntos homogéneos el cual indica que las dosis del extracto hidroalcohólico de flores de *Oreocallis grandiflora* a una concentración de 25 y 100 mg/kg no presentan diferencias significativas con respecto al control positivo (furosemida) en relación al volumen de orina excretada ya que se encuentran en la misma familia.

## CONCLUSIONES:

Se determinó que las flores de *Oreocallis grandiflora* cumplen con los parámetros de control de calidad haciéndola apta para ser estudiada ya que no contiene sustancias extrañas provenientes del área de recolección y almacenamiento. Mediante el tamizaje fitoquímico se identificó principalmente la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, lactonas y cumarinas; además de otros compuestos como azúcares reductores, saponinas triterpenos y esteroides.

Se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto etanólico de flores de *Oreocallis grandiflora* el cual fue de  $12.012 \pm 0.210$  g de ácido gálico/ 100 g de extracto liofilizado, mientras que la cantidad de flavonoides fue de  $15.851 \pm 0.153$  g de quercetina/100 g de extracto liofilizado.

Se obtuvo una capacidad captadora de radicales libres de  $907.0032 \mu\text{g/mL}$  relativamente bajo en comparación al ácido gálico el cual fue de  $35.1985 \mu\text{g/mL}$ .

Se comprobó el efecto diurético del extracto obtenido a partir de las flores de *Oreocallis grandiflora* a las tres dosis administradas lo cual se atribuye a la presencia de grupos fitoquímico tales como flavonoides, terpenoides y saponinas.

Se verificó una relación inversamente proporcional entre la dosis y el efecto diurético, en el cual la dosis de 25 mg/kg ejerció un efecto diurético del 94% frente al fármaco de referencia (furosemida).

Se analizó la excreción de electrolitos en la cual se evidenciaron concentraciones menores de sodio y calcio, aunque mayores de potasio con referencia al control positivo (furosemida), además de una acción farmacológica prolongada que cimientan la base científica de que el extracto obtenido a partir de flores de *Oreocallis grandiflora* podría asemejarse farmacológicamente a un diurético tipo tiazida.

## **RECOMENDACIONES:**

Se requieren más investigaciones fitoquímica y farmacodinámicas para investigar los activos responsables de la actividad y comprender el mecanismo del efecto diurético a nivel molecular.

Se recomienda evaluar el efecto diurético de la planta de *Oreocallis grandiflora* utilizando otro tipo de solventes, por un tiempo más prolongado y con otras partes de la planta como pueden ser las hojas.

Se sugiere una evaluación a nivel toxicológico que contribuya a obtener una mayor información acerca de los riesgos para la salud tanto a nivel de dosis repetida como a nivel histológico.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

- AGATI, G. et al.** *Plant Science Flavonoids as antioxidants in plants : Location and functional significance.* *Plant Science* [en línea]. 2012, vol. 196, pp. 67-76. ISSN 0168-9452. DOI 10.1016/j.plantsci.2012.07.014. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.
- AHMAD. et al.** Quality Assessment of Herbal Drugs and Medicinal Plant Products. (2014) pp. 1-17. DOI 10.1002/9780470027318.a9946.
- AL-SAIKHAN, F.I. y ANSARI, M.N.** Evaluation of the diuretic and urinary electrolyte effects of methanolic extract of *Peganum harmala* L . in Wistar albino rats. , (2016), pp. 1-5. DOI 10.1016/j.sjbs.2016.01.025.
- AZIZ, M.M. et al., 2014.** Phytochemical Screening and Evaluation of the Diuretic Activity of Aqueous Methanol Extract from Aerial Parts of *Mentha viridis* Linn ( Labiatae ) in Albino Rats. , vol. 13, no. July,2014, pp. 1121-1125.
- BABBAR, N. et al.,** Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, no. 10, (2014), pp. 2568-2575. ISSN 09758402. DOI 10.1007/s13197-012-0754-4.
- BALASUNDRAM, N.,** Food Chemistry Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : Antioxidant activity , occurrence , and potential uses. , vol. 99, (2006), pp. 191-203. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- BHATTACHARYA, A., SOOD, P. y CITOVSKY, V.,** The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. , vol. 11, (2010), pp. 705-719. DOI 10.1111/J.1364-3703.2010.00625.X.
- BOUAZIZ, M., et al.,** Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. ,(2010), pp. 894-905. DOI 10.1002/ejlt.200900166.
- BOUKHRIS, M., et al.,** Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium , *Pelargonium graveolens*. , 2012, pp.267-283.

**BOYER, H. y COCK, I.,** Evaluation of the potential of *Macadamia integriflora* extracts as antibacterial food agents. *Pharmacognosy Communications*, vol. 3, no. 3, (2013), pp. 53-62. ISSN 2249-0159. DOI 10.5530/pc.2013.3.10.

**ESPINOZA, M., et al.,** Actividad antioxidante y antihiperglucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* ( Lam .) R . Br ., al sur del Ecuador. , vol. 12, no. 1, (2013), Loja, pp. 59-68. ISSN 07177917.

**BUSSMANN, R.W. y GLENN, A.,** *Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health.* *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* [en línea], 2010, vol. 6, no. 1, pp. 30. ISSN 1746-4269. DOI 10.1186/1746-4269-6-30. Disponible en: <http://www.ethnobiomed.com/content/6/1/30>.

**CAROCO, G. et al.,** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. , vol. 20, no. 7, (1996), pp. 933-956.

**CHEN, D. et al.,** *Diuretic and anti-diuretic activities of fractions of Alismatis rhizoma.* *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2014, vol. 157, pp. 114-118. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/j.jep.2014.09.022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.022>.

**DIEHL, K., et al.,** A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood , Including Routes and Volumes. , vol. 23, no. September, (2001), pp. 15-23.

**DING, D., et al.,** *Ototoxic effects and mechanisms of loop diuretics.* *Journal of Otology* [en línea], 2016, ISSN 16722930. DOI 10.1016/j.joto.2016.10.001. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672293016300629>.

**ELLISON, D.H. y LOFFING, J.,** Thiazide effects and side effects : insights from molecular genetics. , vol. c, no. 2, (2010), pp. 196-202. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.129171.Thiazide.

**ESCOBEDO, J.J.M., et al.,** La habilidad para sujetar y manejar animales de laboratorio no se adquiere fácilmente. *Revista Electronica de Veterinaria*, vol. 12, no. 5 B, (2011), pp. 1-11. ISSN 16957504.

