

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIDIABÉTICA  
DEL EXTRACTO NATURAL DE ARTOCARPUS  
HETEROPHYLLUS (JACKFRUIT) EN RATAS  
HIPERGLICÉMICAS”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA  
EN FARMACIA**

**VINICIO ESTEBAN ALVARADO ARTAVIA**

**Tutor:**

**Dr. Vinicio Montero Méndez**

**Lector:**

**Dra. Sara González Camacho**

**San José, Costa Rica**

	15
Hipótesis .....	22
Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Justificación.....	23
Proyección .....	24
Antecedentes.....	25
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	29
Diabetes Mellitus.....	29
Aspectos generales.....	29
Mecanismo de liberación y acción de la insulina .....	30
Fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 2 .....	32
Muerte de células $\beta$ -pancreáticas en Diabetes Mellitus tipo 2.....	32
Productos naturales.....	34
Aspectos generales.....	34
Proceso de elaboración de productos naturales .....	36
Principales compuestos farmacológicos naturales.....	38
Productos naturales utilizados en Diabetes Mellitus .....	44
Jackfruit ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> ).....	45
Aspectos generales.....	45
Uso del Jackfruit en la medicina tradicional.....	46
Modelos experimentales con animales de laboratorio.....	47
Aspectos generales.....	47
Aspectos bioéticos .....	48
Infraestructura y ambiente animal .....	49
Monitoreo periódico.....	50
Selección de modelos experimentales animales .....	51
Eutanasia .....	52
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO .....	53
Enfoque y diseño .....	53
Instrumentos .....	54
Objetos de investigación.....	55

Fase I. Elaboración del producto natural .....	55
Fase II. Diseño experimental animal .....	59
Variables .....	62
Cronograma.....	63
<b>CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
Obtención e identificación de los extractos naturales .....	65
Obtención de extractos.....	65
Identificación de metabolitos secundarios .....	73
Ensayo animal.....	87
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>93</b>
Conclusiones.....	93
Recomendaciones .....	97
Referencias .....	99
<b>ANEXOS.....</b>	<b>105</b>
Anexo 1. Datos tabulados del analisis estadístico ANOVA de dos vías con la prueba de Bonferroni post-hoc.....	105

### **Tablas**

Tabla 1. Reactivos utilizados para cada fase experimental.....	54
Tabla 2. Tratamiento administrado a cada grupo animal.....	61
Tabla 3. Variables por estudiar .....	62
Tabla 4. Cronograma.....	63
Tabla 5. Comparación de valores obtenidos por IR.....	86
Tabla 6. Valores de glicemia obtenidos para el tratamiento con Agua VO.....	87
Tabla 7. Valores de glicemia obtenidos para el tratamiento con Glibenclamida.....	87
Tabla 9. Valores de glicemia obtenidos del tratamiento con extracto a 250mg/kg .....	88
Tabla 8. Valores de glicemia obtenidos del tratamiento con extracto a 500mg/kg .....	88
Tabla 10. Valores de glicemia obtenidos dell tratamiento con extracto a 1000mg/kg .....	88

## Figuras

Figura 1. Drogas basadas en moléculas de medicina tradicional.....	39
Figura 2. Parámetros de evaluación de toxicidad oral LEBi-UCR .....	62
Figura 3. Equipo utilizado extracción acuosa .....	66
Figura 4. Equipo utilizado en filtración y concentrado del extracto acuoso .....	66
Figura 5. Residuo de tratamiento con hexano .....	67
Figura 6. Hojas secas con baja concentración de pigmentos naturales.....	68
Figura 7. Equipo utilizado en filtración del extracto tratado con hexano .....	68
Figura 8. Equipo utilizado en extracción con etanol.....	69
Figura 9. Aspecto final del extracto etanólico.....	70
Figura 10. Proceso de concentración de extracto mediante rotavapor .....	71
Figura 11. Proceso de congelamiento de la muestra con nitrógeno líquido.....	71
Figura 12. Proceso de liofilización.....	72
Figura 13. Liofilizado obtenido.....	72
Figura 14. Identificación de taninos en extracto acuoso .....	73
Figura 15. Identificación de taninos en extracto etanólico.....	74
Figura 16. Prueba de Dicromato de potasio en extracto etanólico (Acercamiento).....	74
Figura 17. Identificación de taninos en extracto etanólico con baja concentración de pigmentos	75
Figura 18. Pruebas de identificación de saponinas en extracto acuoso.....	76
Figura 19. Prueba de Liebermann-Burchard extracto etanólico .....	77
Figura 20. Prueba de Salkowski extracto etanólico .....	77
Figura 21. Prueba de Liebermann-Burchard extracto etanólico con baja concentración de pigmentos .....	78
Figura 22. Prueba de Salkowski en extracto etanólico con baja concentración de pigmentos .....	79
Figura 23. Prueba de Shinoda extracto etanólico .....	80
Figura 24. Prueba de Shinoda extracto acuoso .....	81
Figura 25. Prueba de Shinoda en extracto con baja concentración de pigmentos .....	82
Figura 26. SpeedVec utilizado para la eliminación de solventes .....	84
Figura 27. Muestra obtenida del equipo SpeedVec.....	84

Figura 28. Espectro IR del extracto de <i>A. heterophyllus</i> .....	85
Figura 29. Porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo.....	89

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

Las áreas de la salud especializadas en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades crónicas que afecten a grandes poblaciones han intentado mejorar, en contextos institucionales, la prevalencia y las vías de tratamiento de enfermedades tales como la Diabetes Mellitus mediante la responsabilidad de prevenir factores de riesgo en la población y el descubrimiento de nuevas vías de tratamiento farmacológico y no farmacológico en personas de alto riesgo o de actual padecimiento. Sin embargo, el incremento de padecimientos, complicaciones asociadas y muertes por parte de la Diabetes mellitus continua de manera prevalente.

De este modo, todo el planteamiento y el desarrollo de este proyecto de investigación se fundamentan en una interrogante que justifica y da sentido a los planteamientos y la metodología: ¿Es realmente necesario mantener el desarrollo de nuevas vías de tratamiento farmacológico para enfermedades con incidencia exacerbada en los seres humanos como lo es la Diabetes Mellitus?

La respuesta a esta pregunta podría parecer más que obvia, debido a que, como seres humanos trabajadores, siempre se debe tener un incentivo de ampliar nuestros conocimientos hacia lo desconocido con el fin de realizar nuevos descubrimientos que conlleven a un aporte a la humanidad. Sin embargo, hoy estas investigaciones han disminuido o, incluso, eliminado por razones diversas entre las cuales se encuentran principalmente las dificultades que ofrece su estudio.

Según Jiménez (2013) en su artículo *“El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual”* entre estas dificultades se encuentran: la forma tradicional de su estudio (extracción, actividad, aislamiento y caracterización estructural) muchas veces es lenta y laboriosa, en muchos casos problemas relacionados con la propiedad intelectual, el hecho de que muchos descubrimientos realizados en este campo por organismos públicos de investigación no sean protegidos por una patente dificulta, e incluso impide, su desarrollo por las industrias farmacéuticas (p. 134).

Sin embargo, aun así, conociendo las dificultades que presenta este tipo de investigaciones se debe continuar trabajando en los nuevos descubrimientos, debido a que las

utilidades y beneficios que resultan son de mucho mayor impacto que los puntos débiles destacados anteriormente. Jiménez, en su artículo, también menciona que los productos naturales presentan una gran variedad de utilidades intrínsecas que pueden ser resumidas en los siguientes puntos:

Suministra buenos compuestos cabeza de serie. En muchos casos, poseen los requerimientos adecuados de efectividad y selectividad y tienen las necesarias propiedades farmacocinéticas para originar un agente terapéutico útil clínicamente.

La diversidad estructural química es uno de sus valores más preciados. La aproximación basada en el uso de PNs bioactivos cumple las condiciones de diversidad estructural y actividad biológica necesarias para conseguir una quimioteca de calidad. Es necesario distinguir entre biodiversidad, que está más relacionada con la diversidad biológica, y biodiversidad química, que se refiere a que los distintos extractos naturales rindan productos naturales con estructuras diferentes.

Son altamente evolucionados. Han sido modelados bajo la presión de la selección natural especialmente con el fin de enlazarse con una elevada afinidad a proteínas y, por tanto, representan puntos de partida con propiedades biológicas confirmadas.

Como no han sido biosintetizados para que interaccionen directamente con las proteínas más implicadas en las enfermedades humanas, muchas veces deben ser optimizados a partir de sus estructuras, siempre y cuando se encuentre un acceso sintético factible, multiplicando así su potencial como prototipo de nuevos fármacos. (p.140).

Una vez establecida la importancia, las desventajas y los beneficios de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento farmacológico, a partir de productos naturales, se debe considerar en qué área epidemiológica se pretende señalar el resultado del proyecto por realizar, lo cual es un concepto que se debe observar con transparencia debido a que todas las personas o seres vivos con algún tipo de padecimiento que afecte o comprometa su calidad de vida merecen recibir atención médica y farmacéutica con la finalidad de eliminar o controlar el factor afectante.

Sin embargo, de acuerdo con los reportes epidemiológicos a nivel nacional y mundial se debe tomar en cuenta la prioridad que existe hacia el tratamiento y abordaje de enfermedades que afecten en gran medida a las poblaciones y que representen las principales causas de aumento de

niveles de morbilidad poblacional en los sistemas de salud nacionales, como lo es la Diabetes Mellitus.

En Costa Rica, la Caja Costarricense de Seguro Social establece en su publicación “*Guía para la atención de personas con Diabetes Mellitus tipo 2, II Edición.*”, vigente desde el año 2007; que el impacto de este padecimiento en materia de costo económico y social para el país, el individuo y su familia obliga al desarrollo de un proceso de mejoramiento continuo de la calidad de la atención, ya que constituye la causa de estancia más prolongada, la principal causa de diálisis renal, amputaciones no traumáticas, ceguera, así como la segunda causa de consulta de personas en edad adulta. Es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, que representa la primera causa de muerte en el país. (pp. 15-19)

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud en su “*Informe mundial sobre la diabetes*”, (OMS, 2016); reporta una carga mundial en la cual, según las estimaciones, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. La prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7 % al 8,5 % en la población adulta. Ello supone también un incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso o la obesidad.

En la última década, la prevalencia de la diabetes ha aumentado más deprisa en los países de ingresos bajos y medianos que en los de ingresos altos. En 2012, la diabetes provocó 1,5 millones de muertes. Un nivel de glucosa en la sangre superior al deseable provocó otros 2,2 millones de muertes, al incrementar los riesgos de enfermedades cardiovasculares y de otro tipo. Un 43 % de estos 3,7 millones de muertes ocurren en personas con menos de 70 años. El porcentaje de muertes atribuibles a una glucemia elevada o la diabetes en menores de 70 años de edad es superior en los países de ingresos bajos y medianos que en los de ingresos altos. (párr. 2-4)

No hay una solución sencilla a la problemática de la diabetes, sin embargo, la población y los profesionales de la salud tienen la responsabilidad de educarse y tomar un papel en la prevención y tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones asociadas. Por ello, resulta relevante la incorporación de nuevas vías de tratamiento de la Diabetes Mellitus con el fin de lograr una mejoría sustancial de la salud y una expectativa de vida normal en cuanto a calidad y cantidad de años de vida.

En el área de la investigación farmacológica, relacionada con la incorporación de nuevos tratamientos a partir de productos naturales, se ha utilizado en gran medida modelos animales sencillos con el fin de evaluar su eficacia en el efecto terapéutico deseado, así como condiciones de administración y reacciones adversas, por lo que en este estudio se debe tomar en cuenta la siguiente interrogante. ¿Cuál es la efectividad de utilizar un modelo animal para validar el procedimiento de elaboración de un producto natural hipoglicemiante a base de *A. heterophyllus*?

### **Hipótesis**

La efectividad del extracto es muy significativa al utilizar un modelo animal para establecer oficialmente el proceso de elaboración de un producto natural a partir de *A. heterophyllus*.

### **Objetivos**

#### **Objetivo General**

Validar el procedimiento de extracción de hojas maduras de *A. heterophyllus* para su eficacia hipoglicemiante mediante un modelo animal apropiado.

#### **Objetivos específicos**

Establecer las condiciones especiales de un extracto de *Artocarpus heterophyllus* con actividad antidiabética que resulte en un producto natural estable, como terapia farmacológica en personas diabéticas y no diabéticas.

Describir la eficacia hipoglicemiante del extracto natural de *Artocarpus heterophyllus* al ser evaluado en roedores de laboratorio.

Comparar los resultados del extracto obtenido contra la terapia de Glibenclamida para la Diabetes mellitus.

## Justificación

Se justifica este estudio como un aporte al tratamiento de una enfermedad crónica la cual ha presentado una epidemiología en crecimiento de manera exponencial en los últimos años, según la OMS en su “*Informe mundial sobre la diabetes*”, (OMS, 2016) el número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014. (párr. 2-4). Como una estrategia alternativa a las distintas vías de tratamiento de mantenimiento de la Diabetes Mellitus tipo 2, con el fin de brindar conocimientos detallados del producto natural a utilizar, sus propiedades y su uso en el tratamiento y prevención de patologías que afectan a las poblaciones de manera universal.

Por lo mencionado anteriormente, se tiene como principal propósito de estudio la planeación y la elaboración de nuevas vías de tratamiento farmacológico en la Diabetes Mellitus tipo 2. En concreto, el estudio que se presenta a continuación se acoge de las distintas oportunidades de descubrir nuevas sustancias útiles para los seres humanos y seres vivos que le rodean a partir de los productos naturales disponibles en la naturaleza. Se establece así una propuesta de tratamiento alternativo a la terapia convencional que reciben los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 y/o personas con cuadros asociados a hipoglicemia y prediabetes.

Tomando en cuenta la metodología por utilizar, la investigación pretende revelar condiciones de uso, seguridad y administración de los productos naturales a analizar, lo cual es fundamental farmacológicamente con el fin de evitar problemas relacionados con medicamentos a la hora de ser administrados y durante su permanencia en el organismo, los cuales son una de las razones que distancian al paciente del uso racional de medicamentos, y como consecuencia causante de terapias farmacológicas poco efectivas o nulas o, por el lado contrario, agravantes de la situación, por lo que se garantizaría un efecto terapéutico óptimo en el paciente a la hora de utilizar el producto a investigar.

En la Diabetes, una falta de adherencia farmacológica puede conllevar a una acelerada aparición de complicaciones asociadas a este padecimiento, por lo que se abordaría esta problemática en personas que por diversas razones no consumen el tratamiento completo para su patología.

Este estudio se impulsa de la importancia que tiene la aproximación de compuestos de origen natural, de mundo marino, de microorganismos, de aprovechamiento de la Etnofarmacología y de la mejora de fármacos existentes en la búsqueda y obtención de nuevas sustancias farmacológicas; siendo esta una estrategia viable en efectividad y mayor simplicidad en comparación a métodos alternativos como los son la síntesis química, aproximaciones racionales, cribado sistémico y la Biotecnología; otorgando el descubrimiento de sustancias de las cuales el ser humano ha tenido a disposición gracias a la naturaleza, con la única necesidad de ser descubiertas debido al esfuerzo del ser humano, en la búsqueda de mejorar la calidad de vida y brindar salud a las personas y los seres vivos con los que convivimos.

Esta investigación se encuentra orientada directamente a la problemática actual señalada a la Diabetes mellitus a nivel nacional, siendo esta uno de los factores de riesgo directos a problemas cardiovasculares los cuales son la segunda causa de muerte de impacto en el país y la tercera a nivel internacional, causando complicaciones severas y en muchos casos, la muerte. El estudio también pretende incentivar a la población a tomar responsabilidad en la prevención de la Diabetes mellitus, informándose sobre factores de riesgo de la enfermedad y estados de alerta; debido a que la educación y el compromiso responsable a un estilo de vida saludable es la única manera de obtener una disminución notable en la incidencia de esta enfermedad.

### **Proyección**

Como proyección se pretende realizar una publicación modelo en formato de artículo científico en el cual se evidencie los resultados obtenidos en esta investigación, a manera de brindar la información necesaria para la preparación, uso y características del producto natural a investigar y para instruir a futuros investigadores que les sea útil la información que se desea describir con este proyecto.

## Antecedentes

Jagtap y Bapat. (2010). En una revisión del género *Artocarpus* “*Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*” (Artocarpus: Una revisión de sus usos tradicionales, fitoquímica y farmacología) llevado a cabo por el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Shivaji, India, se brindó información exhaustiva de la acción farmacológica que posee el género *Artocarpus* (Moraceae), el cual comprende aproximadamente 50 especies de árboles de hoja perenne y caducifolios, presenta una cercana relación entre las fuentes tradicionales y modernas para usos etnofarmacológicos en el tratamiento de la inflamación, la fiebre producida por malaria, diarrea, diabetes y la infección por *Taenia*.

También señalan que los extractos poseen gran variedad de compuestos fenólicos entre los cuales se destacan flavonoides, estilbenoides, arylbenzofuranos y una lectina vegetal llamada jacalina. Los extractos y metabolitos de *Artocarpus* se obtienen principalmente los de las hojas, corteza, tallos y frutos. Esto nos indica que gracias a la variedad de compuestos que posee esta especie, esta puede ser utilizada con una gran variedad de fines farmacológicos.

El-Beshbishy et al. (2011). En su ensayo “*Antioxidant Activity of Artocarpus heterophyllus Lam. (Jack Fruit) Leaf Extracts: Remarkable Attenuations of Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Streptozotocin-Diabetic Rats*” (Actividad antioxidante del extracto de hojas de *Artocarpus Heterophyllus*: Atenuaciones notables de hiperglicemia e hiperlipidemia en ratas con diabetes inducida por Streptozotocina), prepararon un extracto etanólico de hojas de jackfruit, el cual posteriormente fue sometido a estudios fitoquímicos, los cuales revelaron la presencia de metabolitos secundarios tales como carbohidratos, glucósidos, esteroides, taninos y flavonoides, sin embargo, no reportaron la presencia de compuestos saponinas. También se reportó que por el método de maceración en etanol al 70%, el extracto al ser liofilizado posee un rendimiento del 9,85% w/w una vez liofilizado. Posteriormente a esto se reconstituyó el extracto en distintos solventes orgánicos y se evaluó su capacidad antioxidante, hipoglicemiante e hipolipidémica.

Lo reportado en el ensayo anterior expone de manera efectiva la fitoquímica presente en las hojas de *A. heterophyllus* y en el extracto etanólico de las mismas, lo cual orienta esta investigación en los posibles compuestos metabolitos secundarios responsables de la acción

farmacológica natural que se busca demostrar, así mismo facilita la selección de pruebas de identificación para cuantificar la presencia de estos mismos compuestos.

Fernando, Thabrew y Karunanayake. (1989) en el análisis realizado “*Hypoglycaemic activity in some medicinal plants in Sri-Lanka*” (Actividad hipoglicemiante en algunas plantas medicinales en Sri-Lanka) en la Universidad de Ruhuna, Sri-Lanka. Se llevó a cabo una comparación en la actividad hipoglicemiante de las plantas medicinales *Obseckia octandra*, *Artocarpus heterophyllus* y *Bambusa vulgaris*, en el cual se destacó que el tratamiento con extracto de *Artocarpus heterophyllus* demostró una acción máxima hipoglicemiante a partir de las 5 horas en delante de haberse administrado el extracto, por lo que se concluye que este extracto se puede utilizar como tratamiento farmacológico de mantenimiento estable de bajos niveles de glucosa en sangre.

Paralelamente en este mismo estudio se llevó a cabo una comparación de potencia hipoglicemiante de las plantas medicinales utilizadas contra la Tolbutamida, una sulfonilurea utilizada en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2; obteniéndose como resultado que *O. octandra* y *B. vulgaris* poseen un efecto similar en potencia hipoglicemiante a la tolbutamida; sin embargo, el extracto de *A. heterophyllus* demostró una potencia aun mayor a la de la tolbutamida en capacidad hipoglicemiante. Este estudio revela que la utilización de un extracto de *Artocarpus heterophyllus* es eficaz en mantenimiento de niveles estables de glucosa en sangre.

Chakrewarthy, Thabrew, Weerasuriya y Jayasekera (2010). En un estudio preliminar clínico, “*Evaluation of the hypoglycemic and hypolipidemic effects of an ethylacetate fraction of Artocarpus heterophyllus (jak) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats*” (Evaluación de los efectos hipoglicemiantes e hipolipidemicos de una fracción de extracto etilacetato de hojas de *Artocarpus heterophyllus* en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina), en la Universidad de Kelaniya, Sri-Lanka, en el cual se utilizó extracto acuoso de hojas maduras de *Artocarpus heterophyllus* en un modelo de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, demostró mediante los porcentajes de reducción de glucosa sérica, colesterol total y niveles de triglicéridos séricos, que el extracto de *A. heterophyllus* posee uno o más principios hipoglicemicos e hipolipidemicos los cuales tienen el potencial de ser desarrollados oficialmente para el tratamiento de diabetes específicamente asociada a un estado hiperlipidémico. Por lo mencionado

anteriormente se evidencia que el uso de un modelo animal es eficiente para determinar la actividad hipoglicemiante de *A. heterophyllus*.

