

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE FARMACIA



TEMA:

Evaluación moduladora de glicemia de extractos acuosos de *Cnidocolus aconitifolius* sobre diabetes inducida en ratones cepa *Balb-C*. Marzo-Octubre 2017.

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

LICENCIADO QUÍMICO-FARMACÉUTICO

AUTORES:

Br. Tinoco Guilberth Joelys Pastora.

Br. Yuritzza Vidaurre María Bertha.

TUTOR:

Lic. Kelvin José Núñez Martínez.

¡A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD!

LEÓN, OCTUBRE DEL 2017.



DEDICATORIA

Primeramente, dedicamos nuestro trabajo a Dios Padre que nos regala la sabiduría, inteligencia y paciencia, para concluir satisfactoriamente nuestro proyecto.

Lo dedicamos especialmente a nuestros Padres, que nos han brindado apoyo, cariño, amor, comprensión y fortaleza, en el transcurso y desarrollo del mismo, nos han ayudado día a día, en la lucha por la culminación de nuestra meta profesional, a ellos, con mucho cariño y amor.



AGRADECIMIENTO

A Dios:

Por darnos el don de la vida y todas las bendiciones que nos ha regalado para hoy lograr culminar nuestra profesión.

A nuestros Padres:

Con mucho cariño, por su apoyo incondicional en el transcurso de nuestros estudios y por no perder la Fe en nosotras en ésta última etapa para culminar nuestros estudios universitarios.

A nuestro Tutor:

Lic. Kelvin José Núñez Martínez, por guiarnos, por su paciencia, dedicación y transmitirnos sus conocimientos, para completar satisfactoriamente ésta investigación.

A los colaboradores del Bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria:

Lic. Lady Mejía, Lic. Violeta Bravo y su equipo, por su apoyo incondicional en la parte experimental, para la correcta manipulación, administración de los extractos y la toma de muestras de los ratones de laboratorio.

Al Dr. Byron Flores profesor de bioestadística de la escuela de Medicina Veterinaria:

Por su motivación y cooperación en la investigación, al regalarnos de su tiempo en la capacitación de la mejor presentación de los resultados.

A todos los que de una u otra manera cooperaron con ésta investigación.



INDICE.

Contenido.	Pág.
I. Introducción.....	1
II. Planteamiento del problema.....	4
III. Objetivos.....	5
IV. Marco Teórico	
1. Diabetes Mellitus.....	6
1.1. Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	7
2. Control y Regulación de la Glucosa en el Organismo.....	9
3. Tratamientos Farmacológicos usados en la Diabetes Mellitus.....	9
3.1. Glibenclamida.....	10
4. Tratamiento Fito-terapéutico usados en el control de Diabetes Mellitus.....	10
5. Chaya (<i>Cnidocolus aconitifolius</i>).....	12
5.1. Denominación y Sinonimias.....	12
5.2. Clasificación taxonómica.....	12
5.3. Descripción Botánica.....	12
5.4. Hábitat.....	13
5.5. Propiedades Medicinales.....	13
5.6. Fito-química	13
5.7. Uso de <i>Cnidocolus aconitifolius</i> en la Diabetes.....	14
6. Narciso (<i>Nerium oleander</i>).....	15
6.1. Denominación	15
6.2. Clasificación taxonómica.....	15
6.3. Descripción botánica.....	15
6.4. Hábitat.....	15
6.5. Fitoquímica de <i>Nerium oleander</i>	16
7. Animales de Experimentación.....	16
7.1. Características de Ratones de la Cepa <i>Balb-C</i>	16
7.2. Ventajas del Uso de Ratones.....	17
7.3. Desventajas del Uso de Ratones.....	17
7.4. Modelo de Evaluación Usado de Diabetes Mellitus en Ratones.....	17



7.5.	Diabetes en Ratones de Laboratorio.....	18
7.6.	Trastornos de la Biosíntesis y Secreción de Insulina.....	19
7.7.	Inducción Química a la Diabetes.....	19
V.	Hipótesis.....	21
VI.	Material y Método.....	22
VII.	Resultados y Análisis.....	37
VIII.	Conclusión.....	45
IX.	Recomendaciones.....	46
X.	Referencias Bibliográficas.....	47
XI.	Cronograma.....	53
Anexos.....		56



I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), calcula que actualmente dos terceras partes de la población mundial -4,000 millones de personas-recurren al uso de plantas medicinales, esto ha incrementado su valor para la industria farmacéutica en los mercados internacionales en 300 billones de dólares anuales e igualmente se ha visto un aumento del 15% de productos a partir dichas plantas, calculándose que un 30% de los fármacos sintéticos se derivan de plantas medicinales ⁽²⁴⁾, muestra de esto es *Sativex*, *Marinol* y *Epidiolex* primeros medicamentos a base de *Cannabis sativa* autorizado por la FDA. ⁽²⁰⁾