**FERNÁNDEZ-FRESNEDO, G., et al.,** *Diuréticos: clasificación y farmacología clínica. Efectos secundarios. Indicaciones prácticas para su empleo clínico. Medicine - Programa*

*de Formación Médica Continuada Acreditado* [en línea], 2003, vol. 8, no. 112, pp. 5998-6008. ISSN 03045412. DOI 10.1016/S0304-5412(03)71105-6. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304541203711056>.

**FOLASHADE, O., et al.**, Standardization of herbal medicines - A review. , vol. 4, no. March, (2012) pp. 101-112. DOI 10.5897/IJBC11.163.

**GANESH, J.C.**, MedPub Journals Ethnomedicinal Use and Phytochemical Analysis of Selected Medicinal Plants of Mizoram , India Vabeiryureilai M and Trends in Green Chemistry. , 2015, pp. 1-9.

**GHELANI, H., CHAPALA, M. y JADAV, P.**, Journal of Traditional and Complementary Medicine Diuretic and antiurolithiatic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L . rhizome in experimental animal models. (2016), pp. 1-6. DOI 10.1016/j.jtcme.2015.12.004.

**HAU, J. y HOOSIER, G.L.**, *Handbook of Laboratory Animal*. S.l.: s.n (2003). ISBN 0849310865.

**HOLFORD, N.H.G. y SHEINER, L.B.**, Understanding the Dose-Effect Relationship: , vol. 453, 1981, pp. 429-453.

**JENTZER, J.C., et al.**, *Combination of Loop Diuretics With Thiazide-Type Diuretics in Heart Failure*. *JAC* [en línea], 2010, vol. 56, no. 19, pp. 1527-1534. ISSN 0735-1097. DOI 10.1016/j.jacc.2010.06.034. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2010.06.034>.

**JIMENEZ, M.**, Mecanismo de acción de los diuréticos., Universidad la Laguna, 2017, pp. 1-24

**KUMAR, S. y PANDEY, A.K.**, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. , vol. 2013, 2013, pp. 12-34.

**LABORATORY ANIMALS.**, *Refinando los procedimientos para la administración de sustancias*. *Sociedad Española para las ciencias del animal de laboratorio* [en línea], 2001, pp. 46. DOI 10.1258/0023677011912182. Disponible en: <http://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-administraci?n-sustancias.pdf>.

**LAWAL, B., et al.**, *African natural products with potential antioxidants and hepatoprotectives*

- properties: a review. Clinical Phytoscience* [en línea], 2017, vol. 2, no. 1, pp. 23. ISSN 2199-1197. DOI 10.1186/s40816-016-0037-0. Disponible en: <http://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-016-0037-0>.
- LALAWMPUII, P.C., et al.,** Phytochemical screening and determination of antioxidant activity of *Helicia nilagirica* Bedd., an ethnomedicinal plant of Mizoram, India. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 7, no. 5, 2014. pp. 246-249. ISSN 09742441.
- LEYTON, M., et al.,** Free radical-scavenging activity of sequential leaf extracts of *Embothrium coccineum*. *Open Life Sciences*, vol. 10, no. 1, (2015), pp. 260-268. ISSN 23915412. DOI 10.1515/biol-2015-0027.
- MACHÍN, M.P. y MORÓN RODRÍGUEZ, F.J.,** Consideraciones farmacológicas sobre principios activos en plantas medicinales con actividad diurética. *Revista Latinoamericana de Hipertension*, vol. 6, no. 2, (2011), pp. 35-40. ISSN 18564550.
- MADUREIRA, A.M., DUARTE, A. y TEIXEIRA, G.,** Antimicrobial activity of selected extracts from *Hakea salicifolia* and *H. sericeae* ( *Proteaceae* ) against *Staphylococcus aureus* multiresistant strains. *South African Journal of Botany* [en línea], 2012, vol. 81, pp. 40-43. ISSN 0254-6299. DOI 10.1016/j.sajb.2012.05.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.002>.
- MAGHRANI, M., et al.,** Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. , vol. 99, no. May, (2005), pp. 31-35. DOI 10.1016/j.jep.2005.01.045.
- MEDELLÍN, R.A., et al.,** Información general Información taxonómica Descripción de la especie Distribución Original. , 2005, pp. 1-5.
- MIRA, L.,** Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids : , vol. 36, no. 11, (2002), pp. 1219-1227. DOI 10.1080/1071576021000016472.
- MIRANDA, M., 2006.** Farmacognosia y productos naturales: Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. 6 ed. La Habana-Cuba: F.Varela, 2006, pp.32-62.
- MODEL, G.,** Diuretics in primary hypertension – Reloaded. ,(2016), pp. 8-11. DOI 10.1016/j.ihj.2016.08.013.

**MONIGATTI, M., BUSSMANN, R.W. y WECKERLE, C.S.,** *Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolivar Province, Peru. Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2013, vol. 145, no. 2, pp. 450-464. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2012.10.066. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.066>.

**MORA, R.M.,** *Diuréticos. FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria* [en línea], 2015, vol. 22, no. 1, pp. 29-36. ISSN 11342072. DOI 10.1016/S1134-2072(15)70882-0. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1134207215708820>.

**MORALES OLIVAS, F.J.,** Diferencias y similitudes entre diuréticos. *Hipertension y Riesgo Vascular*, vol. 30, no. SUPPL.2, (2013), pp. 13-19. ISSN 18891837. DOI 10.1016/S1889-1837(13)70021-7.

**MOROCHO, M.V.M.,** Ecología, utilización e impactos reducidos por el aprovechamiento del cucharillo *Oreocallis grandiflora* en las parroquias de Taquil, Chantaco, Chuquiribamba Y Gualiel de la provincia de Loja, Universidad Nacional de Loja. ,(2012), pp. 50. DOI 10.1017/S0010417500000463.

**MROCZEK, A.,** Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from Amaranthaceae family, (2015), pp. 1-29, DOI 10.1007/s11101-015-9394-4.

**MULLEN, W., EDWARDS, C.A. y CROZIER, A.,** Absorption , excretion and metabolite profiling of methyl- , glucuronyl- , glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. , vol. 44, no. 2006, (2017), pp. 107-116. DOI 10.1079/BJN20061809.

**NATIONAL KIDNEY AND UROLOGIC DISEASES INFORMATION CLEARINGHOUSE,** Los riñones y cómo funcionan. [en línea], 2009, pp.25-26. Disponible en: <http://kidney.niddk.nih.gov/KUDiseases/pubs/yourkidneys/index.aspx>.