Kotowaroo, Mahomoodally, Gurib-Fakim y Subratty. (2006). En un estudio realizado in vitro, “*Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of mauritius for possible  $\alpha$ -amylase inhibitory effects in vitro*” (Cribado de plantas antidiabéticas tradicionales de Mauritius con posible efecto inhibidor de  $\alpha$ -amilasa in vitro), en Mauritius, en el cual se llevó a cabo un cribado de 7 especies de plantas medicinales de procedencia indígena en las cuales se analizó la capacidad antidiabética mediante la acción sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa, demostró que entre las especies estudiadas *A. heterophyllus* fue la que demostró una inhibición más significativa sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa y para comprobarlo se realizó un ensayo bioquímico en plasma de ratas in vitro el cual respaldó la acción hipoglicemiante de *A. heterophyllus* principalmente reduciendo los picos de glucosa post-prandial. Se destaca que el mecanismo de acción del extracto de estudio está orientado en la acción sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa.

Ariyananda, Fernando, Karunanayake y Thabrew. (1990). Llevaron a cabo una investigación, “*Effect of artocarpus heterophyllus and asteracanthus longifolia on glucose tolerance in normal human subjects and in maturity-onset diabetic patients*” (Efecto de *Artocarpus heterophyllus* y *Asteracanthus longifolia* sobre la tolerancia de glucosa en seres humanos sanos y pacientes diabéticos de edad avanzada). En la cual se evaluó el efecto de un extracto en agua caliente de hojas de *Artocarpus heterophyllus* y *Asteracanthus longifolia*; en la tolerancia a la glucosa en sujetos humanos sanos y sujetos diabéticos de edad avanzada. Los extractos de ambas plantas mejoraron significativamente la tolerancia a la glucosa en los sujetos sanos y diabéticos en dosis orales de 20g/kg de peso corporal. Este estudio nos revela que, aparte de los estudios ya llevados a cabo exitosamente en animales como ratones y ratas de laboratorio; ya ha sido evaluado de manera positiva el efecto de esta planta sobre seres humanos diabéticos y no diabéticos.

A nivel nacional Herrera et al. (2010) en su investigación llevada a cabo en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica “*Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of Witheringia solanacea in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats*” (Efecto hipoglicemiante y antihiperlicemiante de la *Witheringia solanaceae* en ratas normales y con hiperglicemia inducida por aloxano), un modelo animal en el cual se utilizaron ratas macho de la

cepa Sprague-Dawley, a las cuales se les administró una carga de glucosa antes de administrar el extracto de la planta en investigación y se realizaron tomas de glucosa a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración del extracto.

De esta metodología planteada deriva la metodología a utilizar en este proyecto de investigación, la cual posee la misma estructura de manejo de animales previo a la administración del extracto, control positivo y negativo, tiempos de toma de niveles glicémicos y vías de administración de los diferentes tratamientos utilizados. Sin embargo, difiere en la cepa de animales utilizada, el peso promedio de los animales y la sustancia utilizada para inducir el estado hiperglicémico en los animales de prueba, lo cual se debe al mecanismo de acción que en pocas ocasiones se ha reportado para el extracto de *A. heterophyllus*.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### Diabetes Mellitus

#### Aspectos generales

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica que aparece cuando las células del páncreas no producen insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La DM es un padecimiento conocido desde hace siglos; sin embargo, al final del milenio pasado, el conocimiento de su etiología, historia natural y epidemiología estaba aún incompleto (Altamirano, 2001, pp. 35-37).

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) divide en tres los tipos de DM. La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia. Por lo general, es diagnosticada en niños, adolescentes o adultos jóvenes; puede ser esta heredable y se caracteriza por una producción deficiente de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas (National Institutes of Health, 2009, pp. 10-1)

Según Chen, Magliano y Zimmet (2011) la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta, se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa 90 % de los casos mundiales y se debe, en gran medida, a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Por último, la diabetes gestacional, la cual es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por vez primera durante el embarazo. (pp. 228-236)

Aguilar, Corona, Barquera, Rojas y Villalpando (2012) indican que el rápido incremento en la prevalencia de DM en el mundo ha demostrado la importancia que el estilo de vida tiene para el desarrollo de la enfermedad. En solo tres décadas, los estudios epidemiológicos han tenido un gran impacto en la investigación, diagnóstico, atención y prevención de la diabetes. La epidemiología de la diabetes ha hecho importantes aportaciones, además del análisis sobre la frecuencia y distribución del padecimiento.

Altamirano (2001) explica que la frecuencia de diabetes ha aumentado dramáticamente en los últimos 40 años, sin considerar que tanto en los países desarrollados como en los subdesarrollados existe un subregistro. En el 2012, aproximadamente, 350 millones de personas

en todo el mundo padecían algún tipo de DM. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce hasta entre 5 y 10 años, y los pacientes con diabetes tienen un riesgo de mortalidad dos veces mayor que las personas sin diabetes. (pp. 35-37).

### **Mecanismo de liberación y acción de la insulina**

La liberación de insulina es un proceso indispensable en la homeostasis del cuerpo como respuesta al aporte energético del consumo de alimentos. Su liberación es inducida, principalmente, en respuesta al incremento de glucemia; pero, al mismo tiempo, es regulada por diversas sustancias (nutrimentos, hormonas gastrointestinales, hormonas pancreáticas, neurotransmisores del sistema nervioso autónomo, entre otras). La glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos favorecen la secreción de insulina, al igual que la activación del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico y la estimulación del nervio vago, mientras que los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos inhiben la liberación de insulina. (Doyle y Egan, 2003, pp.105-131).

La despolarización de la célula  $\beta$  provoca la liberación de insulina; el proceso inicia con el aumento de la concentración plasmática de carbohidratos: la fructosa y la glucosa ingresan en la célula  $\beta$  a través del transporte facilitado mediado por el transportador de glucosa 2 (GLUT2). El GLUT2 es un transportador de glucosa con baja afinidad, se expresa en el hígado, riñón, células  $\beta$  del páncreas y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. (Binder et al, 2011, pp. 7-12).

El GLUT2 participa en la regulación de la secreción de insulina: solo permite el transporte de glucosa cuando la concentración plasmática alcanza el umbral de afinidad como sustrato de GLUT2 ( $>70\text{mg/dl}$ ), y en respuesta conduce a la liberación de la cantidad requerida de insulina para mantener la concentración de glucosa. Después de la ingesta de alimento, el hígado, por su parte, es capaz de incorporar la glucosa a través del GLUT2 para convertirla rápidamente en glucógeno (polímero de carbohidratos como almacén (Acosta et al, 2007, pp. 76-86).

De forma inversa, durante el período posprandial tardío (período comprendido entre 6 y 8 horas de ayuno), el glucógeno sufre degradación para generar moléculas de glucosa, que salen de

la célula hepática a la circulación sistémica. Se preserva, de esta manera, la glucemia en valores fisiológicos; por lo anterior, el GLUT2 es un transportador bidireccional que puede transportar glucosa desde la sangre al tejido o desde el tejido hacia la sangre, según se requiera. El GLUT2 tiene, también, la capacidad de transportar fructosa, por la presencia de un segmento existente en GLUT5 (transportador de fructosa clásico) y sustituye el presente en GLUT de alta afinidad por la glucosa, como el GLUT1. El GLUT5 es un transportador específico para fructosa que se expresa fundamentalmente en las células del ribete en cepillo del intestino delgado, donde modula la absorción de fructosa desde el lumen a la célula epitelial intestinal y no reconoce a la glucosa (Wright, Loo y Hirayama, 2011, pp. 733-794).

Tras el ingreso de la glucosa (o fructosa) al interior de la célula  $\beta$  mediante el GLUT2, el carbohidrato es fosforilado (glucosa-6-fosfato, G-6-P) por la glucocinasa; este proceso determina la velocidad de glucólisis y de los subsecuentes procesos oxidativos que culminan con el incremento en la relación ATP/ADP del citosol. Finalmente, la despolarización de la célula ocurre por causa del cierre de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP (KATP). Se incrementa el potencial de membrana hasta alcanzar la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L. La entrada de  $Ca^{2+}$  citosólico induce la fusión de la vesícula exocítica que contiene insulina con la membrana plasmática. (Doyle et al., 2003, pp. 105-131).

El canal K-ATP es un octámero compuesto de cuatro subunidades Kir 6.2 y cuatro SUR1; ambos tipos de subunidades tienen dominios de unión a nucleótidos. La subunidad Kir 6.2 se encarga de la respuesta inhibitoria inducida por la unión con ATP. La subunidad SUR1 tiene sitios de unión para el ADP y el diazóxido (que favorecen la apertura del conducto), así como para las sulfonilureas y meglitinida (ambas inhiben la apertura conducto); por lo tanto, algunas mutaciones en las subunidades alteran la liberación de insulina. Las proteínas cinasa C y A (PKC y PKA, respectivamente) participan en la fosforilación de proteínas que promueven la exocitosis de insulina; además, pueden fosforilar al canal K-ATP, facilitando su cierre. (Doyle et al., 2003, pp. 105-131).

## **Fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 2**

Las causas que desencadenan la diabetes tipo 2 se desconocen en el 70-85 % de los pacientes; al parecer, influyen diversos factores como la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), junto con factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de diabetes, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria. Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos (Madrigal y Guzmán, 2003, pp.14-23).

Del 80 al 90 % de las personas tienen células  $\beta$  sanas con capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina (obesidad, embarazo y cortisol) mediante el incremento en su función secretora y en la masa celular. Sin embargo, en el 10 al 20 % de las personas se presenta una deficiencia de las células  $\beta$  en adaptarse, lo cual produce un agotamiento celular, con reducción en la liberación y almacenamiento de insulina (Maedler, 2008, pp.408-420).

La diabetes tipo 2 se asocia con una falta de adaptación al incremento en la demanda de insulina, además de pérdida de la masa celular por la glucotoxicidad. Sin embargo, el receptor a insulina presenta alteraciones en su función. Cuando la insulina se une a su receptor en células del músculo, inicia las vías de señalización complejas que permiten la translocación del transportador GLUT4 localizado en vesículas hacia la membrana plasmática, para llevar a cabo su función de transportar la glucosa de la sangre al interior de la célula. La señalización del receptor termina cuando es fosforilado en los residuos de serina/treonina en la región intracelular para su desensibilización, y finalmente esto permite la internalización del receptor. (Campanile et al, 2009, pp.407-415)

## **Muerte de células $\beta$ -pancreáticas en Diabetes Mellitus tipo 2**

La mayoría de los triglicéridos del cuerpo se encuentran en el tejido adiposo (>95 %) y la lipólisis determina el suministro de ácidos grasos sistémicos; la insulina y las catecolaminas son los principales reguladores de este proceso. La insulina tiene un efecto antilipolítico y durante la

diabetes se pierde, incrementa la lipólisis e induce hipertrigliceridemia mediante la producción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), proceso que contribuye a la aterogénesis. (Coppack, Jensen y Miles, 1994, pp. 177-193).

Las cadenas largas de ácidos grasos en el plasma normalmente son reguladas por la insulina y durante la resistencia a la insulina, incrementan y producen toxicidad de células  $\beta$  (lipotoxicidad), que junto con la toxicidad de la glucosa dan el fenómeno diabético (glucolipotoxicidad) (Maedler, 2008, pp.408-420).

El tejido adiposo tiene la capacidad de liberar diversas proteínas diabetogénicas como el TNF, la IL-6, leptina, adipocitocinas, resistina y ácidos grasos libres, los cuales incrementan en la obesidad y pueden afectar a las células  $\beta$ , mientras que la adiponectina disminuye. La leptina es una hormona sintetizada en el tejido adiposo; actúa en el centro de saciedad localizado en el hipotálamo, donde disminuye el apetito al inducir la sensación de saciedad; durante la obesidad, el receptor para leptina en el sistema nervioso se desensibiliza, lo cual evita la saciedad y favorece el incremento gradual en la ingesta de alimento (Horvath y Varela, 2012).

Mientras tanto, en el páncreas, la leptina puede inducir apoptosis en las células  $\beta$ , porque inhibe la biosíntesis de insulina, incrementa reacciones inflamatorias y produce estrés oxidativo. Durante la diabetes autoinmune, la administración de leptina acelera el proceso diabetogénico, fenómeno que relaciona a la obesidad con la diabetes. La resistina produce aumento de citocinas como la IL-6 y TNF al activar el NF $\kappa$ B, mientras que la adiponectina es antiinflamatoria por supresión de fosforilación de I $\kappa$ B y, por lo tanto, inactivación de NF $\kappa$ B. En general, la pérdida en el equilibrio en la concentración local y sistémica de citocinas deletéreas y protectoras de la función de las células  $\beta$  culmina con la muerte celular (Wang, Guan y Yang, 2010, párr.2-5).

La lipólisis es el proceso en el que los triglicéridos son hidrolizados a mono y diglicéridos intermedios hasta ácidos grasos y glicerol mediante la activación de la lipasa sensible a hormona (HSL). La insulina estimula la lipasa de lipoproteína (LPL), que se encarga de fraccionar en partículas a las lipoproteínas unidas a triglicéridos para que, de esta manera, puedan incorporarse al tejido adiposo. (Coppack et al, 1994, pp. 177-193).

Algunos ácidos grasos libres y lipoproteínas son proapoptóticos para la célula  $\beta$ ; otros son protectores, de tal manera que la exposición prolongada, por ejemplo, de palmitato, parece ser

altamente tóxica, mientras que el ácido graso monosaturado, como el oleato, protege a la célula  $\beta$  de apoptosis inducida por el palmitato y la glucosa (Ehse et al., 2005, pp. S108-S113).

Las terapias modernas, que se encuentran en investigación, consideran el uso de células troncales o precursoras pancreáticas que puedan reprogramarse para la generación de células  $\beta$  funcionales con la capacidad de integrarse en el páncreas como una estrategia terapéutica en diabetes (Soejitno y Prayudi, 2011, pp.197-210).

## **Productos naturales**

### **Aspectos generales**

En los últimos 150 años, los químicos y los farmacólogos se han dedicado a aislar y determinar las acciones de los componentes activos de las plantas en un intento por producir nuevos fármacos. Los ejemplos incluyen fármacos como digoxina, reserpina y morfina, entre otros, obtenidos a partir de *Digitalis purpurea L.*, *Rauwolfia serpentina* y *Papaver somniferum L.*, respectivamente. Han sido de gran utilidad en la farmacología terapéutica y en el desarrollo de nuevos fármacos derivados (Burton Goldberg Group, 1994, pp.253-271).

Hasta fechas relativamente recientes, en las que los productos naturales, principalmente, aquellos de origen vegetal han sido el único recurso farmacológico y así mismo han demostrado ser un excelente recurso para la humanidad en su misión de combatir la enfermedad de manera exitosa (Navarro, 2014, p. 42).

Sin embargo, hasta avanzado el siglo XIX, época en la que la Química Orgánica añade los procesos de síntesis química, hubo un impacto inmediato en la utilización de los remedios que ofertaba la naturaleza, lo cual se traduce principalmente en un descenso notable en los esfuerzos dedicados a la investigación de productos naturales aplicados a la farmacología (Navarro, 2014, p. 42).

En la actualidad no existe duda sobre la importancia de las plantas y a pesar del desarrollo alcanzado por la síntesis química, estas constituyen un arsenal de sustancias biológicamente activas, lo cual ha sido respaldado por la enorme cantidad de alternativas terapéuticas obtenidas gracias a las derivaciones de fármacos a partir de plantas y extractos naturales que se han realizado a lo largo de la historia y que se continúan realizando hoy en día. (Bautista, Stubing y Vanaclocha, 1995, pp. 368-370)

Esta afirmación hace, en ocasiones, que los seguidores de esta práctica la recomienden como segura e inocua. Sin embargo, el uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de profundas investigaciones que no se limitan al campo de la experimentación, porque una vez que se comercializan deben seguir siendo observados mediante estudios de farmacovigilancia (Ávila et al., 2009, p. 3)

La medicina natural tiene mucho que ofrecer, sobre todo cuando se usa para inducir la curación de problemas crónicos continuos. A través de su utilización adecuada, se puede lograr una profunda transformación de la salud, con un menor peligro derivado de los efectos colaterales inherentes a los medicamentos farmacológicos. Sin embargo, la creencia generalizada de que este tipo de producto actúa lenta y levemente no es del todo cierto. Pueden presentarse efectos adversos si se eligen dosis inadecuadas o si se receta al paciente una planta medicinal equivocada (Ávila et al., 2009, p. 3).

La toxicidad de los fármacos convencionales derivados de plantas es muy compleja y, con frecuencia, valorada difícilmente por la cantidad de factores que intervienen en su producción, modo de aparición, duración y gravedad de las reacciones adversas. En efecto, estas pueden: Aparecer inmediatamente después de iniciado el tratamiento, a lo largo de la administración o después de suspendida la medicación, ser muy frecuentes o poco frecuentes, ser evitadas mediante un ajuste fino de la dosis o ser inseparables de la acción terapéutica, ser expresión de una dosis terapéutica o aparecer solo con dosis supraterapéuticas, por sobredosificación y ser triviales, graves o incluso mortales (Flores y de Cos, 1998, p.59).

Aun así, durante las últimas décadas la cantidad de personas que utilizan alternativas farmacológicas provenientes de productos naturales es bastante elevada. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó, en 1985, que aproximadamente el 65 % de la población del mundo confiaba predominantemente en medicamentos tradicionales derivados de plantas para la

atención primaria de salud, mientras que los productos vegetales también desempeñan un papel importante, pero más indirecto en los sistemas de salud de las poblaciones restantes que residen principalmente en países desarrollados (Farnsworth, Akerele, Bingel, Soejarto y Guo, 1985, pp. 965-981).

## **Proceso de elaboración de productos naturales**

De acuerdo con Bisset (1994), p. 130, la obtención de las drogas vegetales se realiza a partir de las plantas medicinales, proceso que consiste en una serie de pasos que se adaptan de acuerdo a las necesidades y características de la droga por elaborar. Entre ellas se encuentran:

### **Obtención y preparación de la muestra vegetal**

Las muestras de materia vegetal se recolectan en la época elegida, antes, durante o tras la floración. Se obtiene una muestra completa, de hojas, flores y tallos, y raíces en caso de que interese estudiar algún principio activo contenido en ellas. (Bisset, 1994, p. 130)

Por lo general, se dejan secar al aire hasta que haya ausencia de líquidos, y se separan hojas, tallos y flores, para pesar cada una de las fracciones vegetales que se necesiten. En caso de ser necesario, las plantas se pueden triturar con un molinillo, lo cual se puede realizar con una molienda pequeña (Bisset, 1994, p. 130).

### **Métodos de extracción**

Para llevar a cabo la extracción de aceites esenciales, existe una serie de métodos entre los cuales se encuentran principalmente la destilación la cual consiste en la separación de los componentes de una muestra en función de la diferencia de presión de vapor y punto de ebullición. En este caso, cuando se destila a presión atmosférica, se está aplicando una presión de 760mmHg. Un descenso de presión disminuye igualmente el punto de ebullición, mientras que un incremento de presión lo eleva (Bisset, 1994, p. 130).

Así mismo, se encuentra la hidrodifusión, proceso que se basa en la osmosis debido a que el vapor en la destilación no suele penetrar las membranas, solo una pequeña parte de los aceites está presente en la superficie de las plantas, disponible para la vaporización. El resto de los aceites llega a la superficie por difusión a través de los tejidos de la planta, ya sea libre o por ósmosis a través de membranas permeables a uno o todos los componentes (Bisset, 1994, p. 130).

En el caso de la preparación de extractos vegetales se indica que, entre los procesos extractivos de los diferentes componentes fitoquímico, aceites esenciales, entre otros, destacan las últimas tecnologías de extracción entre las que se encuentra la extracción en fluidos supercríticos. Sin embargo, todavía se utilizan otros procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación (Bisset, 1994, p. 130).

### **Liofilización de extractos naturales**

La liofilización corresponde a un proceso que consiste en desecar un producto previamente congelado. Se logra la sublimación del hielo bajo vacío. Por lo tanto, el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el solvente en su estado líquido. Por lo general, se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente redisuelta en agua (Alfaro, 1998, párr. 8-15).

Según Alfaro (1998), este proceso se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15 °C por debajo de su temperatura eutéctica para evitar la formación de coágulos de solvente, las etapas de la liofilización consisten en (párr. 8-15):

La etapa de congelación del producto es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración va a depender de factores como la cantidad, la concentración y la naturaleza propia del producto. En líneas generales se establece que una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación (Alfaro, 1998, párr. 8-15).