Lo anterior evidencia que la Etnobotánica, la Fitoterapia y la Fitoquímica, son herramientas indispensables para la validación científica en el uso de medicinas complementarias. Hoy en día, han sido registrados más de 400 tratamientos naturales a base de plantas para la diabetes mellitus, pero solo aproximadamente un 30 % de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia. ⁽²³⁾

Los indicadores Básicos de la Situación de la Salud de las Américas del 2016 elaborado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (oficina regional de las Américas), indica que la tasa de mortalidad por diabetes mellitus para el 2014 en Nicaragua fue de 58.1 en mujeres y 53.5 en hombres, para un total de 56.0; con un indicador de riesgo de 9.2% en hombres y 11.0% en mujeres, ajustadas por cada 100.000 hab. ⁽²²⁾

Estos datos son un indicador alarmante, que induce la necesidad de evidenciar nuevos tratamientos naturales alternativos, para hacer frente a patologías como diabetes mellitus, enfermedad que perjudica a la población nacional y mundial. Estos tratamientos a base de plantas medicinales para enfermedades que nos aquejan, gozan de gran aceptación por razones como: accesibilidad y asociatividad en los países en desarrollo como Nicaragua ⁽²¹⁾.



De acuerdo con *Global Industry Analysis*, se estima que el mercado mundial de hierbas llegará a \$ 107 mil millones a finales de 2017. (29)

La Diabetes Mellitus está incrementando su incidencia en Latino América en similares proporciones que el resto del mundo. La prevalencia de Diabetes para todos los grupos en el mundo se ha estimado entre 2.8% en el 2000 y 4.4% en el 2030. El número total de personas con Diabetes se proyectó de 171 millones en el 2000 a 366 millones en el 2030. (7)

El incremento a nivel mundial indica la necesidad urgente de buscar alternativas para prevenir y mejorar la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad. En Nicaragua se cuenta con una diversidad de plantas que son empleadas con fines terapéuticos entre las cuales se encuentra la Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), por lo que es importante contar con estudios científicos que evalúen la *actividad moduladora de glicemia* de esta planta, en un modelo de diabetes experimental inducida químicamente en ratones de la cepa *Balb-C*.

Valenzuela Soto Ramón; et al. (2015) evaluaron la capacidad hipoglucemiante y toxicidad de infusiones de *Cnidoscolus aconitifolius* en ratas inducidas a la diabetes con estreptozocina 45mg/kg de peso. Se concluyó que la infusión de hojas de chaya tuvo mayor efecto hipoglicemiante que la glibenclamida lo cual es atribuido al contenido de agentes fitoquímicos hipoglicemiantes que posee además fue considerada no tóxica y segura para su consumo. (18)

Luna Iñiguez Verónica Magaly (2014), evaluó la actividad hipoglucemiante de un jarabe de extracto acuoso de *Cnidoscolus aconitifolius* en ratas *wistar* hembras divididas en 5 grupos de estudio. Según lo obtenido se concluyó que el jarabe de chaya a dosis de 500 y 1000mg/kg de peso corporal no demostró poseer efecto hipoglucemiante cuando se administra una solución de glucosa como agente inductor de la hiperglicemia. (25)



Palos Suárez Giovanna María del Rosario (2007), evaluó actividad anti oxidante de *Cnidoscolus aconitifolius* en ratas macho *wistar* inducidas a la diabetes mediante 45mg/kg de peso de estreptozocina, se eligieron ratas con glicemia superior a 180mg/dl. Se administró té, licuado y extracto de hojas frescas, determinando niveles de glucosa en aparato versamaxTM, observando un efecto antihiper glucémico y atenuación de los efectos severos de la diabetes (17).

López Martínez Cecilia (2007), evaluó la acción de *Cnidoscolus aconitifolius* sobre la cascada de transducción de señales de la insulina en ratas macho *wistar* y *sprague dawley*, inducidas a la diabetes con estreptozocina 45mg/kg de peso. Se comparó efecto hipoglucemiante del extracto de chaya a diferentes concentraciones y del extracto con Glibenclamida, concluyendo que solo muestra efecto en tiempos cortos y bajo condiciones de ayuno. (27)

La presente investigación tuvo como base la falta de evidencia que permita validar el uso de la especie indicada y la poca información nacional existente de la especie con respecto al uso popular y tradicional, ya que según testimonios es de amplio uso en el norte de nuestro país (Matiguás-Matagalpa), así como evidenciar los efectos sobre los valores de glicemia tras la administración de extractos acuosos de la especie *Cnidoscolus aconitifolius* (Sinonimia: *Cnidoscolus chayamansa*) conocida comúnmente con el nombre de insulina, chaya o espinaca, dado su uso etnobotánico en la zona norte del país como hipoglucemiante, se evaluó en sangre obtenida de ratones *Balb-C*, la concentración de extracto fue administrada a dos niveles con un máximo de 300 µg/0.3ml equivalente a 96.77 µg/kg peso, los resultados obtenidos evidenciaron que los extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius* disminuyen los niveles de glicemia en sangre en los ratones utilizados. Esta información se puede utilizar como base para el uso de *Cnidoscolus aconitifolius* como un tratamiento alternativo o complementario en personas con este padecimiento principalmente en el inicio de la diabetes.