**NEDI, T., MEKONNEN, N. y URGA, K.,** Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats. , vol. 95, (2004), pp. 57-61. DOI 10.1016/j.jep.2004.06.017.

**NORIEGA SANTIZO, A.G.,** *Determinación del efecto diurético del extracto acuoso de las plantas medicinales *Citrus reticulata* (mandarina), *Citrus paradisi* (toronja) y *Citrus**

*aurantifolia (lima)*. [en línea]. 2015, S.l.: Universidad San Carlos de Guatemala. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3707.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3707.pdf).

**NOVAES, S., et al.**, *Phytomedicine Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from Piper amalago ( Piperaceae )*. *European Journal of Integrative Medicine* [en línea], 2014, vol. 21, no. 4, pp. 523-528. ISSN 0944-7113. DOI 10.1016/j.phymed.2013.10.014. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.10.014>.

**OIL, E.O.**, Determination of Volatiles by Odor Activity Value. , (2016), pp. 1-13. DOI 10.3390/foods5030046.

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**, Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [en línea], 2013, pp. 72. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>.

**PACHECO, O., et al.**, Caracterización física , físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea L .* con acción antimicrobiana Physical , physical-chemical and chemical characterization of total extracts of fresh. 2013, p.68-76.

**PEREIRA, D.M., et al.**, Phenolics: From Chemistry to Biology. , (2009), pp. 2202-2211. DOI 10.3390/molecules14062202.

**PÉREZ, M., et al.**, Ethnopharmacological and preclinical study of diuretic activity in medicinal and food plants used by Cuban population. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, vol. 23, no. 3, (2011), pp. 214-221. ISSN 2079052X.

**QUALITY, F.**, Determination of Polyphenols , Flavonoids , and Antioxidant Capacity in Colored Chickpea ( *Cicer arietinum L .* ). , vol. 75, no. 2, (2010), pp. 2-6. DOI 10.1111/j.1750-3841.2009.01477.x.

**RAT, B.**, *Rattus norvegicus* , Brown Rat. , vol. 8235. (2016), pp. 1-7. ISSN 2307-8235

**REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA.**, *Métodos de Farmacognosia*. Madrid-España: s.n. 2003, p.95

**REZZI, S.**, Metabolomics View on Gut Microbiome Modulation by Polyphenol- rich Foods., 2012, p. 46-86.

- ROGER L.** United States Pharmacopeia. 2007 USP 30 NF 25, pp. 206-342,
- ROMERO, X. y NAVARRO, P.,** acidez y pH. , Venezuela, Smart Service C.A. 2005, p. 1-50.
- SADKI, C., et al.,** *Acute diuretic activity of aqueous Erica multiflora flowers and Cynodon dactylon rhizomes extracts in rats.* *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2010, vol. 128, no. 2, pp. 352-356. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/j.jep.2010.01.048. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.048>.
- SARAVANAN, S., ARUNACHALAM, K. y PARIMELAZHAGAN, T.,** *Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from Passiflora subpeltata leaves - A promising species of Passiflora.* *Industrial Crops and Products* [en línea], 2014, vol. 54, pp. 272-280. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2014.01.038. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.038>.
- SCALBERT, A. y WILLIAMSON, G.,** *Chocolate : Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols 1.* , 2000, pp. 2073-2085.
- SHAHIDI, F. y AMBIGAIPALAN, P.,** *Phenolics and polyphenolics in foods , beverages and spices : Antioxidant activity and health effects : A review.* *Journal of Functional Foods* [en línea], 2015, pp. 1-78. ISSN 1756-4646. DOI 10.1016/j.jff.2015.06.018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- SHAHIDI, F. y ZHONG, Y.,** *Measurement of antioxidant activity.* *Journal of Functional Foods* [en línea], 2015, pp. 1-25. ISSN 1756-4646. DOI 10.1016/j.jff.2015.01.047. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- SHANTABI, L., et al.,** *Biodiversity , Bioprospecting and Development Phytochemical Screening of Certain Medicinal Plants of Mizoram , India and their Folklore Use.* , vol. 2, no. 1, (2014), pp. 1-9. DOI 10.4172/2376-0214.1000136.
- SHINKAWA, T.,** *Loop and distal actions of a novel diuretic , M17055.* , vol. 238, 1993, pp. 317-325.
- TAYLOR, P. y KARAKAYA, S.,** *Bioavailability of Phenolic Compounds.* , no. February 2013, (2010), pp. 37-41. DOI 10.1080/10408690490886683.

- TENE, V., et al.**, An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. , vol. 111, (2007), pp. 63-81. DOI 10.1016/j.jep.2006.10.032.
- THILAKARATHNA, S.H. y RUPASINGHE, H.P.V.**, Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. , (2013), pp. 3367-3387. DOI 10.3390/nu5093367.
- TINITANA, F., et al.**, Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* [en línea], 2016, vol. 12, pp. 1-18. ISSN 1746-4269. DOI 10.1186/s13002-016-0100-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>.
- TOMA, F.A., et al.**, HPLC - DAD - ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines , Peaches , and Plums. , 2001, pp. 4748-4760.
- VARGO, D.L., et al.**, furosemide in patients with congestive heart failure. 1995, pp. 36-78.
- VILLAR, Á.**, *Farmacognosia general. Sintesis*. S.I, 1994, pp. 45-67.
- WASICKY, A., et al.**, Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2015, vol. 25, no. 4, pp. 407-412. ISSN 0102695X. DOI 10.1016/j.bjp.2015.07.011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.011>.
- WEI, S.D., et al.**, Structural composition and free radical scavenging activity of proanthocyanidins extracted from *Grevillea robusta*. *Records of Natural Products*, vol. 6, no. 3, (2012), pp. 218-229. ISSN 13076167.
- WU, H. C. DU TOIT, E.S.**, Role and significance of total phenols during rooting of *Protea cynaroides* L . cuttings. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 59, (2011), pp. 12542-12546. ISSN 16845315. DOI 10.5897/AJB10.1836.
- ZHU, M., et al.**, Relationship between the Composition of Flavonoids and Flower Colors Variation in Tropical Water Lily ( *Nymphaea* ) Cultivars. , vol. 7, no. 4,(2012), pp. 1-11. DOI 10.1371/journal.pone.0034335.