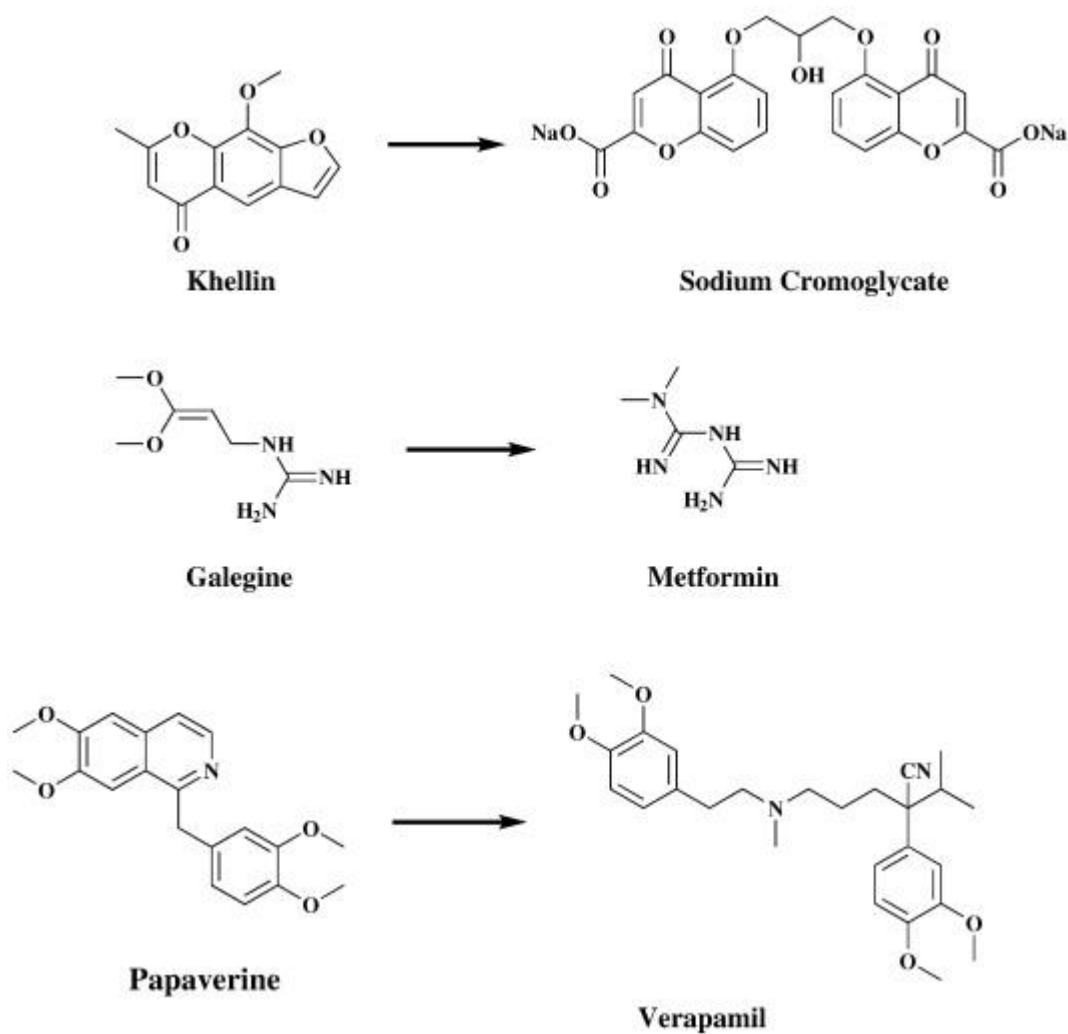
La fase de sublimación es la etapa en la que la mayor parte del solvente libre pasa a estado gaseoso. Los parámetros de temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente, pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos (Alfaro, 1998, párr. 8-15).

### **Principales compuestos farmacológicos naturales**

Los compuestos farmacológicos, que poseen los distintos componentes naturales de procedencia vegetal, constituyen una variabilidad inmensa de moléculas de las cuales se han derivado una gran cantidad de fármacos, en un estudio de compuestos puros derivados de plantas llevado a cabo en países que disponen de Centros Médicos Tradicionales-OMS, indicó que de 122 compuestos identificados, el 80 % era utilizado para el mismo propósito o cercanamente relacionado en la etnofarmacología y que estos compuestos eran derivados de solamente 94 especies de plantas (Farnsworth et al., 1985, pp. 965-981).

Como ejemplar de compuestos derivados de estas especies se encuentran, principalmente, moléculas tales como la Kelina, proveniente de *Amni visagna*, la cual se utilizó en el desarrollo de la Cromolina en la forma de Sodio Cromoglicato utilizado como broncodilatador; así mismo, la Galegina proveniente de *Galega officinalis*, la cual fue molécula modelo para la síntesis de la Metformina y otras biguanidas en el tratamiento de la Diabetes Mellitus y la Papaverina proveniente de *Papaver somniferum*, que constituyó una base en el desarrollo del Verapamilo como tratamiento de la hipertensión arterial (Fabricant y Farnsworth, 2001, pp 69-75).

Figura 1. Drogas basadas en moléculas de medicina tradicional.



Fuente: (Fabricant et al. 2001, pp. 69-75).

El principal autor responsable de la publicación en la cual se basó el siguiente apartado corresponde a Ikan, 1991, pp. 70-226, a menos de que se indique lo contrario en el párrafo correspondiente.

## **Acetogeninas y derivados fenólicos**

Los compuestos químicos correspondientes a acetogeninas difieren significativamente en sus propiedades químicas, pero son similares en la característica de que la mayoría poseen un anillo aromático que contiene sustituyentes de grupo funcional hidroxilo. Muchos de estos compuestos poseen gran diversidad de propiedades fisiológicas y la mayoría provienen de una biosíntesis a partir de varias moléculas de acetato.

Los fenoles simples son raros de encontrar y se encuentran en forma de heterósidos. Los ácidos fenólicos se pueden encontrar libres o unidos a azúcares (heterósidos). Pueden formar ésteres al unirse tanto con el ácido quínico como con otro ácido fenólico.

Entre este grupo, también, destacan principalmente los flavonoides, los cuales son compuestos de los cuales derivan grupos importantes tales como las flavononas y las flavonas; además, se encuentran los lípidos, los cuales se clasifican en tres grupos; grasas y aceites, ceras y fosfolípidos, y se pueden encontrar en todas las partes de tejido animal y vegetal; se facilita, así, en gran manera, su obtención a partir de extracciones naturales.

Así mismo, se hallan los taninos en este grupo los cuales poseen un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, poseen solubilidad en agua, con pesos moleculares entre 500-3000, que, aparte de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen la habilidad de reaccionar y precipitar con alcaloides, gelatinas y otras proteínas.

Del mismo modo se encuentran los lignanos, los cuales son muy abundantes en la naturaleza debido a su rol clave en la formación de un metabolito llamado lignina. Es un constituyente fundamental en la formación de tejidos vegetales rígidos como la madera; así mismo, se destacan las quinonas, las cuales forman un vasto grupo de pigmentos naturales, se encuentran principalmente en plantas. También, se han aislado quinonas provenientes de microorganismos, insectos y animales marinos, las quinonas forman un papel esencial en los procesos fisiológicos de oxidación y reducción, así como se ha probado que algunos poseen propiedades antibióticas.

Los floroglucinoles son compuestos que, igualmente, corresponden a esta categoría y de los cuales se puede decir que muchos productos naturales contienen el núcleo floroglucinol en su

estructura química, el cual puede ser formado por biosíntesis a partir de tres moléculas de acetato, las plantas que contienen compuestos químicos poseyendo floroglucinoles han sido utilizadas como drogas antihelmínticas y algunas también han demostrado tener propiedades insecticidas y bactericidas.

### **Saponinas**

Las saponinas son metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en las plantas superiores, en las que se presentan en forma de glucósidos. Sus soluciones acuosas al ser agitadas forman una espuma estable y abundante, hecho este que dio origen etimológicamente, al nombre genérico de estas sustancias provenientes del latín sapon (jabón). (Cuyos, Donald, Dueñas y Valencia, 2005, p. 33).

Desde el punto de vista químico, las saponinas al ser hidrolizadas rinden de 2 a 6 residuos de monosacáridos y una porción carbonada policíclica que es la aglicona del glicósido, a la cual se le denomina genéricamente sapogenina. Pueden tener un esqueleto tipo esteroidal (de base gonano) o de tipo triterpenoide (derivados del escualeno), las cuales dan lugar a las 2 grandes familias de estos metabolitos: las saponinas esteroidales y las saponinas triterpénicas. (Cuyos et al, 2005, p. 33).

La solubilidad en agua de estos compuestos está facilitada por su alto peso molecular y la presencia de los residuos de monosacáridos y de otros grupos polares en la aglicona. En ambas familias de saponinas el enlace glucosídico se establece a través del hidroxilo en posición 3 del anillo A de la aglicona. (Cuyos et al, 2005, p. 33).

### **Carbohidratos**

Los carbohidratos constituyen una vasta variedad de compuestos con inmensa importancia para los seres vivos debido a su papel en las funciones fisiológicas normales, además de que son los compuestos más abundantes en la composición química de animales y plantas. En

las plantas son los constituyentes de la membrana en la pared celular. Así mismo, estos se dividen en tres grupos, los monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Los glucósidos son componentes importantes dentro del grupo de carbohidratos. Una función que destaca de estos compuestos consiste en que poseen una agrupación llamada glucósidos cardiacos, entre los cuales se puede nombrar la oleandrina. Se utilizan en la salud como estimulantes del músculo cardiaco.

Entre los polisacáridos más importantes se encuentra la celulosa, la cual es el constituyente primordial de las partes fibrosas de las plantas, es utilizado en la industria para la elaboración de papel, seda, explosivos y plásticos. También, entre los polisacáridos destaca la heparina, la cual es un importante anticoagulante encontrado en el hígado, pulmones, timo, bazo y en la sangre; así mismo, la heparina es utilizada de manera exógena como tratamiento de afecciones cardiovasculares con el fin de evitar la formación de trombos venosos.

## **Terpenos**

Los terpenos componen un grupo numeroso de compuestos químicos que forman parte de procesos metabólicos primarios y secundarios de plantas y otros organismos eucariotas, tales como hongos y animales. Su nomenclatura se refleja en la cantidad de unidades de isopreno contenidas en la molécula, lo cual los cataloga como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos.

Los monoterpenos son conocidos por poseer propiedades antimicrobianas o tóxicos para algunas plantas, entre los cuales se destaca el limoneno y el citronelol; los sesquiterpenos constituyen el grupo más amplio de terpenoides, por lo que sus actividades farmacológicas son bastante amplias, entre ellas se encuentra que tienen capacidades antitumorales, antiinflamatorias, antipalúdicas, antimigrañosas y antimicrobianas; entre los principales se encuentra el eudesmol, azuleno,  $\beta$ -cadieno, farnesol y la artemisina.

Los diterpenos son compuestos que se encuentran principalmente en plantas superiores y hongos, la mayoría son compuestos cíclicos con pocas excepciones. Poseen ácidos resinicos de los cuales se obtienen derivados que han sido extensivamente estudiados por sus propiedades y

aplicaciones farmacéuticas, entre las cuales se destaca su uso como bases para materiales de microencapsulación; también, poseen compuestos como el taxol el cual ha sido empleado efectivamente como antitumoral y las podofilotoxinas que gozan de propiedades citotóxicas, antimicóticas y antivirales.

Los triterpenos son compuestos que forman parte de las saponinas, las cuales son glucósidos triterpénicos y abundan en el reino vegetal; se solubilizan en agua dando como resultado espumas estables. Las saponinas se caracterizan por sus propiedades expectorantes y diuréticas. Este grupo posee un compuesto destacable el cual es la digitoxina, la cual es un cadenolido derivado de esteroides con actividad cardíaca, por lo que también se cataloga como un glucósido cardíaco, empleado como estimulante del músculo cardíaco.

Por último, los tetraterpenos y los politerpenos comprenden un grupo bastante importante del cual se puede mencionar sustancias tan esenciales como los carotenoides, los cuales además de su función como pigmentos naturales poseen un papel importante en la depuración fisiológica de especies reactivas del oxígeno. Estos se pueden dividir en carotenos y sobresalen provitamínicos como el  $\beta$ -caroteno, y xantofilas, de las cuales se pueden mencionar provitaminas como la criptoxantina.

### **Compuestos nitrogenados**

Entre los principales compuestos nitrogenados, que se encuentran en la naturaleza, se hallan los alcaloides. La mayoría de estos son compuestos ópticamente activos y varían mucho en la forma en que se presentan en los organismos vegetales. Algunos se encuentran en combinación con azúcares como lo es la solanina; otros, aparecen como amidas ácidas (la piperina o los esterres; por ejemplo, en el caso de la cocaína y la atropina). Sin embargo, hay algunas excepciones como sucede en la ricina y la colchicina que comprenden compuestos neutros.

La mayoría de alcaloides son compuestos incoloros, cristalinos, algunos como la nicotina, cicutina e higrina son líquidos; otros, como la berberina, poseen coloración. Muchos alcaloides contienen propiedades terapéuticas entre las cuales se destacan la acción narcótica de la morfina;

la tranquilizante, de la reserpina; la antiespasmódica, de la atropina; la utilización de la cocaína como anestésico local y la estimulación nerviosa por parte de la estrocnina.

Otros grupos importantes de compuestos nitrogenados lo constituyen los aminoácidos que corresponden al principal componente de las proteínas. Estos compuestos poseen una variedad de actividades biológicas importantes entre las cuales se puede mencionar su capacidad de actuar como mensajeros químicos o neurotransmisores. Entre estos se pueden citar ciertos derivados del triptófano tales como la serotonina y la melatonina. También, poseen un papel crítico en la producción de moléculas complejas, que contienen nitrógeno, como lo son las bases nitrogenadas que componen los nucleótidos, los ácidos nucleicos y la clorofila; así como la función en ciertas rutas metabólicas esenciales como la arginina, la citrulina y la ornitina en el ciclo de la urea.

### **Productos naturales utilizados en Diabetes Mellitus**

Los medicamentos convencionales utilizados para el control de la diabetes, generalmente son costosos, y producen en algunos casos efectos secundarios adversos, es por esto que el uso de productos naturales ha tomado gran importancia a nivel mundial y se hace indispensable buscar alternativas de productos extraídos de plantas, que presenten actividad hipoglucemiante (Carmenza, 2012, p.10).

La primera planta medicinal descrita con un claro efecto antidiabético fue *Galega officinalis* (Fabaceae), que se ha prescrito desde la Edad Media para tratar la Diabetes Mellitus. Desde esta planta, también llamada calle de cabras o lila francesa, se aisló un derivado de guanidina, Galegina. Este compuesto, cuya estructura es bastante similar al fármaco antidiabético Metformina, es responsable de la disminución de la glucosa en sangre producida por el extracto vegetal (Bedekar, Shah y Koffas, 2010, pp. 21-73).

Muchos productos naturales y plantas, especialmente en países del tercer mundo, han sido usadas en la medicina tradicional con el fin de lograr un tratamiento de la diabetes efectivo y se ha logrado encontrar en muchas plantas tradicionales sustancias activas, que podrían ser una

f fuente potencial para la obtención de nuevos medicamentos para los trastornos diabéticos (Carmenza, 2012, p.10).

Entre los productos naturales utilizados tradicionalmente para tratar la Diabetes se encuentran, principalmente, en alimentos: cereales y legumbres, los productos de trigo, los frijoles mungo y el haba de soja. En los productos frondosos existen habichuelas, fenogreco, hojas de laurel, hojas de estevia, planta insulina, hojas de curry y alcachofa. Entre las semillas y las especias utilizadas se hallan canela, semillas de comino y cebolla y. Entre las bebidas se encuentra principalmente el té verde. Sin embargo, esto es solo una diminuta fracción de la inmensa cantidad de alimentos y productos naturales con capacidades antidiabéticas, de los cuales aún hay muchos por estudiar (Sukumar, Manickavasagan y Essa, 2012, pp. 45-70).

### **Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*)**

#### **Aspectos generales**

El siguiente apartado se basó en la publicación de Piña-Damoulín, Quiroz, Ochoa y Magaña-Lemus, 2010, pp. 36-37.

El jackfruit (*Moraceae*), nativa de la India, poco difundida en otros países, también se conoce como Yaca, Jaca o Pan de pobre. Es un árbol, siempre verde, considerado entre los de mayor producción de las especies frutales y amplio uso comestible. Se puede consumir cocido o crudo, en estado inmaduro o maduro, respectivamente. Sus frutos llegan a tener un peso entre 2 y 3 kg.

El árbol posee hojas de color verde oscuro brillante, dispuestas de forma alternada, largas, de forma ovalada y lobulada en ramas adultas y jóvenes respectivamente. Corresponde a un árbol monoico cuyas flores emergen del tronco y de las ramas mayores. Todos los componentes del árbol contienen abundante látex, blanco y pegajoso.

Los frutos son compuestos o agregados, de pequeños a muy grandes y en ellos puede distinguirse tres regiones primarias las cuales son: el eje o el centro del fruto, con numerosas

células laticíferas y no comestible; el perianto, que forma la mayor parte del fruto y a la vez está conformada por la región comestible fresca una región media fusionada que forma el anillo del sincarpo y la región externa cornea no comestible de coloración verde y cuando madura se torna amarillenta.

La tercera región corresponde al fruto verdadero, que es desarrollado desde el carpelo del ovario y está rodeado por el perianto fresco. Las semillas miden de 2 a 4 cm de largo y de 1.25 a 2 cm de ancho de color blanco y sin ondulaciones encontrándose entre un número de 100 y 500 en un solo fruto.

El jackfruit se considera de tipo intermedio entre climatérico y no climatérico; aun así, puede ser consumido como vegetal en estado inmaduro y como fruta al madurar; el fruto en forma maciza suele ser asado y consumido sin distinción de pulpa y semillas. Su pulpa madura sirve como base para bebidas tradicionales y sus semillas usualmente son cocidas en agua y se logra un alimento semejante a la papa.

Aun habiendo poca información sobre este fruto en la mayoría de países y los cambios que sufre durante su maduración, este ofrece una alternativa de alimentación por su versatilidad de consumo y alto contenido de energía. Aporta al humano alrededor de 540 UI de vitamina A y minerales esenciales como fósforo, hierro y calcio y las semillas además de ser ricas en almidón tienen un alto contenido de proteínas y tiaminas.

### **Uso del Jackfruit en la medicina tradicional**

Este apartado se basó en la publicación de Haq, 2006, pp 22-24, a menos de que se indique lo contrario en el párrafo correspondiente.

Aunque se han mencionado el uso de varios componentes del árbol de Jackfruit con varios fines en la medicina tradicional (Fernando et al, 1991, citado por Haq, 2006), su uso en esta no ha sido del todo substanciado o evidenciado de manera exacta para cada uno, sin embargo, han existido varias guías de áreas tropicales donde su uso se ha llevado por muchos años donde se encuentran recomendaciones de un rango de usos medicinales.

Aun así, la información actual de su uso como tratamiento medicinal se respalda bastante en algunos de los cribados fitoquímicos llevados a cabo y la pequeña cantidad de pruebas clínicas que se han llevado a cabo con el fin de probar su eficacia como alternativa farmacológica segura. (Tirkey et al, 2001, citado por Haq, 2006)

Se ha descubierto que los extractos de las hojas promueven la tolerancia a la glucosa al ser evaluado en diabéticos, el extracto acuoso de hojas contiene flavonoides, antocianinas, taninos y proantocianidinas, los cuales incrementan la tolerancia de glucosa en personas diabéticas. Khan et al. (2003), citado por Haq (2006); reportó que la fracción de butanol de un extracto a partir de la corteza de raíz del árbol y sus frutos eran sustancias activas capaces de actuar contra un rango de bacterias y protozoos.

El duramen del árbol contiene dos compuestos activos, los cuales corresponden al grupo de isoprenil-flavonas, que han demostrado ser dos compuestos potentes en la prevención de caries dentales. (Sato et al., 1996, citado por Haq, 2006)

Las semillas del árbol poseen dos lectinas importantes, la jacalina y la artocarpina; estas han llamado bastante la atención debido a su diversa actividad biológica y han sido reconocidas como lectinas específicas tipo Gal beta 1-3GalNAc. La jacalina ha probado inhibir el virus del herpes simple tipo 2 y ha comprobado ser de gran utilidad en la evaluación del estado inmune del paciente infectado con Virus de Inmunodeficiencia Humano tipo 1 (HIV1).

La abundante fuente de materiales para la producción de jacalina. Su facilidad de purificación y su estabilidad la han convertido en una atractiva lectina, las cuales son utilizadas para el aislamiento de glicoproteínas del plasma humano, investigación de Ig-A nefropatías, el análisis de glicoproteínas O-enlazadas y la detección de tumores (Kabir, 1998, citado por Haq, 2006).

## **Modelos experimentales con animales de laboratorio**

### **Aspectos generales**

La utilización de animales de laboratorio es una práctica que se ha llevado a cabo durante mucho tiempo y ha ido en paralelo al desarrollo de la biomedicina. “Se define como animal de laboratorio a todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación y otros fines científicos” (Guillén, 2012, pp. 311-321). Su utilización se basa, principalmente, en la analogía fisiológica con la especie humana. Entre los animales utilizados en las investigaciones experimentales se encuentran los primates no humanos, prosimios, gatos, perros, reptiles, anfibios, ovejas, cerdos, cabras, peces, insectos y roedores. Estos últimos son los de uso más frecuente y, dentro de ellos, las ratas, ratones y conejos (Romero-Fernández et al., 2016, pp. 288-292)

Aunque muchos laboratorios se limitan a aplicar el principio de las tres erres (3R) planteado por Russell y Burch (Russel y Burch, 1959), el número de animales utilizados en investigación ha aumentado, esta realidad es más acentuada en América Latina. Sin embargo, ya sea por razones éticas, por la necesidad de personal calificado, por los elevados costos de producción y mantenimiento, o por los procedimientos experimentales, se observa un incremento en la utilización de métodos alternativos a la utilización de animales en laboratorios (Balls, 1994, pp. 193-211).