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius* (*Cnidoscolus chayamansa*) administrados en ratones de cepa *Balb-C* con diabetes inducida, modulan los niveles de glicemia; Marzo-Octubre, 2017?



III. OBJETIVOS

General:

- ✓ Evaluar la actividad moduladora de glicemia de extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius* administrados a ratones cepa *Balb-C* con diabetes inducida.

Específicos:

- ✓ Evidenciar la dosis-respuesta con mayor incidencia en la regulación de glicemia en ratones *Balb-C* con diabetes inducida, tras la administración de extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius*.
- ✓ Tazar la respuesta moduladora de glicemia de extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius* administrados en ratones *Balb-C* versus Solución de Referencia (Glibenclamida).
- ✓ Calcular el porcentaje de eficacia de los extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius*, determinando el más eficaz versus Solución de Referencia (Glibenclamida).



IV. MARCO TEÓRICO

1. Diabetes Mellitus (DM)

La Diabetes Mellitus (DM), es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. La etiología de la DM puede ser muy diversa, pero conlleva inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, de la sensibilidad a la acción de la hormona, o de ambas en algún momento de su historia natural. La prevalencia de la DM, sus complicaciones específicas y la presencia de otras entidades que suelen acompañarla hacen de la enfermedad, uno de los principales problemas socio-sanitarios en la actualidad.

El crecimiento exponencial de la información disponible sobre la historia natural de la DM, de su etiología y del conocimiento de la fisiopatología de sus complicaciones crónicas ha obligado a que, en los últimos años, se revisaran los criterios diagnósticos de esta entidad y se reclasificaran los diferentes procesos que en ella se incluyen. La revisión de los criterios diagnósticos y de la clasificación de la enfermedad se llevó a cabo en 1997 y 1998 en sendos documentos consensuados por los comités de expertos de la *American Diabetes Association* y de la Organización Mundial de la Salud.

La clarificación de los criterios diagnósticos y la mejor clasificación de cada una de las personas afectadas por la DM, deben permitir en el futuro elegir mejor entre las diferentes opciones de tratamiento y mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Según datos de la OMS del año 2000, al menos 171 millones de personas en el mundo padecen diabetes, y esta cifra será probablemente el doble en 2030. ⁽¹⁾



1.1 Clasificación de la Diabetes Mellitus (DM)

Tabla 1: Clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías de intolerancia a la glucosa por el Grupo Nacional de Datos de Diabetes (1979).

Diabetes Mellitus(DM)
- DM insulino dependiente (tipo 1)
- DM no insulino dependiente (tipo 2)
<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo en obesos. • Subtipo en no obesos.
- DM gestacional
- Otros tipos de diabetes asociados a otras enfermedades o síndromes.
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades pancreáticas. • Trastornos hormonales. • Secundaria a medicamentos o sustancias químicas. • Anormalidades de la insulina o sus receptores. • Algunos síndromes genéticos.
- Otras categorías de intolerancia a la glucosa
<ul style="list-style-type: none"> • Tolerancia anormal a la glucosa. • Anomalía previa a la tolerancia a la glucosa. • Anomalía potencial de la tolerancia a la glucosa.

Adaptado de: National Diabetes Data Group, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. Diabetes 1979 28: 1039-1057. (9)



Tabla 2: Diferencias entre la Diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID) Diabetes Mellitus no Insulinodependiente (DMNID).

Diagnóstico	DMID	DMNID
Edad	Habitualmente antes de 30 años.	Habitualmente después de los 30 años.
Sexo	Predominio en varones (niños).	Predominio en mujeres.
Peso corporal	A menudo, individuo delgado.	A menudo, individuo obeso.
Cetonuria	Presente.	Ausente.
Dependencia de insulina	Sí.	No.
Concordancia entre hermanos gemelos	<50%.	100%.
Prevalencia	Alrededor de 4/1.000 hab.	Alrededor de 40/1.000 hab.
Islotes	Insulitis, reducción de células β .	Hialinosis, células β presentes.
Secreción insulina	Deficiente.	Presente.
ICA/IAA	Presentes en el momento del diagnóstico (70-80%).	Ausentes.
Asociación con endocrinopatías autoinmunes	Sí.	No.