## ANEXOS.

### ANEXO A. Recolección, secado y trituración de las flores de *Oreocallis grandiflora*



**ANEXO B:** Determinación del contenido de humedad de las flores del material vegetal



**ANEXO C.** Determinación del contenido de Cenizas totales (Gráfico 1C), cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico del material vegetal. (Gráfico 2C)

Gráfico 1C.



Gráfico 2C.



**ANEXO D.** Tamizaje fitoquímico de los extractos: etéreo (Gráfico 1D), metanólico (Gráfico 2D) y acuoso de las flores de *Oreocallis grandiflora*. (Gráfico 3D).

Gráfico 1D.



Gráfico 2D.

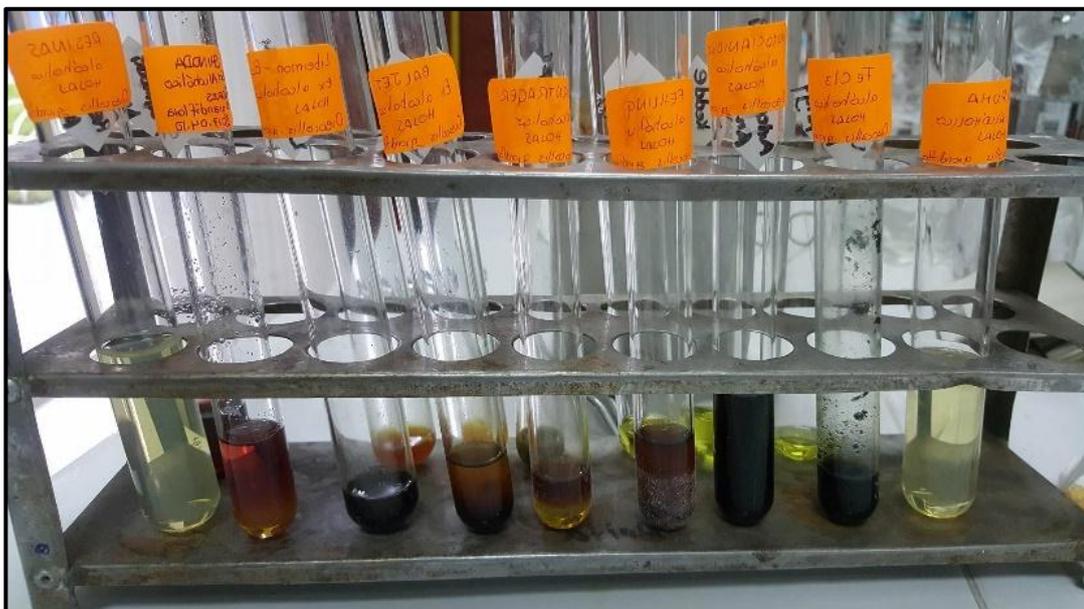


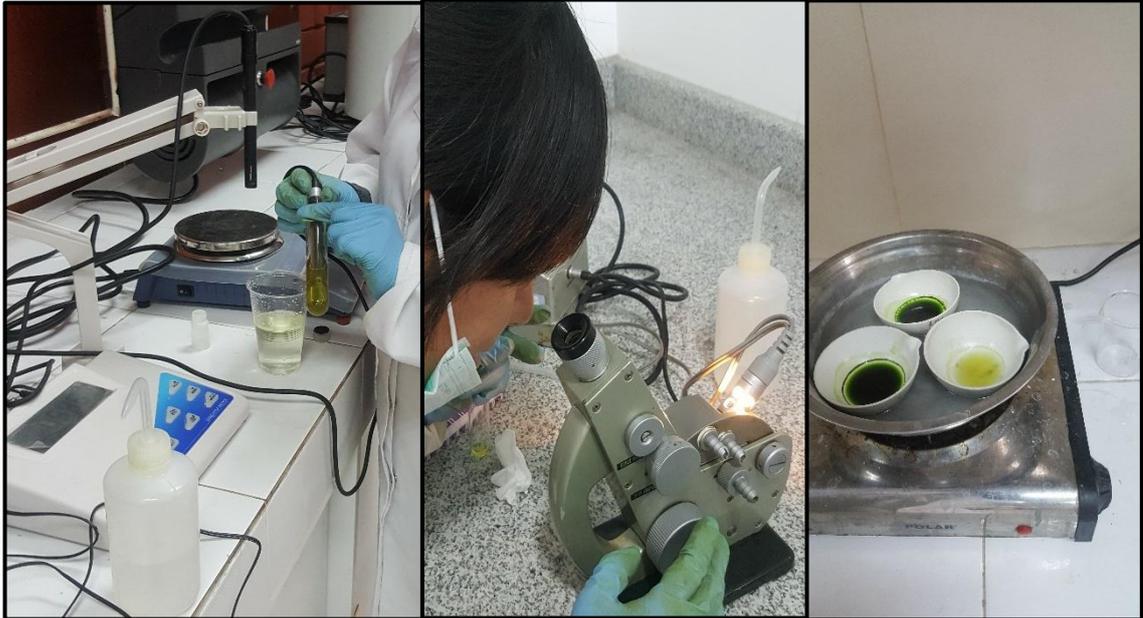
Gráfico 3D.



**ANEXO E. Extracción y obtención del extracto liofilizado de flores de *Oreocallis grandiflora***



**ANEXO F.** Control de calidad del extracto hidroalcohólico de la muestra de ensayo.

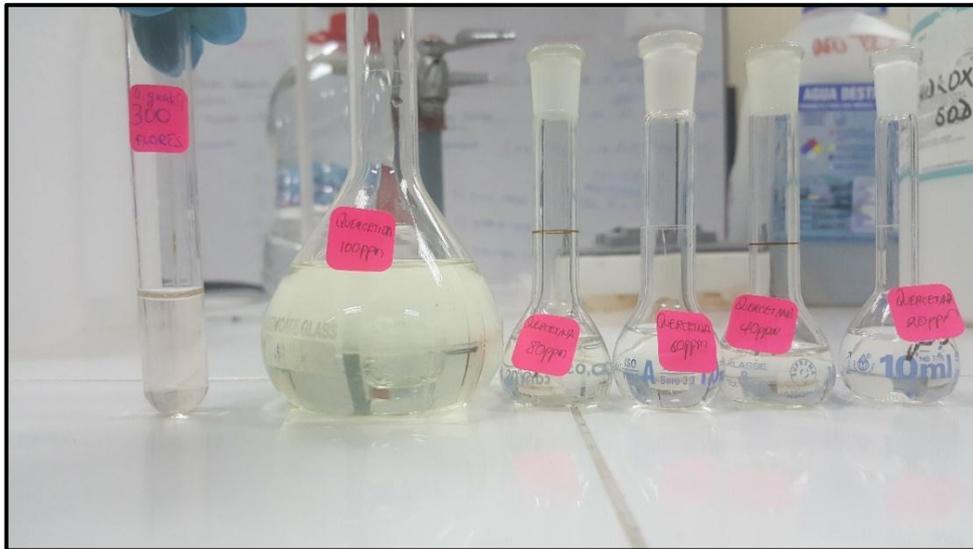


**ANEXO G.** Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de tricloruro de aluminio (Gráfico 1G) y flavonoides mediante el método de Folin Ciocalteu (Gráfico 2G)