El principio fundamental para el uso de animales en las experimentaciones biomédicas es conocer los detalles biológicos (anatomía, fisiología y etología) y de mantenimiento (alojamiento, alimentación y manejo) de la especie utilizada. Por estas razones, detalles sobre la biología de los animales utilizados más frecuentemente en experimentación han sido descritos ampliamente en la literatura científica (Martín, Orellana y Tur, 2009).

### **Aspectos bioéticos**

Cada país debe legislar el correcto cuidado y uso de los animales de experimentación y asegurar que gocen del cuidado respectivo alineado a los aspectos éticos que se deben tener en cuenta; tomando en cuenta los planteamientos de las 3R. (Fentener et al, 2015, pp. 267-283).

Para garantizar que la reglamentación sea la adecuada no solo se deben tomar en cuenta las normas de la legislación nacional, sino también las recomendaciones de organismos y

asociaciones internacionales dedicadas a la ciencia de animales de laboratorio. (Romero-Fernández et al, 2016, pp. 288-292).

El uso de animales en experimentación se cataloga como ético cuando no hay otra alternativa y su propósito se logra justificar como la obtención de un bien superior. Cada institución donde se realice este tipo de procedimientos debe contar con un comité institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUA), cuyo reglamento estará regido por la legislación nacional; si fuera el caso de que no la hubiese, se regirá por normativas internacionales. Para verificar que la investigación con animales se justifique, por los beneficios que produce, el CICUA debe revisar y aprobar todos los proyectos de investigación que impliquen experimentación animal. (Romero-Fernández et al., 2016, pp. 288-292).

Como se mencionó anteriormente, los parámetros que se incluyen en las buenas prácticas bioéticas son principalmente el cumplimiento de las 3R, las cuales indican los siguientes apartados: reemplazar de forma parcial o total el uso de animales; reducir el número de animales por experimento, y refinar los procedimientos durante la cría, la experimentación y la eutanasia (Hendriksen, 2013, pp. 313-322).

### **Infraestructura y ambiente animal**

El lugar donde se mantienen los animales de experimentación se denomina bioterio, animalario o estabulario, y se define como “La instalación dedicada a la crianza, mantenimiento, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (Kollmus et al, 2012, pp.418-435).

El bioterio no solo debe cubrir las necesidades de los animales, sino que también debe asegurar las necesidades del personal encargado. Para esto, su infraestructura debe incluir diferentes áreas que se catalogan en dos zonas: zona sucia (área administrativa, vestuario, almacenaje, eliminación de desechos e incineración) y zona limpia (área de recepción de animales, cuarentena, salas de alojamiento y crianza, laboratorios, quirófano y áreas de limpieza y esterilización). (Romero-Fernández et al, 2016, pp. 288-292).

Para evitar contaminaciones entre las áreas y hacia los puntos de trabajo, las zonas deben de estar totalmente separadas por barreras físicas, y el flujo de trabajo se realiza desde la zona

limpia a la sucia. Así mismo, en todas las áreas se tienen que seguir estrictas condiciones de higiene, limpieza, desinfección y estar perfectamente señalizadas. (Kollmus et al, 2012, pp.418-435).

El recinto primario (usualmente una caja, jaula o establo) provee los límites del ambiente inmediato del animal. Los recintos primarios aceptables permiten que el animal cubra sus necesidades fisiológicas y de conducta, así como orinar y defecar, mantenimiento de la temperatura corporal, ajustes a postura y movimiento normal y, cuando sea indicado, reproducción. (Granados, 2017, pp. 7-8).

Permiten interacciones sociales específicas y desarrollo de jerarquías dentro y entre recintos y hacen posible que los animales se mantengan limpios y secos (consistente con los requerimientos de las especies). Deben poseer adecuada ventilación y un correcto acceso a comida y agua. Proveen un ambiente seguro que impide el escape o atoramiento accidental de animales o de sus apéndices entre superficies opuestas o por aberturas estructurales. Están libres de bordes cortantes o proyecciones que puedan dañar a los animales. Se debe tener un modelo de infraestructura que permita la observación del animal sin disturbios. (Granados, 2017, pp. 7-8).

### **Monitoreo periódico**

El personal capacitado ha de evaluar el estado de salud de los animales de forma rutinaria, no solo por obligación legal y moral, sino también para garantizar resultados fiables y repetibles. Es necesario que esta evaluación sea más amplia y frecuente en procedimientos invasivos, quirúrgicos y a la llegada del animal al bioterio. (Romero-Fernández et al, 2016, pp. 288-292).

Se debe realizar monitoreo y controles de patógenos específicos a los que se encuentre en riesgo el animal en experimentación, entre los microorganismos encargados de producir infecciones bacterianas se encuentran: *Helicobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Leptospira spp.*, *Listeria spp.* y *Streptobacillus moniliformis*. (Coelho y García, 2015, p. 56).

También se corre el riesgo de contagios micóticos producidos por algunos hongos, tales como especies de los géneros *Microsporium*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* que causan

dermatofitosis. (Connole et al, 200, pp. 59-65). Y varios parásitos, tales como *Leishmania*, *Tripanosoma*, *Toxoplasma*, *Fasciola* y tremátodos del género *Schistosoma*. (Coelho y García, 2015, p. 56).

Es primordial en cada laboratorio de investigación evitar las enfermedades que se pueden transmitir tanto de los animales vertebrados al hombre como las que se transmiten del hombre a estos animales, lo cual se logra manteniendo el buen estado de salud y trabajando en zonas de bioseguridad con las precauciones requeridas. (Hankenson, Johnston, Weigler y Di Giacomo, 2003, pp. 579-601).

### **Selección de modelos experimentales animales**

A pesar del elevado costo y la dificultad que representa el desarrollo de un modelo animal, su uso nos permite entender y analizar la fisiopatología de una enfermedad, ya sea inducida o espontánea, y el comportamiento animal al ser sometido a esta. Debido a las posibles variaciones en las respuestas fisiológicas, es necesario tener un amplio conocimiento de la fisiología y anatomía comparada del modelo por emplear (Romero-Fernández et al., 2016, pp. 288-292).

El desarrollo y la aplicación de nuevos modelos animales para el estudio de la biología estructural y funcional está en constante crecimiento. En general, estos modelos tienen el propósito de comprender mecanismos biológicos (exploratorios), determinar una función biológica anormal (mecanísticos) o valorar y cuantificar el efecto de un tratamiento específico (predictivos) (Romero-Fernández et al., 2016, pp. 288-292).

Según (Davidson, Lindsey y Davis, 1987, pp. 551-555) “Los modelos animales son clasificados en modelos inducidos (experimentales), generados por modificación genética (transgénicos), espontáneos (genéticos), negativos y huérfanos.”. Los tres primeros son los más frecuentes; sin embargo, hasta la fecha solo unos pocos modelos inducidos reproducen fielmente la etiología y fisiopatología de una enfermedad. (Kawaharada, Kawamata y Ochiya, 2015, pp. 1054-1063).

La selección de un adecuado modelo experimental no solo reduce el número de animales planteado en el principio de las 3R, sino que también garantiza un afinamiento de los procedimientos y la obtención de resultados fiables y repetibles. Se debe estandarizar el inóculo, dosis, vía y frecuencia de la inoculación, definir el punto final de experimentación, analgesia y punto final experimental humanitario. (Romero-Fernández et al, 2016, pp. 288-292).

Para evitar errores sistemáticos o sesgos, los animales deben recibir un trato igualitario durante todo el procedimiento a menos que el mismo indique lo contrario y el estudio se debe realizar de forma aleatoria y a ciegas; además, se han de incluir los correspondientes controles para un correcto análisis de resultados. (Hernández, Ramírez y Villagrán, 2012, pp. 59-70).

## **Eutanasia**

La eutanasia es el procedimiento de matar animales utilizando métodos que induzcan una rápida inconsciencia y muerte sin dolor ni sufrimiento en la medida de lo posible. Para evaluar el método apropiado se debe tomar en cuenta la habilidad de inducir inconsciencia, limitaciones de especie y edad, compatibilidad con los objetivos de la investigación y la seguridad y efecto emocional en el personal que lleva a cabo el procedimiento. La eutanasia puede ser necesaria al final de un protocolo o como un medio para aliviar dolor o estrés que no se pueda aliviar por analgésicos, sedantes u otros tratamientos. (Granados, 2017, p. 18).

Siempre debe realizarse sin que haya otros animales presentes, empleando un método adecuado a la especie y los objetivos del protocolo. Generalmente, son preferibles los agentes tanto inhalantes (CO<sub>2</sub>, halotano) como no inhalantes (barbitúricos), antes que los métodos físicos (dislocación cervical, decapitación). (Granados, 2017, p. 18).

### **CAPÍTULO III. MARCO METODOLOGICO**

En el siguiente apartado se pretende evidenciar la metodología experimental que se llevará a cabo para evaluar de manera óptima los objetivos propuestos en esta investigación. Se establece un diseño experimental adecuado en el cual se manejen muestras adecuadas para la evaluación de variables enfocadas al estudio, así como la instrumentación para llevar a cabo el proceso y una recolección y análisis de datos adaptado a esta investigación. También, se incluirá el cronograma de actividades con el fin de mantener un orden de procedimientos experimentales.

#### **Enfoque y diseño**

Esta investigación se plantea como un estudio en el cual, debido a su diseño, estructura, variables, técnicas y demás aspectos, posee un enfoque de tipo cuantitativo experimental con alcance descriptivo y exploratorio. Según Hernández, Fernández y Baptista (2014):

Los estudios exploratorios sirven para preparar el terreno y, por lo común, anteceden a investigaciones con alcances descriptivos, correlacionales o explicativos. Por lo general, los estudios descriptivos son la base de las investigaciones correlacionales, las cuales a su vez proporcionan información para llevar a cabo estudios explicativos que generan un sentido de entendimiento y están muy estructurados. (p.90)

Lo anteriormente citado justifica la principal perspectiva de esta investigación como aprovisionamiento para futuros estudios experimentales basados en las variables a caracterizar. Así mismo, Hernández et al. (2014) también describen que:

Con los estudios descriptivos se busca especificar las propiedades, las características y los perfiles de personas, grupos, comunidades, procesos, objetos o cualquier otro fenómeno que se someta a un análisis. Es decir, únicamente pretenden medir o recoger información de manera independiente o conjunta sobre los conceptos o las variables a las que se refieren, esto es, su objetivo no es indicar cómo se relacionan éstas. (p.93)

De acuerdo con esta descripción, se orienta esta investigación con un alcance descriptivo con el fin de especificar parámetros esenciales según la literatura revisada y someterlos a un análisis que resulte en una orientación adecuada para el uso del producto natural en investigación.

### **Instrumentos**

Para la Fase I se requerirá de la utilización de los instrumentos necesarios para la recolección y almacenamiento adecuado del material vegetal. Así mismo, se requerirá la utilización de balones de vidrio, condensadores, extractores Soxhlet y equipo de calentamiento, así como los reactivos solventes e identificadores para la extracción de las fracciones del producto vegetal.

Para la Fase II se precisará del equipo necesario para la correcta manipulación de los animales de prueba. Igualmente, será imprescindible proveer al animal con el ambiente adecuado y sus instrumentos de necesidades cotidianas, así como bebederos e instrumentos de actividad física. También, se necesitarán sondas de punta redondeada para administrar el producto natural a los animales y el equipo de lancetas y tiras obligatorias para la utilización de un glucómetro.

Tabla 1. Reactivos utilizados para cada fase experimental

Fase	Reactivos
Fase 1	Etanol 80 % Agua destilada Hexano Tricloruro férrico Anhídrido acético Ácido sulfúrico concentrado Dicromato de potasio Acetato de plomo Cloroformo Magnesio en limaduras

	Ácido clorhídrico concentrado
Fase 2	Glucosa 0.2mg/ml Glibenclamida 0.5 mg/ml Extracto liofilizado reconstituido

### Objetos de investigación

El objeto de investigación corresponde al producto natural elaborado a partir del extracto de hojas maduras de *Artocarpus heterophyllus*, y su capacidad hipoglucemiante al ser evaluado en ratas hiperglucemicas; llevado a cabo en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

#### Fase I. Elaboración del producto natural

##### Obtención del extracto líquido

El extracto se obtuvo a partir de la extracción de hojas maduras de Jackfruit, provenientes de la provincia de San José, Costa Rica. Las hojas fueron autenticadas como hojas de *Artocarpus heterophyllus* por el botánico Armando Estrada en el Herbario Nacional del Museo Nacional de Costa Rica, en el mes de octubre del 2017.

Se utilizaron 100 g de hojas maduras frescas de *A. heterophyllus* para cada procedimiento, a los 3 días de haber sido recolectadas, las hojas se sometieron a un proceso de limpieza en el cual se aseguró la eliminación de contaminantes exteriores, una vez limpias se cortaron en trozos pequeños, se colocaron en un horno marca Digisistem Labs, DN-500 a 40°C durante 30 minutos con el fin de secar las hojas, una vez eliminadas las impurezas y el agua se procedió a pesar las hojas.

Se realizaron tres tipos diferentes de extracciones con el fin de observar con cual procedimiento se obtuvo un extracto con mayor presencia de compuestos farmacológicos naturales. Primeramente, se llevó a cabo una extracción utilizando como disolvente 300 ml de agua destilada por el método Soxhlet en el cual se dejó el equipo en funcionamiento durante 4 horas, se recolectó el extracto y se concentró.

Así mismo, se ejecutó otra extracción utilizando 300 ml de etanol al 80 % como disolvente por el método Soxhlet, se dejó el equipo en funcionamiento durante 4 horas, se recolectó el extracto y se concentró.

Por último, se elaboró una extracción en la cual, inicialmente, se buscó eliminar los pigmentos de tipo clorofila y carotenoides de las hojas utilizando un solvente indicado en el procedimiento descrito por Lallana, M. y Lallana V. (2003) para el aislamiento de pigmentos en hojas de plantas con el fin de apreciar de manera óptima las coloraciones de las pruebas reactivas de identificación llevadas a cabo una vez obtenido el extracto. Para esto, primero, se implementó el método Soxhlet al utilizar 250ml de hexano y se dejó funcionar el equipo durante dos horas, posteriormente a esto se extrajo el material vegetal del recipiente Soxhlet y se secó en un horno marca Digisistem Labs, DN-500 a 40°C durante 30 minutos. Una vez secado el material vegetal, se procedió a extraer mediante el método Soxhlet utilizando 300ml de etanol al 80 % durante 4 horas. Se recolectó el extracto y se concentró.

## **Proceso de liofilización**

Se realizó el proceso de liofilizado del extracto etanólico. Se obtuvo a partir de las hojas de *A. heterophyllus*, en el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica con la colaboración de la M.Sc. María Herrera y el Dr. Alberto Alape Girón.

Para esto primeramente se colocó el extracto en un rotavapor y se comenzó a evaporar el solvente etanol con el fin de concentrar el extracto (Figura 9), una vez evaporado la mayor parte del etanol se colocó el extracto en una cámara de nitrógeno líquido (Figura 10) durante 24 horas, se prefirió utilizar la cámara de nitrógeno líquido en lugar de un congelador industrial debido a que estas alcanzan temperaturas de hasta -200 °C, en comparación a los congeladores disponibles en la planta que alcanzan hasta -80 °C, siendo la opción de la cámara de nitrógeno más adecuada debido a que el punto de congelación del etanol es cercano a los -114 °C.

Una vez congelada la muestra se colocó en un liofilizador marca LABCONCO<sup>®</sup>, (Figura 11) durante 48 horas a una presión de 3 mili bares, la muestra se sostuvo con algodón con el fin de evitar un mal posicionamiento del recipiente en el momento que el equipo realice la succión del recipiente. Transcurridas las 48 h se obtuvo un extracto seco el cual se pesó con el fin de cuantificar la cantidad de sólidos presente en el extracto líquido.

## **Identificación de compuestos naturales farmacológicos**

Se ejecutó una serie de pruebas reactivas para identificar la presencia de compuestos orgánicos responsables de la acción terapéutica buscada, así como la identificación por medio de espectro infrarrojo correspondiente a la molécula  $\beta$ -sitoesterol. Cada prueba se realizó, por igual, a los tres tipos de extractos obtenidos con el fin de observar la capacidad de extraer metabolitos secundarios de cada solvente utilizado.

### **Identificación de taninos**

Se llevó a cabo la prueba del Dicromato de potasio en la cual se adicionan 2ml de Dicromato de Potasio a 2 ml del Extracto disuelto, una coloración parda amarillenta corresponde a la presencia positiva de Taninos.

Igualmente se realizó la prueba con Acetato de plomo 5% en la cual se adicionan 2 ml del reactivo en solución a 2 ml del extracto disuelto, la presencia de un precipitado corresponde a una prueba positiva de Taninos.

Así mismo, se realizó la prueba de diferenciación de taninos gálicos o condensados, para esta prueba se utilizó tricloruro férrico; se adicionó 1ml de solución de tricloruro férrico a 2ml del extracto disuelto. la aparición de una coloración azul oscuro determina la presencia de taninos gálicos y la aparición de una coloración verde o marrón corresponde a la presencia de taninos condensados.

### **Identificación de saponinas y esteroides**

Primeramente, se realizó la prueba de Liebermann-Burchard para la presencia de compuestos saponinas en la cual se tomaron 2 ml del extracto disuelto, se adicionaron 2ml de Anhídrido acético, 2 ml de Cloroformo, se enfría a temperaturas cercanas a 0 °C y posteriormente se adicionan 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de una coloración verdosa corresponde a la presencia de saponinas esteroidales.

Así mismo se realizó la prueba de Salkowski en la cual se adicionaron 2ml de Cloroformo, 2ml de Ácido sulfúrico a 2 ml del Extracto disuelto, una coloración anaranjada corresponde a la presencia positiva de saponinas y esteroides.

### **Identificación de flavonoides**

Se llevó a cabo la prueba de Shinoda, en la cual se trató el extracto disuelto con limaduras de magnesio, se calentó a temperaturas cercanas a 60 °C y se adicionó HCl concentrado

cuidadosamente por las paredes del tubo de ensayo, la aparición de coloraciones entre naranja-rojo, rosa-azul o violeta corresponde a la presencia positiva de flavonoides.

Así mismo se realizó la prueba de Salkowski en la cual se adicionaron 2 ml de Cloroformo, 2ml de Ácido sulfúrico a 2ml del Extracto disuelto, para flavonas y flavonoles se reporta la aparición de una coloración amarillenta.

A partir de este punto, se utilizó solamente el extracto etanólico para las siguientes pruebas incluyendo el ensayo animal, debido a los resultados obtenidos en la identificación de metabolitos secundarios capaces de realizar actividad biológica.

### **Identificación de $\beta$ -sitoesterol por espectroscopia de absorción infrarrojo**

Para esta prueba se colocó una muestra de 3ml en un equipo SpeedVec marca Savant<sup>TM</sup> SPD 1010 (Figura 25), facilitado por el Instituto Clodomiro Picado y asesorado por la M.Sc. María Herrera, el cual funciona como una centrifuga al vacío con alta capacidad de extraer solventes volátiles y así obtener extractos secos.

Una vez obtenida la muestra del extracto seco se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo marca Agilent Technologies, Carry 630-FTIR, en el cual se realizaron los procedimientos de limpieza del equipo indicados en el *software* y, posteriormente, se colocó la muestra en el equipo y se observó el espectro arrojado por el *software*, se compararon los picos significativos con valores de referencia obtenidos a partir de estudios de aislamiento y análisis del 5-stigmasten-3beta-ol ( $\beta$ -sitoesterol).

## **Fase II. Diseño experimental animal**

### **Prueba sobrecarga de glucosa**

Se utilizarán grupos de 6 ratas machos (con un peso entre 180 y 220 g), *Rattus navegicus*, cepa Wistar (HsdBrHan: WIST), obtenidos de la Unidad de Producción Animal de la

Universidad de Costa Rica, coordinada por el Laboratorio de Ensayos Biológicos. El uso de los animales utilizados en esta tesis fue aprobado por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica. Todos los animales fueron mantenidos en el cubículo de experimentación del Laboratorio de Ensayos Biológicos, bajo condiciones estándares según la cepa de luz (12/12), temperatura 20-25 °C, humedad relativa (30-80%) y siguiendo los procedimientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio del LEBi.

Para la determinación del efecto hipoglicemiante se utiliza el modelo de sobrecarga de glucosa. De acuerdo a este método, a los animales se les determina la glicemia después de un ayuno de 12 horas (tiempo cero), en este momento se les administra el extracto por vía oral y 30 minutos después se administra 3 g/kg de almidón VO. Los niveles de glicemia son medidos cada 30 minutos durante dos horas. Se trabaja con 6 animales por grupo. El extracto de *Artocarpus heterophyllus* se evaluará en tres dosis 250, 500 y 1000 mg/kg VO. Se utilizará glibenclamida 5 mg/kg VO como control. La sangre será obtenida de la vena de la cola y los niveles de glicemia se determinarán con un glucómetro marca Roche Accu-Chek® Performa, validado por el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica. Tomando dos mediciones en cada tiempo y se promedian.