IAA: anticuerpos frente a insulina, ICA: anticuerpos anti-islotes de células pancreáticas



2. Control y regulación de la glucosa en el organismo

El control y la regulación de la glucosa en el organismo dependen sustancialmente de la interacción entre las hormonas pancreáticas glucagón e insulina secretadas por las células α y β , respectivamente; sus acciones son antagónicas a nivel del metabolismo energético y son claves para mantener un equilibrio de oferta y demanda, en especial de la glucosa. El glucagón aumenta sus niveles sanguíneos y la insulina los disminuye al ayudar a ingresar esta molécula al interior de las células. La insulina tiene como tejidos efectores principales al músculo estriado, el hígado y el tejido graso, ejerciendo acciones anabolizantes de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno o utilización de la misma en la fosforilación oxidativa. El glucagón, por el contrario, actúa activando principalmente la glucogenólisis y la gluconeogénesis en asocio con el cortisol, una alteración en la producción de estas dos hormonas (exceso de glucagón y déficit de insulina) puede generar diabetes mellitus. ⁽¹⁵⁾

3. Tratamientos farmacológicos usados en Diabetes Mellitus

La hiperglucemia persistente, es el fenómeno central en todas las formas de DM. El tratamiento debe estar encaminado a descender los niveles de glicemia a valores próximos a la normalidad siempre que sea posible. Con ello se persigue:

- ✓ Evitar descompensaciones agudas, cetoacidosis o síndrome hiperosmolar.
- ✓ Aliviar los síntomas cardinales (poliuria / polidipsia / astenia / pérdida de peso con polifagia).
- ✓ Minimizar el riesgo de desarrollo o progresión de retinopatía, nefropatía y/o neuropatía diabética.
- ✓ Evitar las hipoglucemias.
- ✓ Mejorar el perfil lipídico.
- ✓ Disminuir la mortalidad.

Para el tratamiento farmacológico de la DM insulino dependiente se dispone de insulina en sus distintas presentaciones y para el tratamiento farmacológico de DM no insulino dependiente se dispone de antidiabéticos orales. De estos últimos actualmente en el mercado se comercializan sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la alfa-glucosidasa, la repaglinida y, en un futuro próximo, las tiazolidinedionas.



3.1 Glibenclamida

Es un fármaco de la familia de las sulfonilureas, su mecanismo de acción primario es estimular la secreción de insulina por la célula beta pancreática, a través de su inhibición a un canal potasio-dependiente de ATP, la inhibición del conducto de KATP causa despolarización de la membrana celular y una serie de eventos que conducen a la secreción de insulina. Las sulfonilureas también pueden reducir la eliminación hepática de insulina, con lo que se incrementa aún más la concentración plasmática de esta hormona. Este fármaco posee una eliminación renal del 50%, tiene un efecto de 10 a 24 horas y se utiliza en dosis diaria de 1.5 a 20 mg. ⁽¹⁵⁾

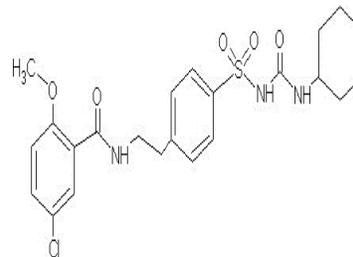


Fig. 1: Estructura química de Glibenclamida

4. Tratamientos Fito-terapéuticos usados en el control de la DM

La Diabetes se ha convertido en un problema de salud pública en muchos países del mundo (desarrollados y subdesarrollados). El cuidado de la diabetes, en especial de la DM tipo 1, tiene que ver con la disponibilidad de insulina, un fármaco muy caro para países de pocos recursos económicos y muchos pacientes diabéticos tienen dificultades para obtener suministros, y como alternativa recurren al uso de plantas/preparaciones herbolarias, práctica que se remonta a tiempos prehistóricos.

El empleo de plantas medicinales está aumentando de forma exponencial tanto para mejorar el estado de salud general como para tratar enfermedades crónicas. En el contexto de este crecimiento, existe una gran incertidumbre sobre la eficacia y seguridad de dichas plantas medicinales. Actualmente existen muy pocos ensayos aleatorizados que evalúen dicha eficacia y seguridad y, normalmente, tienen deficiencias metodológicas y poco tamaño muestral para poder obtener conclusiones fiables. ⁽⁸⁾

Dentro de las plantas que tienen base científica utilizadas en Nicaragua para el tratamiento de la Diabetes Mellitus están las siguientes:



Tabla 3: Plantas Medicinales con propiedades antidiabéticas encontradas en Nicaragua.