Gráfico 1G



Gráfico 2G



**ANEXO H:** Curva de calibración del ácido gálico (Gráfico 1H) y de la quercetina (Gráfico 2H) utilizados para la cuantificación de fenoles totales y fenoles respectivamente.

Gráfico 1H

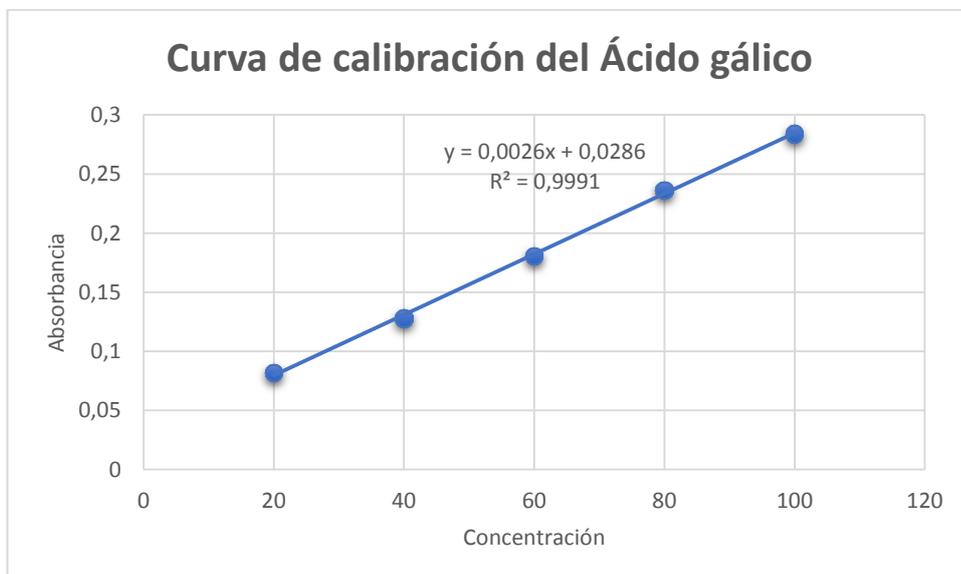
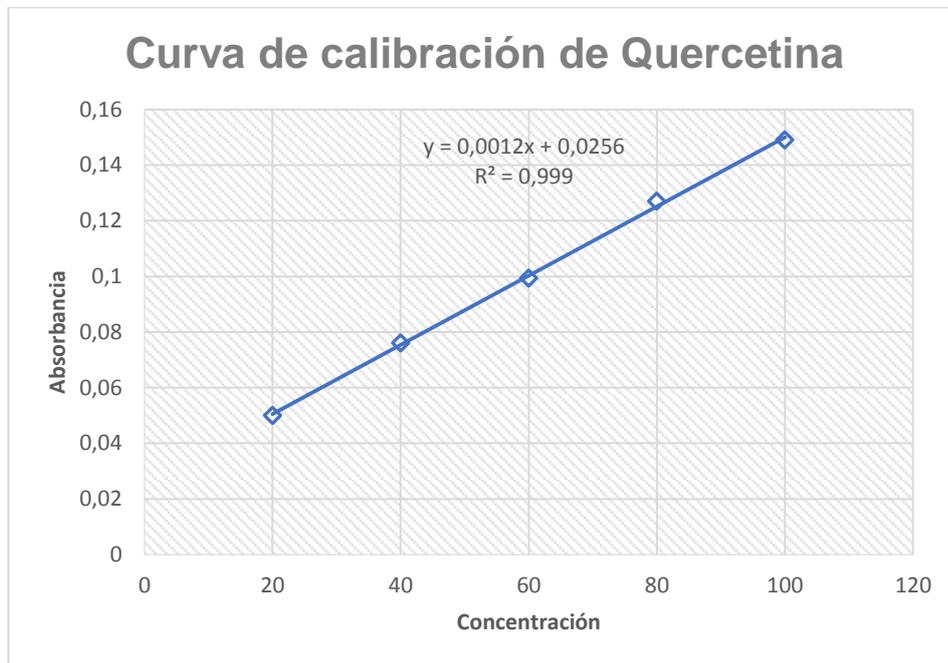
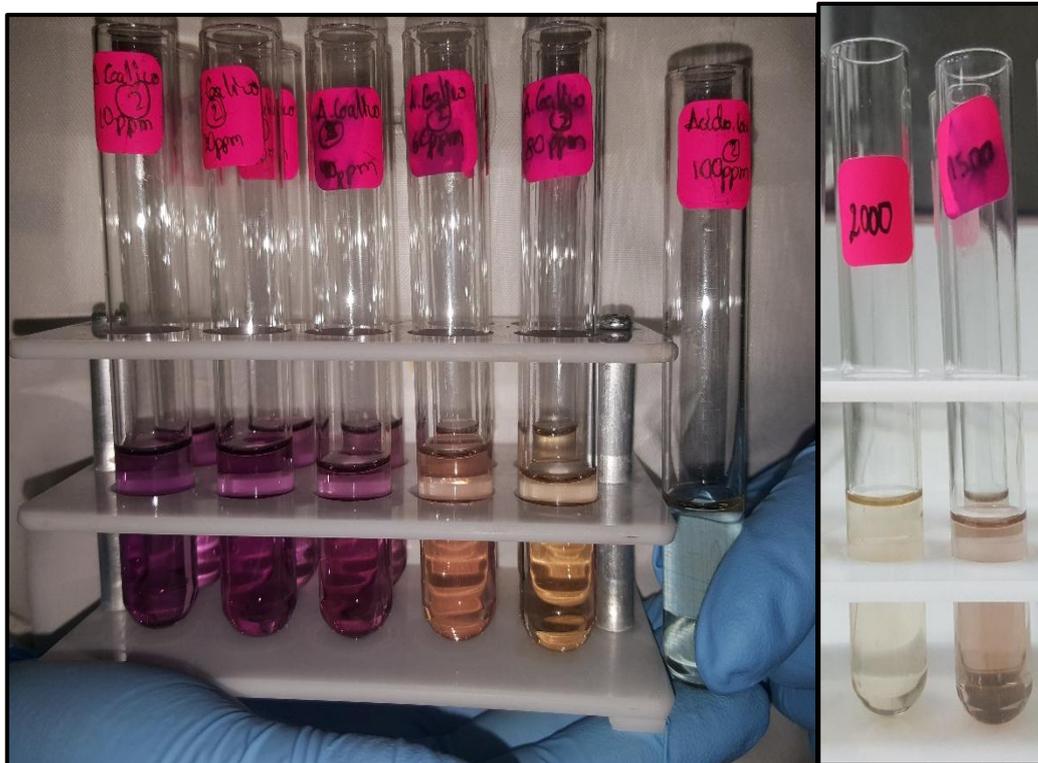