### **Procedimiento**

Los animales permanecieron en un ayuno de 12 horas inicialmente, una vez transcurrido el ayuno se procedió a pesar cada animal individualmente. Posteriormente, se tomó el valor de glicemia a cada animal en ayunas con la ayuda del glucómetro, el cual corresponde al valor de glicemia en tiempo cero. Se realizó la toma de sangre por punción de la vena de la cola con aguja calibre 20 G, una vez que ha sido limpiada con gasa humedecida caliente con la finalidad de favorecer la vasodilatación. Inmediatamente, se les administran los tratamientos a los animales.

Tabla 2. Tratamiento administrado a cada grupo animal

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>
Grupo 1	Extracto 1000 mg/kg VO
Grupo 2	Extracto 500 mg/kg VO
Grupo 3	Extracto 250 mg/kg VO
Grupo 4	Agua VO (1 ml)
Grupo 5	Glibenclamida 5 mg/kg VO

Una vez administrados los tratamientos correspondientes se esperó 30 minutos y se administró el almidón a una dosis de 3g/kg VO, 30 minutos después de administrada la carga de almidón se midieron los niveles de glicemia cada 30 minutos durante dos horas.

### **Análisis de datos**

Con los valores de glicemia en cada tiempo y para cada animal se calculó el porcentaje de aumento de glicemia con respecto al valor de glicemia en ayuno. Los resultados fueron expresados como porcentajes de aumento en comparación al valor basal de glicemia. La significancia de las diferencias entre las medias de los grupos experimentales se determinó por medio de análisis de varianza de dos vías de medias repetidas con la prueba de Bonferroni como estudio post-hoc. Valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos.

El análisis de comportamiento y los rasgos de toxicidad se llevaron a cabo utilizando la escala de parámetros de toxicidad de tratamientos vía oral (Figura 2), del Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica, la cual está basada en las OECD Test Guidelines.

Figura 2. Parámetros de evaluación de toxicidad oral LEBi-UCR

Parámetro	Descripción	Parámetro	Descripción
Apariencia pelo	Textura, color, caída.	Piloerección	Pelaje erizo.
Apariencia piel	Enrojecimiento, sequedad, exudación.	Salivación	Exceso de secreción bucal.
Ojos y membranas mucosas	Enrojecimiento, sequedad, secreción anormal.	Actividad motora	Aumento o disminución de la actividad normal, refleja o no.
Ataxia	Pérdida del equilibrio, caminata errática.	Tremores y convulsiones	Contracción muscular anormal espontánea. Contracción o estiramiento muscular descontrolado.
Parálisis	Pérdida de respuesta en cualquier extremidad.	Respiración	Aumento o disminución en la frecuencia respiratoria.
Reacción a estímulos	Respuesta al tacto o ruido.	Deshidratación	Prueba de Robinou: pellizco de la piel, sin el retorno a su posición normal.
Vasoconstricción periférica	Palidez.	Diarrea	Heces blandas o deposición acuosa
Vasodilatación periférica	Enrojecimiento.	Peso	Pérdida de peso.

\*Para mayor detalle especifique cualquier alteración en la sección de Observaciones.

#### ESCALA DE VALORES PARA PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

Grado	Descripción
0	no hay alteración
1	alteración leve que no afecta los otros parámetros
2	alteración moderada que no afecta el comportamiento general del animal
3	alteración severa que afecta el comportamiento general del animal

Fuente: LEBi-UCR

## Variables

Tabla 3. Variables por estudiar

Variable	Definición conceptual	Definición operacional e instrumental
Presencia de metabolitos secundarios (Fase1)	Compuestos que presentan propiedades biológicas, desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos.	Caracterización mediante pruebas reactivas para cada grupo de compuestos que revelen mediante cambios de coloración la presencia de metabolitos secundarios. Comparación de espectros infrarrojo patrón y espectro obtenido de la muestra mediante la utilización de un espectrofotómetro IR.

Glicemia (Fase 2)	Cantidad de glucosa en sangre en un momento específico.	Medida tomando muestras sanguíneas de la muestra y midiendo los niveles de glucosa mediante un glucómetro.
Comportamiento físico-social (Fase 2)	Estado de ánimo y bienestar corporal, reflejado en actividades físicas, alimentación y respuesta a estímulos.	Analizado mediante observación de parámetros establecidos de toxicidad, así como la manipulación física con el fin de observar respuesta a estímulos.

### Cronograma

Tabla 4. Cronograma

Evento	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Diciembre
Avance 1	X				
Avance 2		X			
Fase 1 Avance 3					
Fase 2 Avance 3			X		
Fase 3 Avance 3			X		
Avance 4				X	

Avance 5				X	
Defensa de tesis					X

## **CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

En el siguiente apartado se muestran, de forma detallada, los resultados obtenidos durante la realización de la metodología descrita. Se abarca cada uno de los procedimientos de obtención del extracto y la realización del ensayo de modelo animal seleccionado, así como las observaciones y datos obtenidos llanamente. Los datos se obtuvieron durante la realización de cada fase metodológica en el Laboratorio de la Escuela de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas y en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica.

### **Obtención e identificación de los extractos naturales**

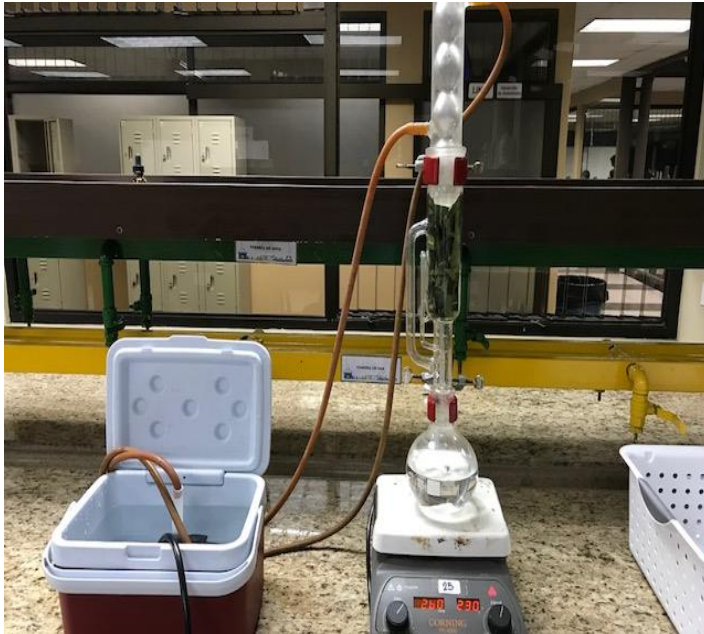
Se muestran las pruebas realizadas una vez obtenidos los extractos acuosos, etanólico y etanólico con baja concentración de pigmentos para la caracterización de presencia de metabolitos secundarios, así como la observación de las coloraciones de los extractos sin ningún cambio como referencia de coloración original. Se muestra la identificación por infrarrojo del  $\beta$ -sitosterol presente en el extracto final.

### **Obtención de extractos**

#### **Extracto acuoso**

Una vez realizado el procedimiento con agua como solvente, se obtuvo un extracto de coloración blanca-amarillenta, el cual no presentó precipitados ni formación de brumos al ser concentrado y almacenado a 4°C en un recipiente ámbar de vidrio con tapa.

Figura 3. Equipo utilizado extracción acuosa



Fuente: propia

Figura 4. Equipo utilizado en filtración y concentrado del extracto acuoso

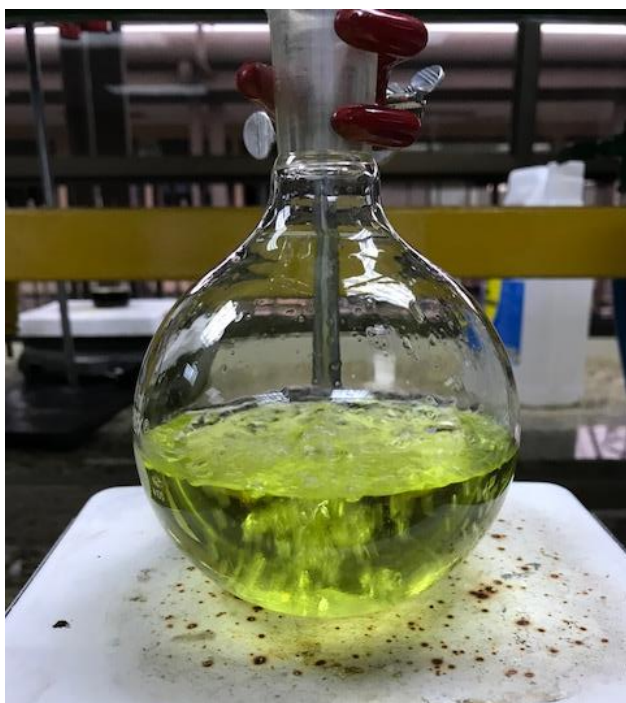


Fuente: Propia

### **Extracto etanólico tratado previamente con hexano**

Se llevó a cabo el tratamiento de las hojas con hexano, según lo descrito en la metodología para obtener en como residuo un extracto de coloración verde intenso en el cual según Lallana, M y Lallana V. (2003); de acuerdo con la solubilidad se deben encontrar los pigmentos tipo clorofilas y carotenoides. Se obtuvo un extracto de coloración café-musgo de consistencia líquida con ligera formación de grumos al ser almacenado en botella color ámbar con tapa a 4°C.

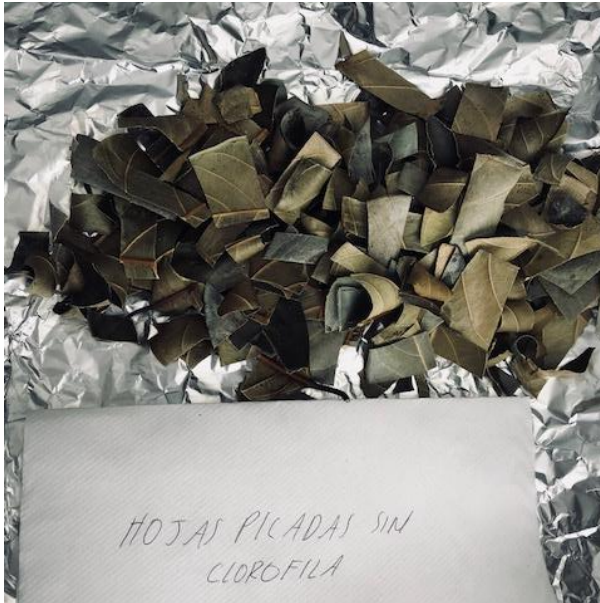
Figura 5. Residuo de tratamiento con hexano



Fuente: propia.

Al secar las hojas en el horno, se obtuvo un material vegetal de coloración café-oscuro con un aspecto áspero parecido al de hojas secas.

Figura 6. Hojas secas con baja concentración de pigmentos naturales



Fuente: propia.

Figura 7. Equipo utilizado en filtración del extracto tratado con hexano



Fuente: propia.

### Extracto etanólico sin previo tratamiento

Al seguir la metodología descrita para este extracto, se obtuvo un extracto de coloración verde oscura con consistencia oscura, olor fuerte una vez fue evaporado para concentrarlo, con muy escasa formación de grumos los cuales disolvían fácilmente, se mantuvo así al ser almacenado a 4°C en botella de vidrio color ámbar con tapa.

Figura 8. Equipo utilizado en extracción con etanol



Fuente: propia.

Figura 9. Aspecto final del extracto etanólico



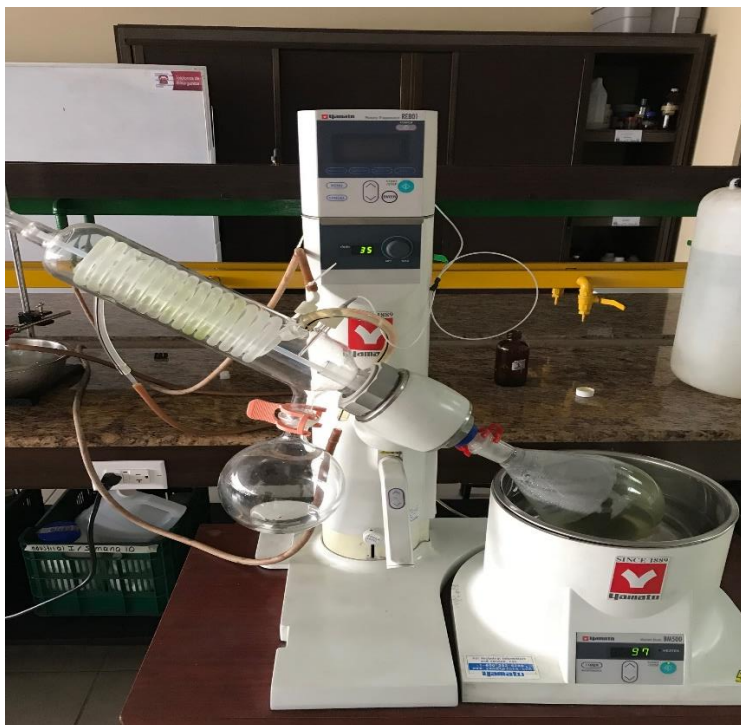
Fuente: propia.

### **Obtención del liofilizado y cuantificación de la concentración del extracto líquido**

Una vez realizado el proceso de congelación y posterior liofilización de una muestra de 5ml del extracto etanólico, se obtuvo un extracto seco de coloración oscura y consistencia resinosa, el cual, al ser pesado en una balanza analítica pesaba 0,221g. Ello indica que el extracto del cual fue recolectada la muestra para la liofilización posee una concentración de 44,2mg/ml.

A partir de esta concentración, se realizó una serie de diluciones y cálculo de dosis para administrar las establecidas a cada grupo de animales de prueba.

Figura 10. Proceso de concentración de extracto mediante rotavapor



Fuente: propia.

Figura 11. Proceso de congelamiento de la muestra con nitrógeno líquido



Fuente: propia.

Figura 12. Proceso de liofilización



Fuente: propia.

Figura 13. Liofilizado obtenido



Fuente: propia.

A partir del peso obtenido en el extracto liofilizado, se calculó la concentración del extracto utilizado. Se dividieron los gramos obtenidos de sólido en el vial (0,221g), entre el volumen inicial adicionado al liofilizador (5ml) y se obtuvo una concentración del extracto natural hidroalcohólico de 44,2 mg/ml aproximadamente para la muestra de 5ml.

Según Shayne, Crystal, Nicolas, Bart y Heide (2006) p. 504: La administración de un volumen de 2ml/kg de una solución de etanol al 70 % a ratas de experimentación, puede producir hipoquinesia, disnea, distención pulmonar e inflamación abdominal. Por lo que al contar con un volumen total de 300 ml de extracto disuelto en etanol al 80 %, fue necesario concentrar la muestra hasta un volumen de 10 ml aproximadamente y posterior a esto reconstituir el extracto en 40 ml de agua destilada.

## Identificación de metabolitos secundarios

### Identificación de taninos

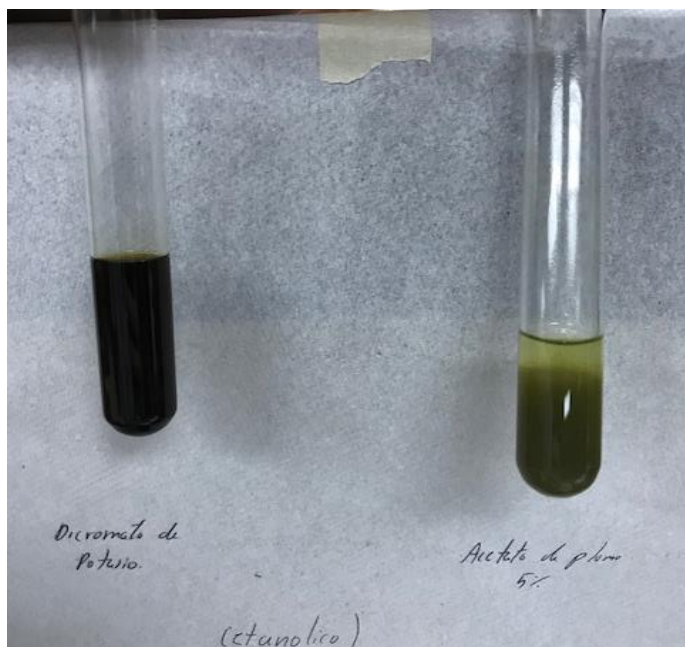
Se llevó a cabo la prueba con dicromato de potasio y Acetato de plomo al 5 % a los tres extractos para la identificación de la presencia de taninos

Figura 14. Identificación de taninos en extracto acuoso



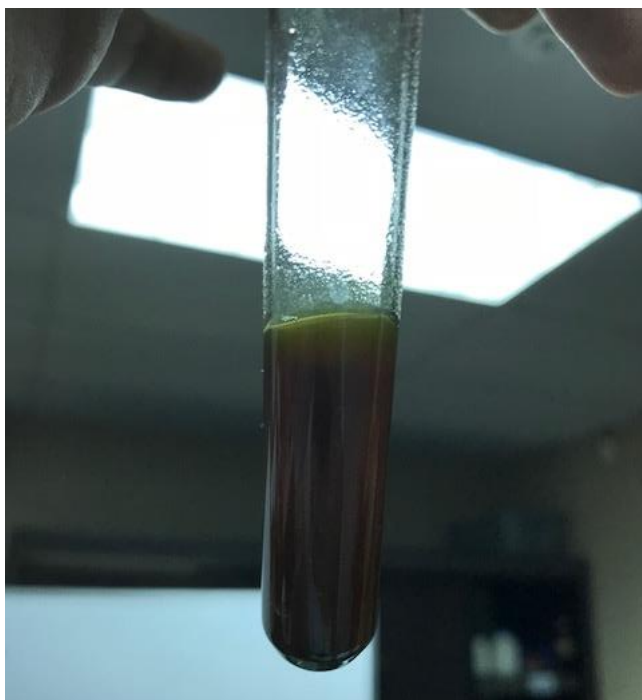
Fuente: propia.

Figura 15. Identificación de taninos en extracto etanólico



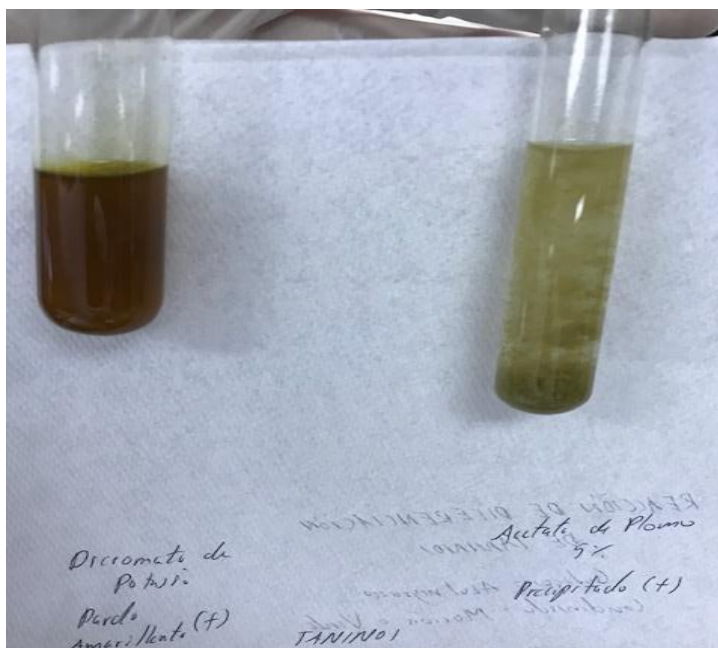
Fuente: propia.

Figura 16. Prueba de dicromato de potasio en extracto etanólico (acercamiento)



Fuente: propia.

Figura 17. Identificación de taninos en extracto etanólico con baja concentración de pigmentos



Fuente: propia.

Para la identificación de taninos se observa una coloración pardo-amarillenta con pequeñas partículas precipitadas como prueba positiva en la reacción con dicromato de potasio en los tres tipos de extractos, debido a que los taninos forman una coloración roja intensa y formación de leves precipitados al añadir sales de cobre, plomo y estaño y soluciones concentradas de dicromato de potasio (Altamirano. A, 1968). Sin embargo, se observó una coloración y formación de partículas más pronunciada en el extracto etanólico lo cual podría ser un indicador de una mayor concentración de metabolitos secundarios de tipo taninos en la muestra obtenida.