Nombre Científico	Referencia Bibliográfica
Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	Nerurkar Pratibba. V, Hwang Phoebe, Saksa Erik. Anti-Diabetic Potential of Noni: The Yin and the Yang
Canela (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Verspohl E, Bauer K, Neddermann E. Antidiabetic effect of <i>Cinnamomum cassia</i> and <i>Cinnamomum zeylanicum</i> in vivo and in vitro
Guarumo (<i>Cecropia peltata</i>)	Nicasio P, Aguilar Santamaría L, Aranda E, Ortiz S, González M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two <i>Cecropia species</i>
Almendra (<i>Terminalia catappa</i>)	Nagappa An, Thakurdesai PA, Singh J. Antidiabetic activity of <i>Terminalia catappa</i> linn fruits
Cebolla (<i>Allium cepum</i>)	Kelkar SM, Kaklij GS, Bapat VA. Determination of antidiabetic activity in <i>Allium cepa</i> (onion) tissue cultures.
Marango (<i>Moringa oleifera</i>)	Gupta R, Mathur M, Bajaj VK, Katariya P, Yadav S, Kamal R, Gupta RS. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of <i>Moringa oleifera</i> in experimental diabetes
Marañón (<i>Anacardium occidentale</i>)	Lawrence A, Olantunji, John I, Okwusidi, Ayodele O. Soladoye. Antidiabetic effect of <i>Anacardium Occidentale</i> . Stem-Bark in Fructose-Diabetic rats
Nim (<i>Azadirachta indica</i>)	Anggit Listyacahyani Sunarwidhi, Sudarsono Sudarsono, Agung Endro Nugroho. Hypoglycemic Effect of Combination of <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. And <i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr. Ethanollic Extracts Standardized by Rutin and Quercetin in Alloxan-induced Hyperglycemic Rats.
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	A Sudha Madhuri and Rajalakshmi Mohanvelu. Evaluation of Antidiabetic Activity of Aqueous Extracto of <i>Mangifera Indica</i> in Alloxan Induced Diabetic Rats.
Banano (<i>Musa sapientum</i>)	Dhanabal SP, Sureshkumar M, Suresh B. Hypoglycemic effect of ethanollic extracto of <i>Musa sapientum</i> on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential
Sardinillo (<i>Tecoma stans</i>)	Elosh G, Palanivel V and Senthil Kumar KL. Evaluation of Anti-diabetic Activity of <i>Tecoma stans</i> Stem Extract in Induced Diabetic Albino Rats.

(11) (3)



5. Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*)

5.1 Denominación y Sinonimias

- ✓ **Nombre científico:** *Cnidoscolus aconitifolius*.
- ✓ **Denominación:** *Cnidoscolus aconitifolius*.
- ✓ **Sinonimias:** *Cnidoscolus chayamansa*.
- ✓ **Nombres comunes:** Insulina, chaya y árbol espinaca.



Fig 2: Hojas de *Cnidoscolus aconitifolius*.

5.2 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae
 División: Magnoliophyta
 Clase: Magnoliopsida
 Orden: Malpighiales
 Familia: Euphorciaceae
 Subfamilia: Crotonoideae
 Tribu: Manihoteae
 Género: *Cnidoscolus*
 Especie: *Cnidoscolus aconitifolius*



Fig 3: Planta de *Cnidoscolus aconitifolius*.

5.3 Descripción Botánica

La chaya es un arbusto que generalmente mide de 2-3 metros. Posee un tronco macizo y pulposo lo que hace que su madera se rompa y corra fácilmente, además en su superficie se divisan anillos. Su corteza tiene una coloración verde cuando es joven y a medida que crece cambia a blanco. Los pecíolos llegan a tener de 10 a 20 cm de largo. Sus hojas (folíolos) por lo general alargadas 10 a 20 cm de forma variable, algo gruesas y carnosas cuando están frescas, los lóbulos agudos y acuminados, de estipulas lanceoladas.



Las hojas son simples, alternas, de poca pronunciación trilobada, pecíolo largo con 2 glándulas ovoides por la base del limbo; los lóbulos son anchos con bordes enteros u ondulado–dentado y ápices acuminados. En algunas variedades pueden aparecer vellosidades irritantes en las hojas. Se la considera una planta de crecimiento rápido. Al ser cortadas emanan un látex de color blanco.



Fig 4: Látex de *Cnidoscolus aconitifolius*.

5.4 Hábitat

Crece en áreas con sequía ocasional, en un amplio rango de suelos y climas cálidos y lluviosos. Es sensible al frío y se puede plantar en cualquier época del año. (6)

5.5 Propiedades medicinales

Es tan grande el abanico de enfermedades que esta planta puede prevenir y atenuar. Por las propiedades medicinales que se le atribuye a la *Chaya* se la puede utilizar para el tratamiento de enfermedades como: La diabetes, hipercolesterolemias, ayuda a reducir peso, hipertensión arterial, como preventiva en la anemia, recomendada a todas las afecciones que se producen por la deficiencia de vitamina A y C, afecciones del sistema inmunológico y cáncer. (5)



Fig 5: Tallo adulto de *Cnidoscolus aconitifolius*

5.6 Fitoquímica de *Cnidoscolus aconitifolius*

La investigación química del género es escasa y a la fecha solo se han investigado algunas especies, por ejemplo, en el extracto EtOH de las hojas de *C. aconitifolius* se reportan fenoles, saponinas, y glucósidos cardiacos.