Gráfico 2H



**ANEXO I.** Determinación del potencial antioxidante de flores de *Oreocallis grandiflora* mediante el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)



**ANEXO J.** Porcentaje de inhibición del DPPH por influencia de la concentración del ácido gálico.

| Concentración ppm (ácido gálico) | Absorbancia | % de Inhibición |
|----------------------------------|-------------|-----------------|
| 10                               | 0,501       | 19,715          |
| 20                               | 0,450       | 27,9647         |
| 40                               | 0,393       | 36,9391         |
| 60                               | 0,182       | 70,9135         |
| 80                               | 0,138       | 77,9647         |
| 100                              | 0,096       | 84,6955         |

**ANEXO K.** Porcentaje de inhibición del DPPH por influencia de la concentración del extracto de flores de *Oreocallis grandiflora*.

| Concentración ppm (flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> ) | Absorbancia | % de Inhibición |
|--|-------------|-----------------|
| 10   | 0,602       | 3,53            |
| 50   | 0,591       | 5,29            |
| 100  | 0,564       | 9,62            |
| 200  | 0,528       | 15,38           |
| 500  | 0,470       | 24,68           |
| 1000   | 0,304       | 51,28           |
| 1500   | 0,193       | 68,36           |
| 2000   | 0,132       | 78,36           |

**ANEXO L.** Coeficiente de determinación lineal y actividad antioxidante del extracto de flores *Oreocallis grandiflora*(Gráfico 1L) y del estándar ácido gálico(Gráfico 2L).

Gráfico 1L

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  
FLORES DE O. GRANDIFLORA

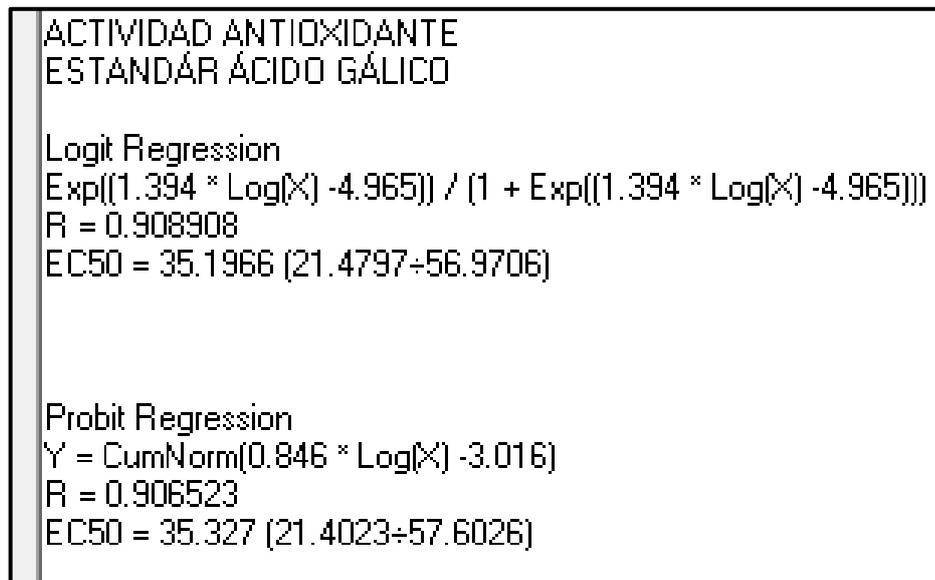
Logit Regression  

$$\text{Exp}((0.8859 * \text{Log}(X) - 6.0327)) / (1 + \text{Exp}((0.8859 * \text{Log}(X) - 6.0327)))$$
R = 0.921868  
EC50 = 906.9216 (662.5848+1252.853)

Probit Regression  

$$Y = \text{CumNorm}(0.5002 * \text{Log}(X) - 3.4033)$$
R = 0.896167  
EC50 = 901.3177 (624.8842+1316.461)

Gráfico 2L



**ANEXO M.** Valores de IC<sub>50</sub> para la determinación de la actividad antioxidante de las flores de *Oreocallis grandiflora* (Gráfico 1M) y el estándar ácido gálico (Gráfico 2M)