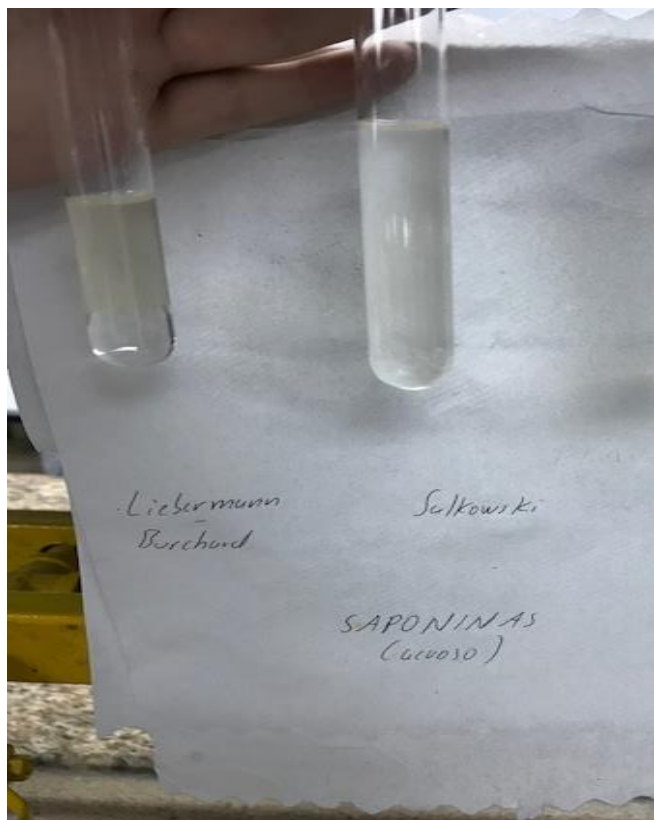
En el caso de la prueba de acetato de plomo al 5 % se observa una prueba positiva en los tres extractos debido a la clara aparición de un precipitado de coloración clara al llevarse a cabo la reacción con el acetato de plomo. En la reacción con extracto etanólico, se observa la formación de un precipitado de coloración más oscura en comparación a los dos extractos restantes lo cual se debe a la presencia de pigmentos naturales en el extracto.

En el caso del extracto acuoso se observa una coloración completamente clara, consecuente a la baja cantidad de pigmentos naturales presentes en el extracto; así mismo, en el extracto con baja concentración de pigmentos se observa una coloración intermedia en términos de claridad, debido a que este presenta una concentración muy leve de pigmentos naturales por su previo tratamiento con hexano.

### Identificación de saponinas

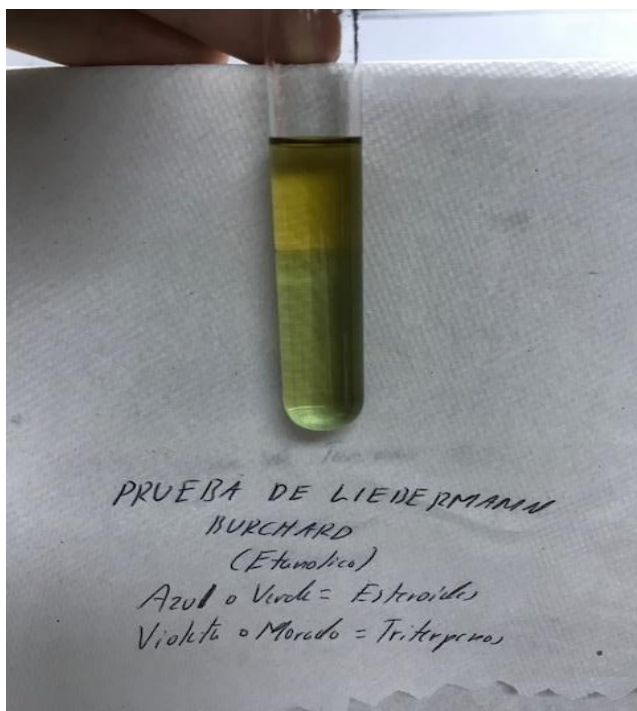
Se realizó la prueba de Liebermann-Burchard y de Salkowski para la identificación de metabolitos secundarios tipo saponinas a los tres extractos.

Figura 18. Pruebas de identificación de saponinas en extracto acuoso



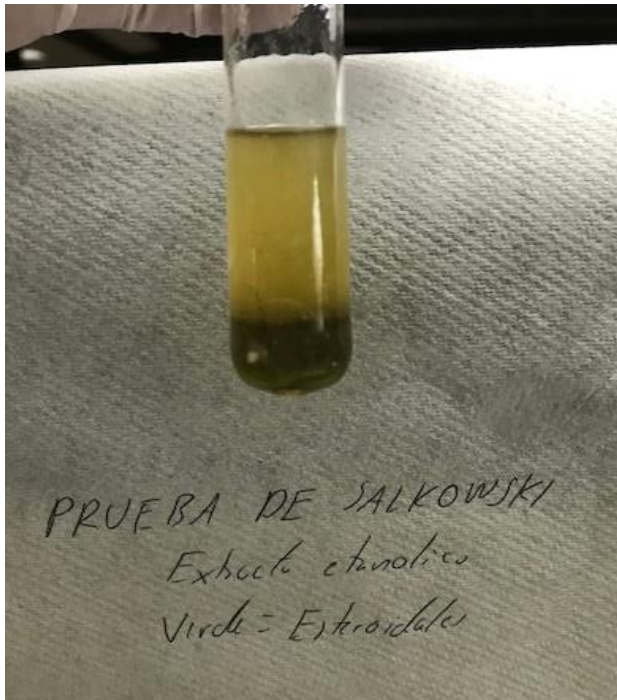
Fuente: propia.

Figura 19. Prueba de Liebermann-Burchard extracto etanólico



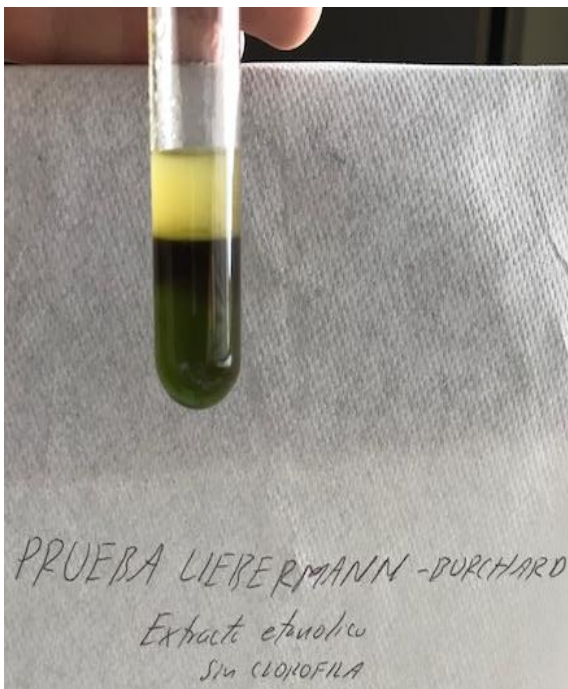
Fuente: propia.

Figura 20. Prueba de Salkowski extracto etanólico



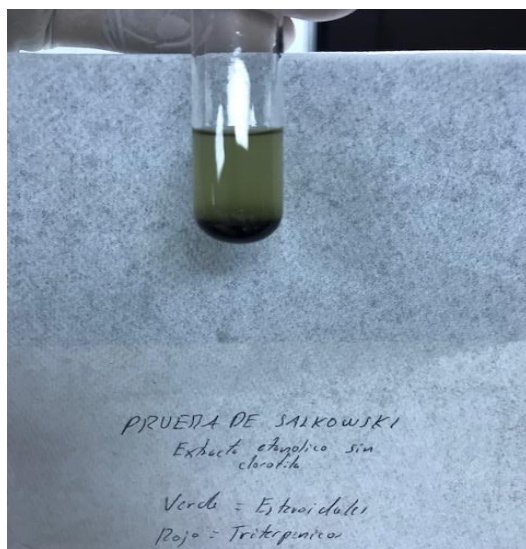
Fuente: propia.

Figura 21. Prueba de Liebermann-Burchard extracto etanólico con baja concentración de pigmentos



Fuente: propia.

Figura 22. Prueba de Salkowski en extracto etanólico con baja concentración de pigmentos



Fuente: propia.

Según los resultados demostrados anteriormente, se observa que para la identificación de metabolitos secundarios tipo saponina en los tres extractos, hubo presencia de pruebas negativas en el caso del extracto acuoso (Figura 18), lo cual indica que condiciones de extracción como el solvente, el método de extracción utilizado y el tiempo de extracción que se dejó funcionando el equipo pudieron haber afectado en la cantidad de saponinas extraídas del material vegetal. Sin embargo, en el caso del extracto etanólico, los resultados fueron positivos en las pruebas realizadas, dando como solución la presencia positiva de saponinas esteroidales. (Figuras 19-20).

En el caso del extracto tratado previamente con hexano para la eliminación de pigmentos se observó una prueba positiva con coloración verde en la prueba de Liebermann-Burchard (Figura 21). Sin embargo, en el caso de la prueba de Salkowski se observa una coloración verdosa no muy intensa (Figura 22), lo cual ofrece una menor fiabilidad de concentración de compuestos saponificables esteroidales en comparación al extracto etanólico sin previo tratamiento con hexano.

Según Shanmugapriya, Saravana, Payal, Mohammed y Bennai (2011). pp. 2587-2589. Al realizar análisis fitoquímico de varias partes de la planta de *A. heterophyllus*, se utilizaron

solventes acuosos, etanólico, etil acetato y en acetona de muestras vegetales provenientes de la India demostraron que los extractos acuosos y etanólico poseen presencia de metabolitos secundarios saponificables, no obstante, la fracción etanólica del extracto obtenido demostró, mediante análisis fotoquímicos previamente validados, una mayor concentración de estos compuestos en comparación a la fracción acuosa, lo cual justifica los resultados negativos en el extracto acuoso para las pruebas de Liebermann-Burchard y Salkowski.

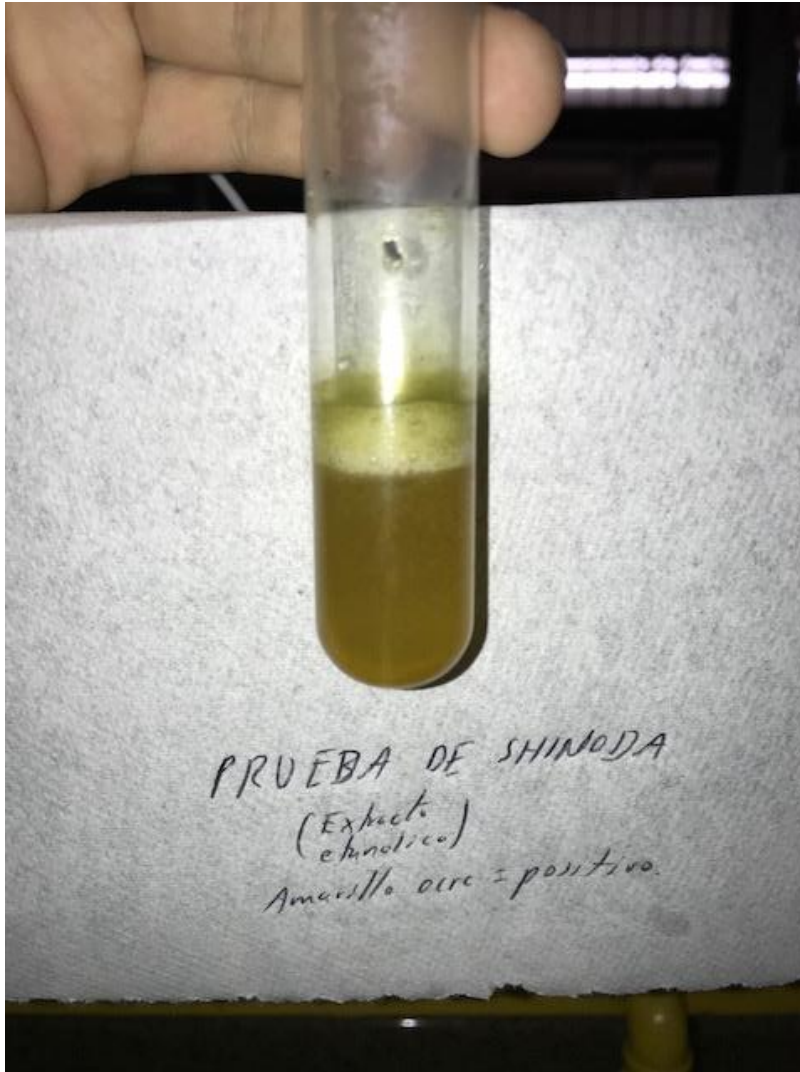
Sin embargo, según las fuentes bibliográficas, puede existir cierta variabilidad de metabolitos presentes en las plantas por causa de las regiones geográficas en las que esté ubicada la planta, en las cuales se toma en cuenta las condiciones climáticas y otros factores a los que se somete la planta durante su crecimiento y maduración.

Este argumento se evidencia al ubicarnos en los resultados obtenidos por El-Beshbishy et al. (2011). pp. 789-790; en su análisis fotoquímico de especies de *A. heterophyllus* provenientes de Aswan, Egipto, en el cual se evidenció una total ausencia de compuestos de tipo saponinas en extractos obtenidos por maceración con etanol al 80 %.

### **Identificación de flavonoides**

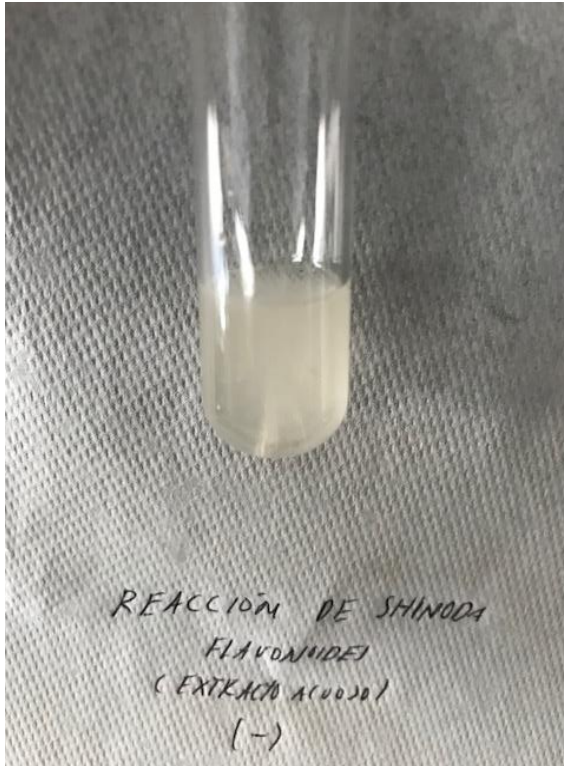
Se llevó a cabo la prueba de Shinoda para la identificación de metabolitos secundarios tipo flavonoides.

Figura 23. Prueba de Shinoda extracto etanólico



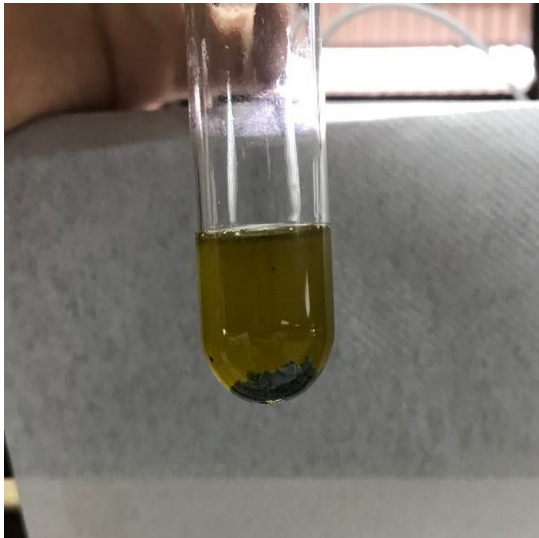
Fuente: propia.

Figura 24. Prueba de Shinoda extracto acuoso



Fuente: propia.

Figura 25. Prueba de Shinoda en extracto con baja concentración de pigmentos



Fuente: propia.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para la identificación de flavonoides, se observa que para los tres casos se produjeron coloraciones distintas, en los casos del extracto acuoso (Figura 24) y el extracto tratado previamente con hexano (Figura 25). Se observaron coloraciones que no están reportadas para ningún tipo de compuesto de tipo flavonoide. Sin embargo, para el extracto etanólico (Figura 23) se observó una coloración amarillenta ocre, la cual es un indicador de presencia de varios tipos de flavonoides.

Según Álvarez, N., Álvarez, B. y Pacheco (1996) p. 363: Los flavonoides son compuestos metabolitos secundarios naturales que de acuerdo con su tipo de núcleo el cual corresponde a un sistema  $C_3-C_6-C_3$ , de los cuales para ese entonces se conocían más de 10 tipos, se clasifican en compuestos tipo chalcona, isoflavonas, flavononas, entre otros. Según lo anterior, existe una varianza en la respuesta del compuesto ante la reacción de Shinoda, por lo que los resultados mostrados anteriormente para el extracto etanólico puede corresponder a la presencia de compuestos flavonoides tipo isoflavonas, flavonoles y flavonas.

No obstante, en la actualidad, existen métodos mucho más exactos para la cuantificación de tipo y concentración de flavonoides presentes en un extracto natural, entre los cuales se destacan principalmente espectrofotometría ultravioleta, espectrofotometría de masas, difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear. Estos procedimientos cuantitativos no fue posible realizarlos para esta investigación debido a la dificultad de conseguir los equipos necesarios.

### **Cuantificación por espectrofotometría infrarrojo**

Se colocó la muestra que había sido tratada previamente con la ayuda del SpeedVec la cual una vez terminado el ciclo del equipo quedo al fondo del vial una pastilla húmeda de extracto (Figura 27), de la cual, con la ayuda de una espátula, se colocó una pequeña muestra en el Infrarrojo.

Se utilizó el equipo SpeedVec (Figura 26) para este procedimiento y no los otros métodos de concentración del extracto utilizados anteriormente, debido a que este equipo posee capacidad para viales de 1ml, pero su proceso de eliminación de solventes usualmente es bastante efectivo.

Se compararon los picos significativos obtenidos con los reportados en la literatura para el  $\beta$ -sitoesterol, el cual según Gupta, Kumar, Mishra y Prakash. (2010); es un esteroide de estructura similar al colesterol que se encuentra en las hojas de *A. heterophyllus*.

Figura 26. SpeedVec utilizado para la eliminación de solventes



Fuente: Propia

Figura 27. Muestra obtenida del equipo SpeedVec



Fuente: propia.

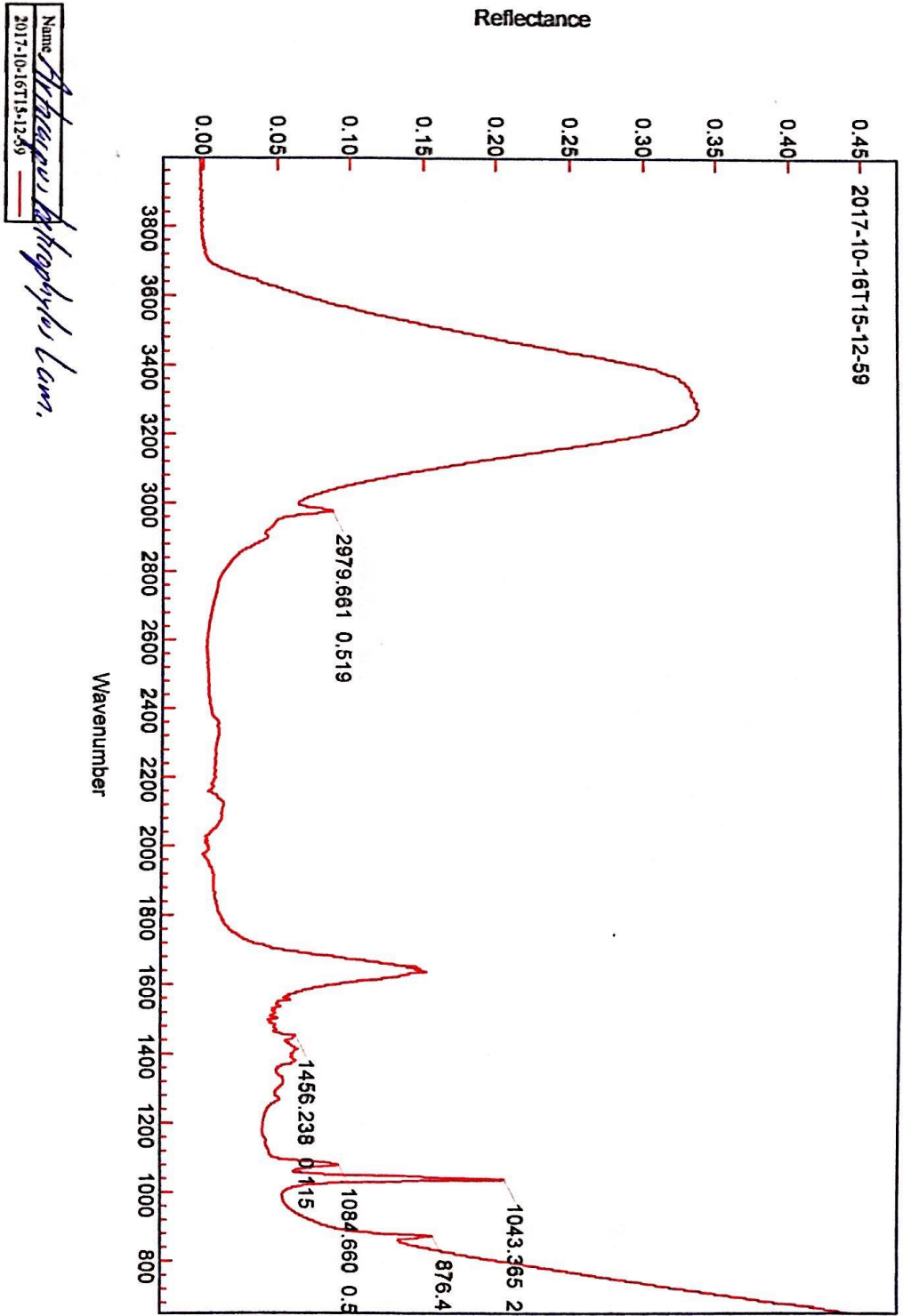


Figura 28. Espectro IR del extracto de *A. heterophyllum*

Fuente: propia.