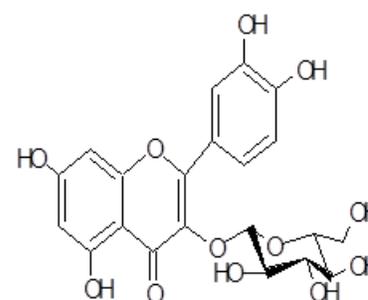


Fig 6: Estructura química de Quercetina-3-O-glucósido.



También se ha descrito la presencia de ácidos grasos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido oleico, entre otros), esteroides (β -sitosterol), triterpenos (β y α -amirina), alcaloides, flavonoides kaempferol-3-O-glucósido y quercetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido, amentoflavona (diapigenina), astragalina, dihidromirecetina y glucósidos cianogénicos, antraquinonas, terpenos (taraxasterona), taninos, tiamina, niacina, riboflavina, vitamina A y C. El análisis proximal de las hojas ha permitido determinar componentes como sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre y fierro, por lo que la proponen como alimento complementario con alto valor nutritivo. (13)

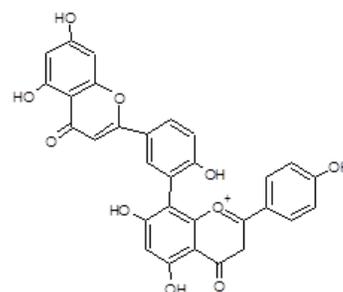


Fig 7: Estructura química de Amentoflavona.

5.7 Uso de *Cnidoscolus aconitifolius* en la Diabetes Mellitus

Cnidoscolus aconitifolius es la especie más investigada de este género desde el punto de vista químico y biológico, destacando entre ellas la presencia de flavonoides, triterpenos y esteroides principalmente. Respecto a sus actividades biológicas descritas destaca la actividad hipoglucemiante, hepatoprotectora y cardioprotectora; sin embargo, a la fecha no se han descrito los compuestos responsables de estas actividades biológicas; de manera general algunos autores se lo atribuyen a la presencia de flavonoides. (13)



6. Narciso (*Nerium oleander*)

Especie vegetal utilizada para la inducción bioquímica de diabetes en los animales de experimentación.

6.1 Denominación

- ✓ **Nombre científico:** *Nerium oleander*.
- ✓ **Nombre común:** Adelfa, Laurel de flor, Rosa laurel, Trinitaria, Narciso.

6.2 Clasificación Taxonómica:

Reino: Plantae
 División: Magnoliophyta
 Clase: Magnolipsida
 Orden: Gentinales
 Familia: Apocynaceae
 Subfamilia: Apocynoideae
 Tribu: Wrightieae
 Género: *Nerium*
 Especie: *Nerium oleander* ⁽³⁾



Fig 8: Planta *Nerium oleander* (narciso)

6.3 Descripción botánica:

Arbusto perennifolio de hasta 6 m de altura, de crecimiento rápido. Hojas lanceoladas y enteras, muy coriáceas, de 6-12 cm, verde grisáceas. Flores de 3-4 cm de diámetro, generalmente de color rosa, aunque también blancas, rojas y amarillas. Normalmente florece en primavera y continúa la floración hasta la llegada del otoño.

6.4 Hábitat

Aunque originariamente se encontraba en una zona que cubría la cuenca del mar Mediterráneo hasta China, hoy en día ha sido introducida en muchas zonas de clima templado árido, donde es frecuente encontrarla en jardines, como seto y como mediana de separación de espacios. Se adapta a ambientes secos. Tolerancia heladas, pero no fuertes. Resiste el calor, el viento, la cal, la sal del suelo y es resistente a la sequía. ⁽³⁾



6.5 Fitoquímica de *Nerium oleander*

La investigación química de la especie ha reportado: glucósidos cardiotónicos como desacetilodeandrina, oleandrina, neriina, foleandrina, gitoxinina y rosagenina, flavonoides como quercetina, quercitrina y rutina, diferentes ácidos como Ácido betulínico, Ácido cáprico, Ácido caproico, Ácido láurico, Ácido oleico, Ácido palmítico, Ácido linoleico, Ácido esteárico y Ácido ursólico, el metabolito secundario con la actividad hiperglucemiante no se ha establecido concretamente pero se ha demostrado en extractos hidroalcohólicos de la especie vegetal. (2)(18)(28)

7. Animales de experimentación

7.1 Características de Ratones de la Cepa *Balb-C*

- ✓ Se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales.
- ✓ El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos, es por ello que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan.
- ✓ Su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social.
- ✓ Su visión es muy pobre y no pueden percibir los colores.
- ✓ Poseen glándula de Harder, cuando el ratón está en estrés, excreta en la zona periocular una sustancia de color marrón llamada porfirina.
- ✓ El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien desarrollado. Generalmente, son muy dóciles a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes.



Fig 9: Ratones de experimentación.