Gráfico 1M

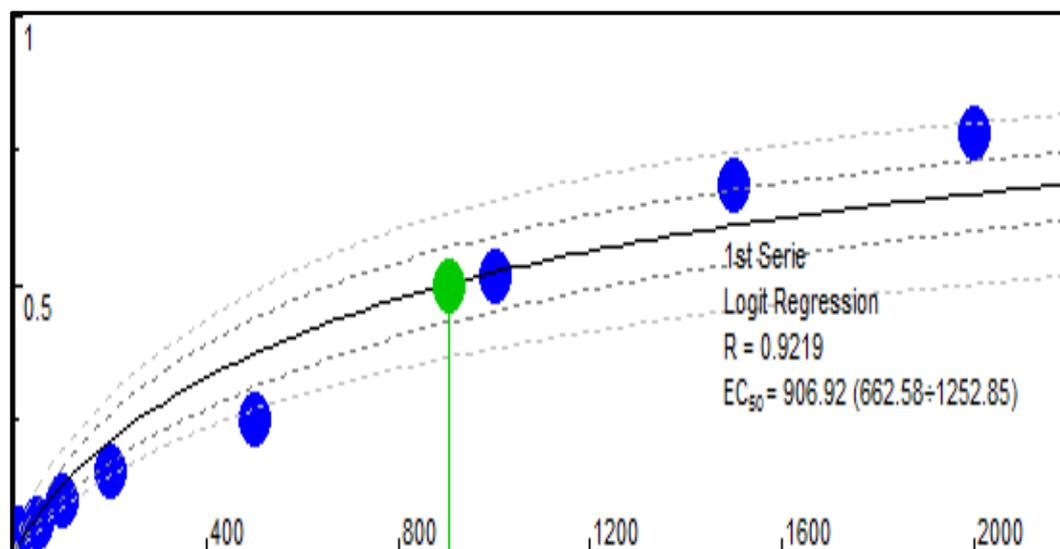
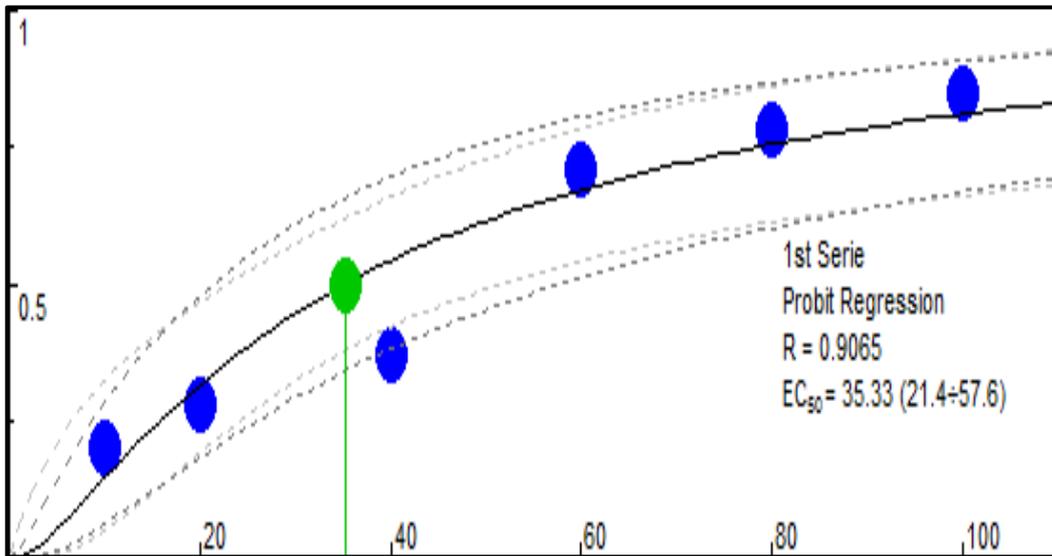


Gráfico 2M



ANEXO N. Ambientación de los animales de experimentación



**ANEXO Ñ:** Volumen de dosificación en función del peso de los animales de experimentación para los diferentes tratamientos.

| Peso (gramos) | Cantidad de la planta(mg) | [C] del extracto las flores de <i>O. Grandiflora</i> | [C] de la solución madre | Volumen extracto | Volumen solvente |
|---------------|---------------------------|--|--------------------------|------------------|------------------|
| 186           | 4,65                      | 25   | 60                       | 0,12             | 1,38             |
| 204           | 20,4                      | 100  | 60                       | 0,51             | 0,99             |
| 210           | 42                        | 200  | 60                       | 1,05             | 0,45             |
| 221           | 5,53                      | 25   | 60                       | 0,14             | 1,36             |
| 223           | 22,3                      | 100  | 60                       | 0,56             | 0,94             |
| 229           | 45,8                      | 200  | 60                       | 1,15             | 0,36             |
| 228           | 5,7                       | 25   | 60                       | 0,14             | 1,36             |
| 233           | 23,3                      | 100  | 60                       | 0,58             | 0,92             |
| 238           | 47,6                      | 200  | 60                       | 1,19             | 0,31             |
| 252           | 6,3                       | 25   | 60                       | 0,16             | 1,34             |
| 259           | 25,9                      | 100  | 60                       | 0,65             | 0,853            |
| 274           | 54,8                      | 200  | 60                       | 1,37             | 0,13             |
| 155           | 3,88                      | 25   | 60                       | 0,10             | 1,40             |
| 173           | 17,3                      | 100  | 60                       | 0,43             | 1,07             |
| 194           | 38,8                      | 200  | 60                       | 0,97             | 0,53             |

**ANEXO O:** Evaluación de la actividad diurética en *rattus norvergucuss*: sustancias de ensayo (Gráfico 10), administración por vía oral (Gráfico 20), caja metabólica (Gráfico 30) y recolección de la muestra (Gráfico 40).

Gráfico 10

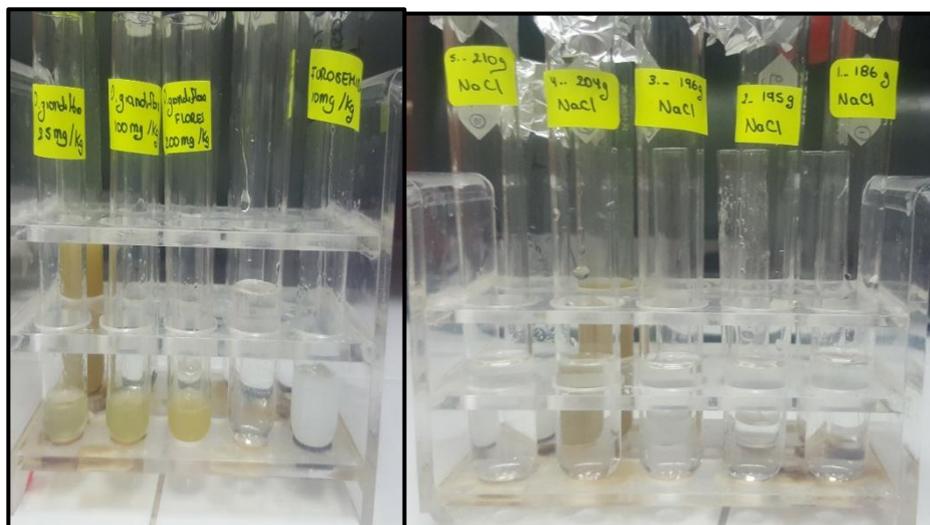


Gráfico 20



Gráfico 30



Gráfico 40



**ANEXO P.** Prueba de normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (Gráfico 1P) y homogeneidad mediante el test de homogeneidad de varianzas (Gráfico 2P) utilizando un factor (dosis) y una variable respuesta (la excreción urinaria)