De acuerdo con lo observado en la Figura 28, las bandas de absorción a destacar serían las correspondientes a  $3200-3400\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la elongación O-H, absorción a  $2979\text{cm}^{-1}$  y a  $2890\text{cm}^{-1}$  los cuales son resultado de la elongación C-H alifático. La elongación observada en  $1645\text{cm}^{-1}$  corresponde a la elongación C=C la cual posee una reflectancia de nivel medio. A  $1456\text{cm}^{-1}$  se observa una frecuencia de flexión correspondiente a  $(\text{CH}_2)_n$  cíclico. En  $1390\text{cm}^{-1}$  se observa una banda media de absorción correspondiente a  $-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$ .

Las elongaciones respectivas para los cicloalcanos se pueden observar a  $1043\text{cm}^{-1}$ . Las vibraciones C-H de las regiones insaturadas de la molécula se pueden observar a  $876\text{cm}^{-1}$ . La absorción observada a  $1084\text{cm}^{-1}$  es debida al enlace C-O.

Al comparar los resultados obtenidos con las bandas de absorción reportadas para el aislamiento del beta-sitosterol por parte de Kamboj y Kumar (2011) p. 95, se logra comprobar una alta semejanza en los valores reportados anteriormente con los obtenidos por los autores de referencia (Tabla 5). Sin embargo, futuros métodos de análisis son necesarios para establecer de manera específica la presencia del compuesto beta-sitosterol en el extracto natural obtenido de *A. heterophyllus*.

Tabla 5. Comparación de valores obtenidos por IR

Estructura	Valor obtenido ( $\text{cm}^{-1}$ )	Valor de referencia ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H	3200-3400	3373
C-H alifático	2979 y 2890	2940 y 2867
C=C	1645	1641
$(\text{CH}_2)_n$ cíclico	1456	1457
$-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$	1390	1381
Cicloalcano	1043	1038
C-H insaturación	876	881
C-O	1084	1050-1150

### Ensayo animal

Una vez llevado a cabo el procedimiento experimental animal descrito en la metodología se obtuvieron los siguientes resultados al administrar el extracto a dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg, además de la administración del control positivo y control negativo, tomando valores de glicemia a tiempos 0, 40, 70 y 100 minutos.

	Agua VO (mg/dl)					% aumento				
	0	40	70	100	130	0	40	70	100	130
1	75	136	148	182	159	100,00	181,33	197,33	242,67	212,00
2	81	150	127	132	133	100,00	185,19	156,79	162,96	164,20
3	78	136	167	132	114	100,00	174,36	214,10	169,23	146,15
4	89	150	161	170	172	100,00	168,54	180,90	191,01	193,26
5	92	162	147	144	132	100,00	176,09	159,78	156,52	143,48
					<b>Promedio</b>	<b>100,00</b>	<b>177,10</b>	<b>181,78</b>	<b>184,48</b>	<b>171,82</b>
					<b>DS</b>	<b>0,00</b>	<b>6,42</b>	<b>24,47</b>	<b>35,02</b>	<b>29,98</b>

Tabla 6. Valores de glicemia obtenidos para el tratamiento con Agua VO

En los resultados obtenidos en tratamiento con agua VO, se analizaron solamente los resultados de cinco animales, debido a que un animal falleció durante el ensayo.

Tabla 7. Valores de glicemia obtenidos para el tratamiento con glibenclamida

	Glibenclamida 5 mg/kg (mg/dl)					% aumento				
	0	40	70	100	130	0	40	70	100	130
1	90	89	76	88	71	100,00	98,89	84,44	97,78	78,89
2	69	88	94	72	56	100,00	127,54	136,23	104,35	81,16
3	106	116	110	93	88	100,00	109,43	103,77	87,74	83,02
4	69	89	77	61	69	100,00	128,99	111,59	88,41	100,00
5	65	82	73	77	52	100,00	126,15	112,31	118,46	80,00
6	78	92	98	62	72	100,00	117,95	125,64	79,49	92,31
					<b>Promedio</b>	<b>100,00</b>	<b>118,16</b>	<b>112,33</b>	<b>96,04</b>	<b>85,90</b>
					<b>DS</b>	<b>0,00</b>	<b>11,97</b>	<b>17,89</b>	<b>13,97</b>	<b>8,42</b>

Tabla 8. Valores de glicemia obtenidos del tratamiento con extracto a 250mg/kg

Extracto D2 (250mg/kg)						% aumento				
	0	40	70	100	130	0	40	70	100	130
1	77	170	167	152	125	100,00	220,78	216,88	197,40	162,34
2	95	150	131	128	118	100,00	157,89	137,89	134,74	124,21
3	92	168	159	141	133	100,00	182,61	172,83	153,26	144,57
4	75	160	145	139	129	100,00	213,33	193,33	185,33	172,00
5	84	161	162	156	129	100,00	191,67	192,86	185,71	153,57
6	67	155	151	151	120	100,00	231,34	225,37	225,37	179,10
					<b>Promedio</b>	<b>100,00</b>	<b>195,37</b>	<b>184,46</b>	<b>176,88</b>	<b>154,69</b>
					<b>DS</b>	<b>0,00</b>	<b>27,33</b>	<b>31,63</b>	<b>32,21</b>	<b>19,89</b>

Tabla 9. Valores de glicemia obtenidos del tratamiento con extracto a 500mg/kg

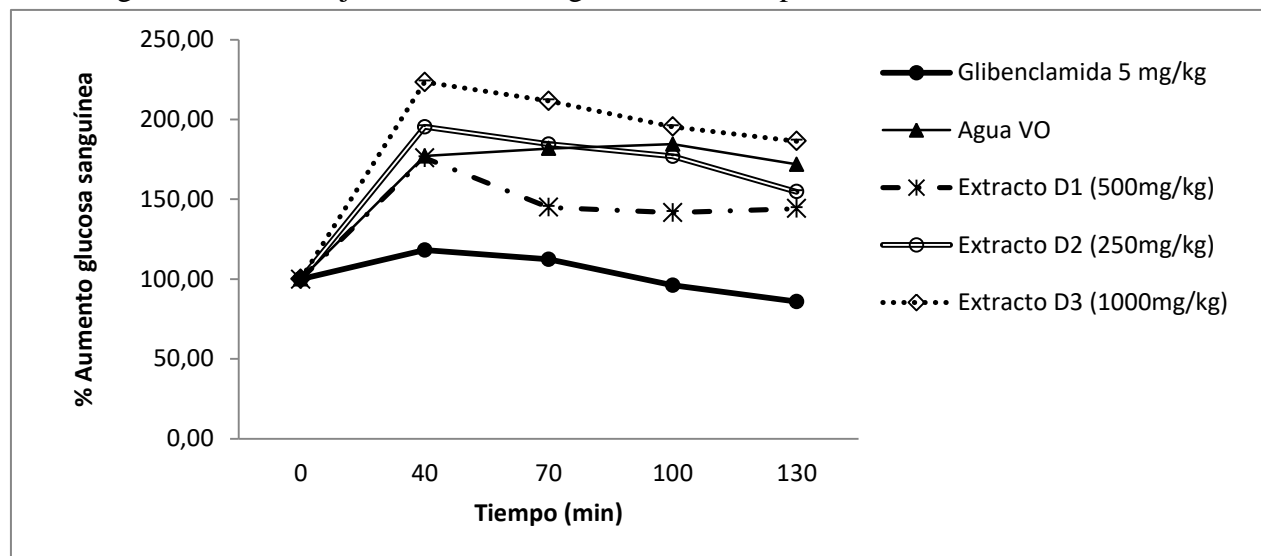
Extracto 500mg/kg						% aumento				
	0	40	70	100	130	0	40	70	100	130
1	88	137	130	130	122	100,00	155,68	147,73	147,73	138,64
2	87	155	66	108	79	100,00	178,16	75,86	124,14	90,80
3	78	156	127	107	127	100,00	200,00	162,82	137,18	162,82
4	96	163	132	122	143	100,00	169,79	137,50	127,08	148,96
5	89	154	160	155	145	100,00	173,03	179,78	174,16	162,92
6	84	150	139	117	135	100,00	178,57	165,48	139,29	160,71
					<b>Promedio</b>	<b>100,00</b>	<b>175,87</b>	<b>144,86</b>	<b>141,60</b>	<b>144,14</b>
					<b>DS</b>	<b>0,00</b>	<b>14,47</b>	<b>36,85</b>	<b>18,10</b>	<b>27,84</b>

Tabla 10. Valores de glicemia obtenidos del tratamiento con extracto a 1000mg/kg

Extracto D3 (1000mg/kg)						% aumento				
	0	40	70	100	130	0	40	70	100	130
1	86	155	144	128	122	100,00	180,23	167,44	148,84	141,86
2	75	170	148	150	165	100,00	226,67	197,33	200,00	220,00
3	73	188	160	118	113	100,00	257,53	219,18	161,64	154,79
4	65	172	167	158	147	100,00	264,62	256,92	243,08	226,15
5	67	151	168	167	141	100,00	225,37	250,75	249,25	210,45
6	86	160	153	146	142	100,00	186,05	177,91	169,77	165,12
					<b>Promedio</b>	<b>100,00</b>	<b>223,41</b>	<b>211,59</b>	<b>195,43</b>	<b>186,40</b>

					<b>DS</b>	<b>0,00</b>	<b>35,03</b>	<b>37,24</b>	<b>42,80</b>	<b>36,67</b>
--	--	--	--	--	-----------	-------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Figura 29. Porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo



Fuente: propia.

En los aspectos toxicológicos evaluados para las distintas dosis siguiendo como referencia la tabla otorgada por el LEBi-UCR (Figura 2), no se obtuvo ningún parámetro con gravedad 1 o mayor, lo cual indica que las dosis administradas no presentan toxicidad evidenciada hasta el momento con las dosis utilizadas, es necesario el ahondamiento en este aspecto del extracto mediante la administración de dosis mayores (5 000 mg/kg) y con periodos de observación mucho mayores mediante los cuales se pueda analizar con más detenimiento aspectos tales como pérdida de peso, diarrea, entre otros. De manera que se pueda definir con certeza a que dosificaciones el extracto puede ser nocivo para la salud e incluso letal.

En los aspectos hipoglicemiantes, de acuerdo con lo observado en los resultados anteriores y en el análisis estadístico (Anexo 1), se observó que en el caso de la administración de agua vía oral, como control negativo, los valores de glicemia estuvieron bastante altos debido a la carga de almidón administrada a los animales, y se observaron disminuciones en la recta de porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo (Figura 29), hasta tiempos de 130 minutos, esto debido a mecanismos fisiológicos normales de captación de glucosa por parte de la insulina,. Estos resultados otorgan un control negativo a partir del cual se analizaron estadísticamente los

resultados, porque a partir de este comportamiento cualquier diferencia estadísticamente significativa se considera como la presencia de bioactividad por parte de la sustancia utilizada.

Para el caso de la administración de glibenclamida, se observó en la gráfica de porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo que la recta se mantiene en valores bajos en todos los tiempos y se obtuvo en el análisis estadístico valores significativos de  $P < 0.05$  en todos los tiempos menos el tiempo 0, lo cual se justifica siendo este un medicamento altamente comercializado para su uso en pacientes diabéticos. Sin embargo, estos resultados otorgaron un control positivo al ensayo realizado.

En el caso de la administración del extracto a dosis de 250 mg/kg, se obtuvo a partir del análisis estadístico que el porcentaje de aumento de glicemia no tuvo valores estadísticamente significativos. Pero, al observar el comportamiento de la recta en la gráfica de porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo (Figura 29), se observa que la recta disminuye en tiempos en los que el control negativo no lo hace y que en todo momento a partir de los 40 min esta fue decreciente, lo cual indica que si se presentó una actividad biológica por parte del extracto a esta dosis pero que el efecto no tiene tal magnitud de manera que ofrezca valores estadísticamente significativos para ser catalogado como una actividad biológica notable, por lo que se declara que a esta dosis el extracto no tiene un efecto terapéuticamente válido.

En la administración del extracto a los animales, en dosis de 500 mg/kg, se observaron los mejores resultados, siendo que para esta dosis el análisis estadístico demostró que el extracto de *A. heterophyllus* tuvo una inhibición del aumento de glicemia específico a tiempos de 70 y 100 minutos, siendo esta una disminución de casi el 40 % de la glucosa en sangre con respecto al valor del control negativo, lo cual establece que el extracto si posee un efecto terapéuticamente significativo a dosis de 500 mg/kg al analizarlo estadísticamente, así mismo se observa en la gráfica de porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo, que la recta decrece a partir de los 40 minutos y se mantiene en valores estables de glucosa en sangre hasta los 130 minutos. Esto es un indicativo de que el extracto a esta dosis posee capacidades de mantener niveles estables de glucosa en sangre.

No obstante, para aseverar esta afirmación como un uso oficial del extracto, es necesario llevar a cabo un ensayo en el que la metodología permita analizar el comportamiento de la glicemia, una vez administrado el extracto, por un tiempo más prolongado, con el fin de

evidenciar que el comportamiento de esta recta se mantendrá en niveles estables de glicemia independientemente de mecanismos fisiológicos habituales de metabolismo de glucosa.

Para el caso de la administración del extracto en dosis de 1000 mg/kg, se observó en la recta obtenida en el gráfico de porcentaje de aumento de glicemia vs tiempo, que inicialmente a los 40 minutos hubo un incremento significativo en los niveles de glucosa en sangre, esto puede deberse a la cantidad de azúcares naturales que usualmente pueden contener este tipo de extractos, los cuales causan un pico de glicemia al administrarse simultáneamente la carga de almidón

No obstante, después de este tiempo, se observa que la recta posee un comportamiento decreciente aunque no muy significativo. Esto puede deberse a que, aunque el extracto igualmente posee actividad biológica hipoglicemiante, la cantidad de glucosa administrada entre el extracto y el almidón sobrepasan esta cantidad, por lo que se establece que el extracto a esta dosis ya no posee una actividad terapéuticamente significativa.

Igualmente, en el análisis estadístico de la administración del extracto a dosis de 1000 mg/kg no se obtuvieron valores estadísticamente importantes, los cuales nos indiquen que a esta dosis existe un efecto terapéutico viable. Más bien, se obtuvieron valores de diferencia significativa, pero hacia el aumento de glicemia, aumentando casi en un 45 % la cantidad de glucosa en sangre a los 40 minutos.

A partir de estos resultados, se comprueba la actividad biológica hipoglicemiante dosis-dependiente que posee el extracto hidroalcohólico de hojas maduras de *A. heterophyllus*, en dosis de 500mg/kg. Sin embargo, el mecanismo de acción responsable de esta actividad aún permanece desconocido.

De acuerdo con lo obtenido por Kotowaroo et al. (2006), esta planta posee componentes que han demostrado tener una acción inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa; de manera que en este ensayo se utilizó almidón con el fin de observar si el extracto posee componentes que actúen sobre las enzimas encargadas de degradar los azúcares a nivel gastrointestinal, tales como la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. De esta forma, al inhibir las enzimas no habría degradación del almidón en glucosa y como consecuencia no se daría absorción completa de carbohidratos lo que evitaría un aumento de la glicemia.

Sin embargo, al observar los resultados obtenidos y discutidos anteriormente, se evidencia que el extracto comenzó su acción biológica a partir de los 40 min en todos los casos. Se observó que en todas las rectas del gráfico de porcentaje de aumento de glicemia versus tiempo, a los 40 minutos hubo un pico de glucosa en sangre, lo cual indica claramente que el almidón si se degradó y que los carbohidratos fueron absorbidos a nivel gastrointestinal. De esta forma, se descarta este mecanismo de acción como el responsable de la actividad hipoglicemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de *A. heterophyllus*.

Esto deja como posibles mecanismos de acción del extracto varias opciones que requieren futuras investigaciones para definir cuál o cuáles son los responsables de causar el efecto hipoglicemiante, entre ellos se pueden encontrar un aumento de la captación de glucosa libre en sangre, un aumento en la liberación de insulina por parte de las células pancreáticas, aumento del efecto incretina o una disminución de la reabsorción de glucosa. Así mismo, se encuentra la posibilidad que el mecanismo de acción no se relacione con ninguno de los mecanismos reportados como tratamiento convencional de la diabetes, sino que sea un mecanismo de acción completamente distinto.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Se concluye, tomando en cuenta los resultados obtenidos gracias a la metodología que se planteó en esta investigación, que existe una excelente efectividad en utilizar un modelo animal para obtener resultados confiables mediante los cuales se logra validar el procedimiento de elaboración de un producto natural hipoglucemiante a base de *A. heterophyllus*.

La conclusión anterior se evidencia al haberse realizado una correcta validación de los procesos de recolección, preparación de la muestra vegetal, método de extracción de los componentes activos, identificación y cuantificación de la presencia de metabolitos secundarios y finalmente su evidencia de la bioactividad que posee el extracto vegetal que se obtuvo bajo las condiciones establecidas.

De estas condiciones, se analizó que la importancia de llevar a cabo los procedimientos de una correcta recolección y preparación de la muestra vegetal son de suma importancia debido a que la recolección del material de una planta, la cual no se encuentre en su estadio de crecimiento adecuado podría variar la bioactividad.

Así mismo, una vez recolectado el material vegetal, se definió la importancia de la autenticación de la muestra por parte de un profesional en el área de botánica o ingeniería forestal, el cual tenga la formación suficiente para ofrecer información confiable; esto debido a que en muchos casos las diferentes plantas pertenecientes al mismo género o familia poseen similitudes en su anatomía vegetal. Sin embargo, al ser autenticada la planta, se pueden señalar los resultados con completa fiabilidad a la especie que se está investigando.

Igualmente, se destaca que puede ser de gran impacto negativo la omisión del proceso de limpieza y posterior secado de la muestra vegetal, debido a que mediante la limpieza adecuada se evita la formación de factores contaminantes del extracto final, así como el desarrollo de hongos o presencia de tierra o polvo en la muestra vegetal. Pero, el proceso de secado no se recomienda

realizarlo a temperaturas muy altas debido a que algunos metabolitos secundarios en su estado natural pueden ser termolábiles.

Antes de colocar la muestra vegetal en el equipo de extracción, es necesario seleccionar un método en el cual la superficie de contacto del material vegetal con el solvente utilizado sea la mayor posible para extraer la mayor cantidad de componentes y, así mismo, reducir el tiempo necesario con el fin de obtener un extracto con concentraciones capaces de realizar una actividad biológica efectiva.

A la hora de seleccionar el solvente, fue crítico tomar en cuenta la polaridad del solvente utilizado, así como las propiedades fisicoquímicas de los compuestos que se han reportado para esta planta. De la misma manera, se deben tomar en cuenta los solventes utilizados en investigaciones antecedentes; sin embargo, no se debe limitar a los que estos reportan ya que el reto del disolvente a utilizar aplica de manera distinta a cada investigación debido a que este se desenvuelve principalmente en el fin farmacoterapéutico que se desee obtener.

Para esta investigación, se determinó que el solvente a utilizar más adecuado, entre los que se utilizaron (etanol y agua), fue el etanol debido a que en las pruebas de identificación de metabolitos secundarios obtuvo una mayor cantidad de pruebas positivas en comparación al extracto acuoso.

Respecto al método de extracción, se concluye que este es un determinante primordial de la calidad de extracto que se va a obtener, debido a que si se realiza de manera incorrecta o sin la pericia adecuada se puede desencadenar una baja o nula eficacia farmacológica. Sin embargo, concluir que el método utilizado en esta investigación fue el óptimo es inválido, debido a la extensa variedad de métodos de extracción que se han desarrollado hasta hoy, de los cuales muchos y probablemente los de mayor eficacia requieren de equipos de alto costo y de uso principalmente industrial.

Los métodos de análisis cuantitativo de sustancias presentes, ya sea de identificación de grupos funcionales o de análisis de concentración de sólidos en el extracto, pueden ser muy variables debido a la dificultad que en ocasiones se presenta, dado que para la mayoría de pruebas de análisis cuantitativo se requiere de equipos especiales los cuales en su mayoría poseen un costo elevado. Sin embargo, es de suma importancia realizar estas pruebas debido a que estos

ofrecen información vital de que tan eficaz es el método de extracción y en el caso de revelar una bioactividad del extracto vegetal, poder señalar sustancias orgánicas responsables del efecto farmacológico.

Gracias a los métodos de análisis fitoquímico realizados en esta investigación, se concluyó que el extracto hidroalcohólico de hojas maduras de *A. heterophyllus* posee un esteroide identificado como el  $\beta$ -sitosterol, el cual ha reportado tener actividad hipolipidémica; sin embargo, son necesarios futuros estudios que analicen esta actividad biológica específica.

Todos los equipos utilizados para análisis de muestras o procedimientos experimentales deben ser previamente validados antes de ser utilizados por el investigador, debido a que muchos equipos pueden descalibrarse fácilmente o no encontrarse en las condiciones adecuadas para el estudio que se necesite. Esto puede causar la obtención de resultados no válidos que pueden causar confusión a los lectores.