- ✓ Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología.
- ✓ El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola; el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30 gr. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactancia.
- ✓ Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas.
- ✓ Los machos de algunas cepas comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan establecido al destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas. ⁽⁹⁾

7.2 Ventajas del uso de ratones

- ✓ Eficiencia reproductiva.
- ✓ Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.
- ✓ Corto tiempo de generación.
- ✓ De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- ✓ Bajos costo de manutención.
- ✓ Cepa definida.
- ✓ Diversidad de características específicas que sirven como modelo.

7.3 Desventajas del uso de ratones

- ✓ Dificultad en la recolección de material biológico.
- ✓ Dificultad la administración de drogas.
- ✓ Dificultad en las técnicas quirúrgicas. ⁽¹¹⁾

7.4 Modelos de evaluación usado de Diabetes Mellitus en ratones

- ✓ Niveles normales de glicemia en sangre 43.0 – 152.7mg/dl. ⁽¹⁵⁾



7.5 Diabetes en ratones de laboratorio

En general, los síndromes hiperglucémicos en roedores de laboratorio pueden ser subdivididos en tres grupos. En el primero, la obesidad es la característica predominante y la hiperglucemia severa no se presenta. En el segundo, la obesidad y la hiperglucemia se encuentran frecuentemente asociadas; sin embargo, no se observa deficiencia de insulina, a pesar de la pérdida de peso y la cetoacidosis. El tercer grupo comprende animales en los que presentan la diabetes con una evidente deficiencia de insulina, aunque no padece cetoacidosis.

Los síndromes de hiperglucemia, hiperinsulinemia y obesidad son comunes en roedores de laboratorio. En general, tienden a ser obesos y presentan reversión espontánea de su diabetes.

Los receptores de insulina están disminuidos en las células renales, hepáticas y adiposas, así como en los linfocitos. En estas cepas de ratones el síndrome diabético es trifásico. La primera fase se caracteriza por hiperglucemia, hiperinsulinemia y aumento en peso. En la segunda, hay mejoría en glucosa y decremento de la insulina plasmática. En la fase final, estática, los animales permanecen obesos, pero normoglucémicos y normoinsulinémicos.

El patrón de liberación de insulina varía con la edad y el grado de tolerancia a la glucosa. En animales jóvenes, la cinética en la liberación de la insulina es normal y manifiesta una elevación rápida de la fase inicial, seguida por una fase secundaria hiperglucémica bien definida. La primera alteración que se detecta es la hiperinsulinemia, acompañada por hipoglucemia ligera. Alrededor de las cuatro semanas de edad, los animales están hiperglucémicos, hiperinsulinémicos, hiperfágicos y obesos, pero conforme avanza la edad se vuelve hiperglucémicos e hipoinsulinémicos, pierden peso y casi siempre mueren.



7.6 Trastornos de la biosíntesis y secreción de insulina

Varias alteraciones en el ambiente de las células β , contribuyen a un defecto en la secreción de insulina, como sucede en la exposición crónica a la hiperglucemia que produce toxicidad a la glucosa en estas células, lo cual ha sido demostrado en modelos in vivo en los que han sido inducidas, en neonatos tratados con STZ o infusiones de glucosa.

La resistencia a la insulina ha sido observada en todos los síndromes obesidad/diabetes y en la mayoría de los no obesos. El grado en que se manifiesta es muy variable en el mismo síndrome y en los distintos tejidos.

En conclusión, los modelos animales de DM2 contribuyen al estudio de los mecanismos que conducen a la presentación de esta enfermedad, acompañada de severa o moderada hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, otros síndromes relacionados con estas alteraciones, que aparecen de forma espontánea o que se pueden inducir experimentalmente mediante técnicas químicas, quirúrgicas, tratamiento hormonal, manipulación genética o bajo la influencia de factores ambientales como la dieta, y en ellos también se pueden observar complicaciones propias de este trastorno.

Aunque no son un reflejo exacto de la diabetes que padece el hombre, en ellos es posible explorar nuevos tratamientos y la prevención, lo cual adquiere una gran importancia para los investigadores que se dedican al estudio de esta especialidad de la endocrinología. ⁽¹²⁾

7.7 Inducción bioquímica a la Diabetes

El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético. Existen varias clases de agentes químicos. Los primeros son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células β del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina.



El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre células β pero no las destruyen. Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia se produce diabetes.

Los agentes más usados son el aloxano y la estreptozotocina, éstos compuestos en dosis diabéticas actúan específicamente sobre las células del páncreas.

Sin embargo, al no lograr poseer estos químicos de manera accesible y luego de investigación, se indujo la diabetes con extracto hidroalcohólico de *Nerium oleander* conocido comúnmente en Nicaragua como Narciso.



V. HIPÓTESIS

H₀ (Hipótesis Nula) $\sigma^2 = \sigma^2$

La especie *Cnidocolus aconitifolius*, No disminuye significativamente ($\alpha \leq 0.05$) los valores de glicemia en ratones *Balb-C* y No podría ser utilizada en el tratamiento de la Diabetes Mellitus.