Gráfico 1P

| Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra |                            |                    |
|---|----------------------------|--------------------|
|   |                            | Excreción urinaria |
| <b>N</b>                                      |                            | 25                 |
| <b>Parámetros normales<sup>a,b</sup></b>      | <b>Media</b>               | 3,8760             |
|   | <b>Desviación estándar</b> | 1,11553            |
| <b>Máximas diferencias extremas</b>           | <b>Absoluta</b>            | ,157               |
|   | <b>Positivo</b>            | ,107               |
|   | <b>Negativo</b>            | -,157              |
| <b>Estadístico de prueba</b>                  |                            | ,157               |
| <b>Sig. asintótica (bilateral)</b>            |                            | ,112 <sup>c</sup>  |

Grafico 2P

| Prueba de homogeneidad de varianzas |     |     |      |
|-------------------------------------|-----|-----|------|
| Excreción urinaria                  |     |     |      |
| Estadístico de Levene               | df1 | df2 | Sig. |
| 4,178                               | 4   | 20  | ,013 |

**ANEXO Q.** Test ANOVA de un factor (Gráfico 1Q) y test de Tukey, en el cual se encuentra el cuadro de comparaciones múltiples (Gráfico 2Q) y el cuadro de subconjuntos homogéneos (Gráfico 3Q).

Gráfico 1Q.

| ANOVA              |                   |    |                  |        |      |
|--------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Excreción urinaria |                   |    |                  |        |      |
|                    | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
| Entre grupos       | 23,706            | 4  | 5,926            | 19,242 | ,000 |
| Dentro de grupos   | 6,160             | 20 | ,308             |        |      |
| Total              | 29,866            | 24 |                  |        |      |

Gráfico 2Q.

| Comparaciones múltiples                  |             |                            |                |      |                               |                 |
|--|-------------|----------------------------|----------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: Excreción urinaria |             |                            |                |      |                               |                 |
| HSD Tukey                                |             |                            |                |      |                               |                 |
| (I) DOSIS                                | (J) DOSIS   | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | 95% de intervalo de confianza |                 |
|  |             |                            |                |      | Límite inferior               | Límite superior |
| Control (-)                              | Furosemida  | -2,76000*                  | ,35100         | ,000 | -3,8103                       | -1,7097         |
|  | 25 mg/kg    | -2,48000*                  | ,35100         | ,000 | -3,5303                       | -1,4297         |
|  | 100 mg/kg   | -2,02000*                  | ,35100         | ,000 | -3,0703                       | -,9697          |
|  | 200 mg/kg   | -1,52000*                  | ,35100         | ,003 | -2,5703                       | -,4697          |
| Furosemida                               | Control (-) | 2,76000*                   | ,35100         | ,000 | 1,7097                        | 3,8103          |
|  | 25 mg/kg    | ,28000                     | ,35100         | ,928 | -,7703                        | 1,3303          |
|  | 100 mg/kg   | ,74000                     | ,35100         | ,255 | -,3103                        | 1,7903          |
|  | 200 mg/kg   | 1,24000*                   | ,35100         | ,016 | ,1897                         | 2,2903          |
| 25 mg/kg                                 | Control (-) | 2,48000*                   | ,35100         | ,000 | 1,4297                        | 3,5303          |

|  |                    |                  |               |             |                |               |
|--|--------------------|------------------|---------------|-------------|----------------|---------------|
|  | <b>Furosemida</b>  | <b>-,28000</b>   | <b>,35100</b> | <b>,928</b> | <b>-1,3303</b> | <b>,7703</b>  |
|  | <b>100 mg/kg</b>   | <b>,46000</b>    | <b>,35100</b> | <b>,688</b> | <b>-,5903</b>  | <b>1,5103</b> |
|  | <b>200 mg/kg</b>   | <b>,96000</b>    | <b>,35100</b> | <b>,084</b> | <b>-,0903</b>  | <b>2,0103</b> |
| <b>100 mg/kg</b>   | <b>Control (-)</b> | <b>2,02000*</b>  | <b>,35100</b> | <b>,000</b> | <b>,9697</b>   | <b>3,0703</b> |
|  | <b>Furosemida</b>  | <b>-,74000</b>   | <b>,35100</b> | <b>,255</b> | <b>-1,7903</b> | <b>,3103</b>  |
|  | <b>25 mg/kg</b>    | <b>-,46000</b>   | <b>,35100</b> | <b>,688</b> | <b>-1,5103</b> | <b>,5903</b>  |
|  | <b>200 mg/kg</b>   | <b>,50000</b>    | <b>,35100</b> | <b>,620</b> | <b>-,5503</b>  | <b>1,5503</b> |
| <b>200 mg/kg</b>   | <b>Control (-)</b> | <b>1,52000*</b>  | <b>,35100</b> | <b>,003</b> | <b>,4697</b>   | <b>2,5703</b> |
|  | <b>Furosemida</b>  | <b>-1,24000*</b> | <b>,35100</b> | <b>,016</b> | <b>-2,2903</b> | <b>-,1897</b> |
|  | <b>25 mg/kg</b>    | <b>-,96000</b>   | <b>,35100</b> | <b>,084</b> | <b>-2,0103</b> | <b>,0903</b>  |
|  | <b>100 mg/kg</b>   | <b>-,50000</b>   | <b>,35100</b> | <b>,620</b> | <b>-1,5503</b> | <b>,5503</b>  |
| <b>*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.</b> |                    |                  |               |             |                |               |

Gráfico 3Q.

| Excreción urinaria   |   |                              |        |        |
|--|---|------------------------------|--------|--------|
| HSD Tukey <sup>a</sup>   |   |                              |        |        |
| DOSIS  | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |        |        |
|  |   | 1                            | 2      | 3      |
| Control (-)  | 5 | 2,1200                       |        |        |
| 200 mg/kg  | 5 |                              | 3,6400 |        |
| 100 mg/kg  | 5 |                              | 4,1400 | 4,1400 |
| 25 mg/kg   | 5 |                              | 4,6000 | 4,6000 |
| Furosemida   | 5 |                              |        | 4,8800 |
| Sig.   |   | 1,000                        | ,084   | ,255   |
| Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. |   |                              |        |        |
| a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.         |   |                              |        |        |