Estas condiciones se ultiman como condiciones bajo las cuales el extracto obtenido posee estabilidad y principalmente actividad biológica, la cual le brinda una gran capacidad como objetivo de futuras investigaciones con el fin de refinar el método y continuar con el proceso oficial de elaboración de un producto natural, el cual constituya una terapia farmacológica alternativa para personas diabéticas, prediabéticas y no diabéticas.

Es de suma importancia a la hora de realizar una investigación que involucre un modelo animal, la capacitación en el área por parte del investigador, así como la presencia de un supervisor con amplia experiencia en el área, debido a que la experimentación con animales es un proceso complejo que involucra muchos factores los cuales se deben analizar cuidadosamente con el fin de lograr una metodología animal, que cumpla con los estándares bioéticos y los principios establecidos para que el investigador obtenga resultados óptimos bajo el método más adecuado y con la menor cantidad posible de animales de experimentación.

A la hora de administrar cualquier sustancia a un animal de experimentación, en este caso ratas, se concluye que es primordial tomar en cuenta los volúmenes admitidos para cada especie, debido a que una administración excesiva no planeada de cualquier sustancia a un animal podría causarle afectaciones a nivel gastrointestinal causándole dolor y comprometiendo el ensayo que se realiza.

Si se utiliza un extracto, el cual se encuentra disuelto en alguna sustancia que le pueda causar alteraciones fisiológicas al animal, como lo fue en este caso el etanol al 80 %, es necesario realizar un ajuste del volumen administrado de extracto vegetal con el fin de no darle al animal una cantidad superior a la tolerada, lo cual como consecuencia podría llevar al animal hasta un estado de toxicidad tal que le ocasione la muerte.

Como adición a la conclusión anterior, se dedujo que concentrar el extracto de manera que se elimine en su mayor cantidad posible el solvente o sustancia que le puede causar alteraciones indeseadas al animal es de gran ayuda, dado que así se obtiene una mayor cantidad de miligramos de extracto en un menor volumen. Se ofrece la posibilidad de dar una dosis adecuada en un bajo volumen.

Una vez obtenidos los animales en su etapa de crecimiento deseada para el ensayo, es importante que el investigador que va a administrar los tratamientos se familiarice por un tiempo con los animales que se van a utilizar, debido a que ellos desarrollan un nivel superior de confianza hacia la persona y el investigador puede observar los comportamientos típicos de estos animales al estar en bienestar físico y mental, de manera que se evita un exceso de nerviosismo por parte de los animales y se logra una mayor observación de cambios conductuales o alteraciones en el animal que se aprecien a simple vista.

A la hora de administrar los tratamientos, es de estricta importancia que todos los animales hayan pasado por un lapso de ayuno del mismo tiempo, en caso de que el modelo lo requiera, con el fin de establecer un estado similar en cuestión de glicemia y reducir variaciones que puedan comprometer la fiabilidad de los resultados obtenidos en cada grupo de animales.

Se debe contar con los equipos necesarios para administrar los tratamientos a los animales, dado que una mala administración que involucre un estrés adicional al animal puede causarle daños y provocar derrames o contaminación del tratamiento. Estos equipos abarcan desde las cánulas para la administración vía oral hasta dispositivos de inmovilización que posean las dimensiones adecuadas para el animal que se utiliza.

La selección y la preparación de un método estadístico de análisis de resultados que se adapte a la metodología que se utiliza es de suma importancia con el fin de interpretar los

resultados de la mejor manera, así como la correcta confección de tablas y gráficos con el fin de que el investigador y los lectores puedan interpretar con facilidad los resultados obtenidos.

Se concluyó que el extracto hidroalcohólico de *A. heterophyllus* posee una eficacia hipoglicemiante a dosis de 500 mg/kg capaz de mantener niveles estables de glicemia a partir de los 70 minutos de administrado, al punto de reducir hasta en un 40 % los niveles de glucosa en sangre a los 100 minutos de administrado.

Con respecto a la toxicidad del extracto, se determinó que a dosis de 1000 mg/kg el extracto no presentó signos de toxicidad en los animales a los que se le administró esta dosis. Sin embargo, estudios en los que se utilicen dosis más altas son necesarios con el fin de determinar una dosis tóxica y en qué aspectos fisiológicos afecta esta toxicidad.

Se estableció que, de acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto obtenido en esta investigación constituiría una terapia significativamente efectiva al ser utilizado en terapia combinada con otros medicamentos utilizados para el tratamiento de la diabetes, debido a que este demostró la capacidad de mantener niveles estables de glicemia durante todo el ensayo.

Al comparar los resultados obtenidos del extracto versus los obtenidos por la glibenclamida, se observó que la glibenclamida mantiene una mucho mayor efectividad al reducir los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, los comportamientos de las rectas de ambos tratamientos se mantienen de manera similar a lo largo del tiempo, lo cual indica que el extracto utilizado tiene el potencial para llegar a una mayor eficacia terapéutica mediante el refinamiento del producto natural.

Resaltando lo descrito anteriormente, se concluye que a partir del extracto obtenido en este proyecto se puede continuar con la investigación al punto de definir el método para realizar una formulación completa, la cual culmine en una forma farmacéutica oficial capaz de ser registrada como terapia antidiabética efectiva.

### **Recomendaciones**

Es de suma importancia la actitud autodidacta, por parte del investigador, al realizar un proyecto de este tipo, dado que cualquier paso que se tome en el avance de la investigación debe

llevarse a cabo con criterio científico y, si es posible, con base en evidencia reportada anteriormente por la literatura para evitar una gran cantidad de inconvenientes que comprometan la investigación.

Se recomienda ampliamente incentivar a estudiantes de Farmacia y también a profesionales llevar a cabo investigaciones de carácter exploratorio, debido a la amplia cantidad de sustancias farmacológicas que aún permanecen en la naturaleza sin ser estudiadas o con poca observación por parte de investigadores anteriores, que poseen potencial de brindar un aporte a la salud.

Se invita a los estudiantes que se encuentren interesados en realizar investigaciones que involucren áreas en las que su institución no este del todo desarrollada, acudir a instituciones o profesionales que posean la capacidad de aportar un avance en su investigación. De esta manera, se construirían relaciones entre representantes de instituciones que ayuden a mejorar la calidad de investigaciones que se lleven a cabo.

A la hora de llevar a cabo una investigación, que involucre material vegetal o plantas, se recomienda mantener la mayor higiene posible, debido a que es conocido que estos materiales provienen de un ambiente en el cual abundan los factores contaminantes.

## REFERENCIAS

- Aguilar, C., Barquera, S., Rojas, R. y Villalpando, S. (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud. México.
- Altamirano. A. (1968). Caracterización fitoquímica y evaluación del contenido de provitamina A y vitamina C en diez líneas promisorias de Oca y Zanahoria Blanca. Universidad Central del Ecuador. p. 30. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=EIEzAQAAMAAJ&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_s ummary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=EIEzAQAAMAAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_s ummary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Altamirano, L.M. (2001). Epidemiología y diabetes. Rev Fac Med UNAM; pp. 35-37.
- Álvarez, B., Álvarez, B. y Pacheco, M. (1996). Influencia del método de secado en la composición química de las hojas de *Senna alata L.* Universidad Central de las Villas, Santa Clara. p. 363
- Ariyananda et al. (1990). Effect of artocarpus heterophyllus and asteracanthus longifolia on glucose tolerance in normal human subjects and in maturity-onset diabetic patients. Departamento de Bioquímica, Universidad de Ruhuna, Sri Lanka. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874191900123>
- Ávila et al. (2009). Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología, Cuba. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v14n1/pla02109.pdf>
- Badilla, S., Binns, F., García, P., Herrera, C. y Vargas, M. (2010). Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Witheringia solanacea* in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats. Universidad de Costa Rica. Journal of Ethnopharmacology. pp. 908-909. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.003

- Balls, M. (1994). Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim.* pp. 193-211. doi: 10.1258/002367794780681714
- Bautista, J., Stubing, G., Vanaclocha, B. (1995). *Fitoterapia aplicada*. Valencia: M.I.C.O.F. pp. 368-370.
- Bedekar, A., Shah, K., Koffas, M. (2010). Natural products for type II diabetes treatment. *Adv Appl Microbiol* pp.21–73
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Valdelamar, L., Rodríguez, M., Seyfi, H., Amell, A., Carrillo, M., Silva, C., Acosta, A., Añez, J., Andara, C., Angulo, V., Martins, G. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. pp. 76-86.
- Bisset, N. G. (1994). *Herbal drud and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientist basis*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, U. K. p. 130
- Canadian Council on Animal Care (1980). *Guide to the care and use of experimental animals*. Vol 1. Ottawa. p. 106.
- Chackrewarthy et al. (2010). Evaluation of the hypoglycemic and hypolipidemic effects of an ethylacetate fraction of *Artocarpus heterophyllus* (jak) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. Departamento de Bioquímica y Química Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Kelaniya. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20931077>
- Chen, L., Magliano, D.J., Zimmet, P.Z. (2011). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. pp. 228-236
- Cipolletta, E., Campanile, A., Santulli, G., Sanzari, E., Leosco, D., Campiglia, P., Trimarco, B., Iaccarino, G. (2009). The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced insulinresistance. *Cardiovasc Res*. pp. 407-415.
- Coelho, A.C., García, Diez J.. *Biological Risks and Laboratory-Acquired Infections (2015). A Reality That Cannot Be Ignored in Health Biotechnology*. Front Bioeng Biotechnol. p. 56 doi: 10.3389/fbioe.2015.00056.
- Coppack S.W., Jensen, M.D., Miles, J.M. (1994). In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res*. pp. 177-193

- Connole, M.D., Yamaguchi, H., Elad, D., Hasegawa, A., Segal, E., Torres-Rodríguez J.M. (2000). Natural pathogens of laboratory animals and their effects on research. *Med Mycol.* pp. 59-65.
- Cuyos, M., Donald, D., Dueñas, R. y Valencia, E. (2005). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. p. 33
- Davidson, M.K., Lindsey, J.R., Davis, J.K. (1987). Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med sci.* pp. 551-555.
- Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M (2005). Mechanisms of  $\beta$ -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes.* pp. S108-S113
- Doyle ME, Egan JM. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev.* pp. 105-131.
- El-Beshbishy, H., Moussa, Z., Omar, H., Taha, K. y Singab. A. (2011). Antioxidant Activity of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jack Fruit) Leaf Extracts: Remarkable Attenuations of Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Scientific World Journal.* pp. 789-790. doi: 10.1100/tsw.2011.71.
- Fabricant D.S, Farnsworth N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug Discovery Environ. Health Perspect. pp. 69-75.
- Farnsworth N.R, Akerele R.O, Bingel A.S, Soejarto D.D, Guo Z. (1985). Medicinal plants in therapy *Bull. World Health Organ.* pp. 965-981
- Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, Lelovas P, Morrison F, Torres YS. (2015). The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim.* pp. 267-83. doi: 10.1177/0023677215584249.
- Fernando M.R, Thabrew M.I y Karunanayake E.H. (1989). Hypoglycaemic activity in some medicinal plants in Sri-Lanka. Departamento de bioquímica, Universidad de Ruhuna, Sri-Lanka. pp. 779-782.
- Flórez J, de Cos M.A. (1998). Reacciones adversas a los medicamentos. *Farmacología humana*, 3ra. ed. Barcelona, España. pp. 59.
- Ghaffar et al. (2016). Informe mundial sobre la diabetes. Organización mundial de la salud.

- Granados, J. (2017). Guía para el manejo de animales de laboratorio. Dirección de investigación y desarrollo tecnológico, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones.
- Guillen, J. (2012). FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* pp. 311-321.
- Guzmán JN, Madrigal BE (2003). Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica.* pp. 14-23
- Hankenson FC, Johnston NA, Weigler BJ, Di Giacomo RF. (2003). Zoonoses of occupational health importance in contemporary laboratory animal research. *Comp Med.* pp. 579-601.
- Haq N. (2006) Jackfruit: *Artocarpus heterophyllus*, South Hampton Centre for Under Utilised Crops, University of South Hampton, UK. pp. 22-24
- Hendriksen, C.F. (2009). Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review Vaccines.* pp. 313-322. doi: 10.1586/14760584.8.3.313
- Hernández J, Ramírez ROA, Villagrán C. (2012). Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. México D.C. SAMSARA. pp. 59-70
- Ikan, R. (1991). *Natural products: a laboratory guide* (2nd ed). Academic Press, San Diego, California.
- Jagtap U, Bapat V. (2010). *Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology.* Departamento de Biotecnología de la Universidad de Shivaji, India. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110002060>
- Jiménez,C (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Real sociedad española de Química.* pp. 134-141.
- Justil ,C y Angulo, P. (2014). Evaluación de la Actividad Hipoglicemiante del Extracto Acuoso de *Abuta grandifolia* (Mart.) en Ratas con Diabetes Inducida por Aloxano. Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n2/a06v26n2.pdf>
- Kamboj, A. y Kumar, A. (2011). Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum Conyzoides*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* p. 95. Recuperado de <http://ijppsjournal.com/Vol3Issue1/985.pdf>

- Kawaharada, K., Kawamata, M., Ochiya, T. (2015). Rat embryonic stem cells create new era in development of genetically manipulated rat models. *World J Stem cells*. pp. 1054-1063. doi: 10.4252/wjsc.v7.i7.1054.
- Kollmus, H., Post, R., Brielmeier, M., Fernández, J., Fuchs, H., McKerlie, C. et al. (2012). Structural and functional concepts in current mouse phenotyping and archiving facilities. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. pp. 418-435.
- Kotowaroo et al. (2006). Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible  $\alpha$ -amylase inhibitory effects in vitro. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1839/full>
- Lallana, M. y Lallana, V. (2003). Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal. Edición Digital. pp. 13-14. Recuperado de [http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m\\_didactico/manual\\_practicas/ExtPig\\_bED.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/ExtPig_bED.pdf)
- Maedler, K. (2008). Beta cells in type 2 diabetes a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab*. pp. 408-420.
- Mardones, L., Ormazabal, V., Romo, X., Jaña, C., Binder, P., Peña, E., Vergara, M., Zúñiga, F.A. (2011). The glucose transporter-2 (GLUT2) is a low affinity dehydroascorbic acid transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. pp. 7-12.
- Martín-Zúñiga, J., Orellana-Muriana, J.M., Tur Marí, J. (2009). Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. vol. I /II: 2. Textos Universitarios Ciencias Sanitarias. Madrid: Universidad de Alcalá.
- Meléndez et al. (2007). Diabetes mellitus: aspectos modernos de la problemática. Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina UNAM. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2007/un073f.pdf>
- National Institutes of Health (2009). Tres tipos de diabetes. NIH Medline Plus. Winter pp. 10-1.
- National Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington. 1996. 125 p.p.

- Navarro, M. (2014). Los productos naturales en la innovación farmacológica. Departamento de Farmacología. Universidad de Granada. pp. 41-50.
- Russell, W.M.S., Bursh, R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London Methuen, London.
- Shanmugapriya, K., Saravana, P., Payal, H., Mohammed, P y Bennai W. (2011). A comparative study of antimicrobial potential and phytochemical analysis of *Artocarpus heterophyllus* and *Manilkara zapota* seed extracts. *Journal of Pharmacy Research, India*. pp. 2587-2589. Recuperado de [http://jprsolutions.info/article\\_detail.php?article\\_id=1378](http://jprsolutions.info/article_detail.php?article_id=1378)
- Shayne, G., Crystal, C., Nicolas, A., Bart, S. y Heide, R. (2006). Nonclinical Vehicle Use in Studies by Multiple Routes in Multiple Species. *International Journal of Toxicology*. p. 504. doi: 10.1080/10915810600961531.
- Soejitno, A., Prayudi, P.K. (2011). The prospect of induced pluripotent stem cells for diabetes mellitus treatment. *Ther Adv Endocrinol Metab*. pp. 197-210.
- Sukumar, E., Manickavasagan, A., y Essa, M. (2012). *Natural Products and Their Active Compounds on Disease Prevention*. New York: Nova Science Publishers, Inc. pp 45-70.
- The Burton Goldberg Group (1994). *Medicina alternativa. La guía definitiva*. 2da. ed Future Medicine Publishing Inc. pp. 253-271.
- Varela, L., Horvath, T.L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep*. In press.
- Vásquez et al. (2007). Guía para la atención de personas diabéticas. Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud, Caja Costarricense de Seguro Social. pp. 15-19.
- Wang, C., Guan, Y., & Yang, J. (2010). Cytokines in the Progression of Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. *International Journal of Endocrinology*. Recuperado de <http://doi.org/10.1155/2010/515136>

## ANEXOS

### Anexo 1. Datos tabulados del analisis estadístico ANOVA de dos vías con la prueba de Bonferroni post-hoc.

2way ANOVA Tabular results					
<b>1</b>	Table Analyzed	Data 1			
<b>2</b>					
<b>3</b>	Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
<b>4</b>					
<b>5</b>	Source of Variation	% of total variation	P value		
<b>6</b>	Interaction	10.34	< 0.0001		
<b>7</b>	Time	32.80	< 0.0001		
<b>8</b>	Column Factor	34.75	< 0.0001		
<b>9</b>	Subjects (matching)	12.8023	< 0.0001		
<b>10</b>					
<b>11</b>	Source of Variation	P value summary	Significant?		
<b>12</b>	Interaction	***	Yes		
<b>13</b>	Time	***	Yes		
<b>14</b>	Column Factor	***	Yes		
<b>15</b>	Subjects (matching)	***	Yes		
<b>16</b>					
<b>17</b>	Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
<b>18</b>	Interaction	16	34040	2128	6.643

19	Time	4	108000	27010	84.34
20	Column Factor	4	114500	28620	16.29
21	Subjects (matching)	24	42170	1757	5.486
22	Residual	96	30750	320.3	
23					
24	Number of missing values	0			
25					
26	Bonferroni posttests				
27					
28	Control - vs Glibenclamida				
29	Column Factor	Control -	Glibenclamida	Difference	95% CI of diff.
30	0 min	100.0	100.0	0.0000	-46.10 to 46.10
31	40 min	177.1	118.2	-58.94	-105.0 to -12.84
32	70 min	181.8	112.3	-69.45	-115.5 to -23.35
33	100 min	184.5	96.04	-88.44	-134.5 to -42.34
34	130 min	171.8	85.90	-85.92	-132.0 to -39.82
35					
36	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
37	0 min	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
38	40 min	-58.94	3.949	P < 0.001	***
39	70 min	-69.45	4.653	P < 0.001	***
40	100 min	-88.44	5.925	P < 0.001	***
41	130 min	-85.92	5.756	P < 0.001	***
42					
43	Control - vs Extracto 250				
44	Column Factor	Control -	Extracto 250	Difference	95% CI of diff.

45	0 min	100.0	100.0	0.0000	-46.10 to 46.10
46	40 min	177.1	199.6	22.50	-23.60 to 68.60
47	70 min	181.8	189.9	8.080	-38.02 to 54.18
48	100 min	184.5	180.3	-4.176	-50.28 to 41.92
49	130 min	171.8	156.0	-15.85	-61.95 to 30.25

<b>50</b>					
<b>51</b>	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
<b>52</b>	0 min	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
<b>53</b>	40 min	22.50	1.508	P > 0.05	ns
<b>54</b>	70 min	8.080	0.5413	P > 0.05	ns
<b>55</b>	100 min	-4.176	0.2798	P > 0.05	ns
<b>56</b>	130 min	-15.85	1.062	P > 0.05	ns
<b>57</b>					
<b>58</b>	Control - vs Extracto 500				
<b>59</b>	Column Factor	Control -	Extracto 500	Difference	95% CI of diff.
<b>60</b>	0 min	100.0	100.0	0.0000	-38.03 to 38.03
<b>61</b>	40 min	177.1	175.9	-1.230	-39.26 to 36.80
<b>62</b>	70 min	181.8	144.9	-36.92	-74.94 to 1.108
<b>63</b>	100 min	184.5	141.6	-42.88	-80.91 to -4.855
<b>64</b>	130 min	171.8	144.1	-27.68	-65.70 to 10.35
<b>65</b>					
<b>66</b>	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
<b>67</b>	0 min	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
<b>68</b>	40 min	-1.230	0.1015	P > 0.05	ns
<b>69</b>	70 min	-36.92	3.045	P < 0.05	*
<b>70</b>	100 min	-42.88	3.537	P < 0.01	**
<b>71</b>	130 min	-27.68	2.283	P > 0.05	ns
<b>72</b>					
<b>73</b>	Control - vs Extracto 1000				
<b>74</b>	Column Factor	Control -	Extracto 1000	Difference	95% CI of diff.
<b>75</b>	0 min	100.0	100.0	0.0000	-46.10 to 46.10
<b>76</b>	40 min	177.1	223.4	46.31	0.2109 to 92.41
<b>77</b>	70 min	181.8	211.6	29.81	-16.29 to 75.91
<b>78</b>	100 min	184.5	195.4	10.95	-35.15 to 57.05
<b>79</b>	130 min	171.8	186.4	14.58	-31.52 to 60.68
<b>80</b>					
<b>81</b>	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
<b>82</b>	0 min	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
<b>83</b>	40 min	46.31	3.103	P < 0.05	*

<b>84</b>	70 min	29.81	1.997	P > 0.05	ns
<b>85</b>	100 min	10.95	0.7337	P > 0.05	ns
<b>86</b>	130 min	14.58	0.9766	P > 0.05	ns