H₁ (Hipótesis Alternativa) $\sigma^2 \neq \sigma^2$

La especie *Cnidocolus aconitifolius*, disminuye significativamente ($\alpha \geq 0.05$) los valores de glicemia en ratones *Balb-C* y podría ser utilizada en el tratamiento de la Diabetes Mellitus.



VI. MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio:

Experimental de corte transversal.

Área de estudio:

Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-León. Bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria del Campus Agropecuario de la UNAN-León.

Universo:

Doce especies medicinales existentes en Nicaragua con propiedades hipoglucemiantes: Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), Marango (*Moringa oleifera*), Noni (*Morinda citrifolia*), Guarumo (*Cecropia peltata*), Almendra (*Terminalia catappa*), Canela (*Cinnamomun cassia*), Cebolla (*Allium cepum*), Marañón (*Anacardium occidentale*), Nim (*Azadirachta indica*), Mango (*Mangifera indica*), Banano (*Musa sapientum*), Sardinillo (*Tecoma stans*).

Muestra:

Una especie medicinal existente en Nicaragua reportada etnomédicamente con propiedades hipoglucemiantes *Cnidoscolus aconitifolius*.

Unidad de análisis:

Glicemia

Criterios de inclusión:

- ✓ Hojas de *Cnidoscolus aconitifolius* desarrolladas 10-20 cm, no ennegrecidas, no dañadas por insectos, no conteniendo insectos, No conteniendo moho.
- ✓ Ratones *Balb-C* de 5 semanas, peso de 26g-33g, talla 12cm-15cm, sanos, de una sola camada, ambos sexos.



Criterios de exclusión:

- ✓ Hojas de *Cnidocolus aconitifolius* no desarrolladas menores a 10cm, ennegrecidas, dañadas por insectos, conteniendo insectos, con moho.
- ✓ Ratones mayores o menores a 5 semanas, pesos inferiores a 26g o superior a 33g, talla inferior a 12cm, ratones de diferentes camadas.

Variables de estudio:

- ✓ Concentración
- ✓ Dosis
- ✓ Glicemia
- ✓ Eficacia

Cruce de Variables:

- ✓ Concentración (Extracto acuoso de *C. aconitifolius*) vs Glicemia.
- ✓ Concentración (Solución de referencia (Glibenclamida)) vs Glicemia.
- ✓ Eficacia de los extractos acuosos de *C. aconitifolius* vs Eficacia de Glibenclamida.



Tabla 4: Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de Variable	Escala	Definición Conceptual	Indicadores	Escala de Medición
Concentración	Independiente Cuantitativa	Ordinal	Cantidad de principio activo contenido en determinado peso o volumen.	Cantidad	mg/ml
Dosis	Dependiente Cuantitativa	Ordinal	Contenido del principio activo de un medicamento expresado en cantidad por unidad de toma, de volumen o peso en estrecha relación con la presentación que se suministrará de una sola vez.	Volumen	ml
Glicemia	Dependiente Cuantitativa	Ordinal	Es la cantidad de glucosa en sangre.	Unidad	mg/dl
Eficacia	Dependiente Cuantitativa	Ordinal	Es la capacidad de lograr el efecto que se desea o espera. Grado en que determinada intervención origina resultado beneficioso en algunas condiciones, medido en el contexto de un ensayo clínico controlado.	Normoglucémico Hipoglucémico Hiperglucémico	%



Procedimiento:

I. Documentación de la investigación

La idea de esta investigación surgió debido al uso etnobotánico de la planta *Cnidocolus aconitifolius* (Chaya) en Matiguás-Matagalpa; la cual es utilizada por la población para combatir diferentes enfermedades, su uso más llamativo, es para controlar síntomas de la diabetes, principalmente control de la hiperglicemia. Siendo usada y recomendada por parte de la población del sector urbano y sector rural (predominando este sector). Con esta investigación se pretende validar in vivo las propiedades hipoglucemiantes de la planta y el beneficio de su uso en pacientes crónicos, asistidos en atención primaria en salud de la población nicaragüense.

II. Recolección y preservación de la muestra

- El lugar de recolección fue Matiguás-Matagalpa, hora de recolección 10:30 am.
- Con tijeras de podar limpias, se cortaron las hojas por el pecíolo, siguiendo los criterios de inclusión.
- Se depositaron en papel periódico para impregnarse en alcohol para preservación y asegurar su buen estado.
- El material se conservó por tres días previo a su secado.

III. Secado

- Se retira el material vegetal de las bolsas, se retira el periódico impregnado en alcohol
- Se enciende el horno y se controla la temperatura hasta valor constante entre 45-50°C.
- En el papel periódico se colocan las hojas preservadas de manera que el calor se distribuya uniformemente por cada una.
- Se colocan en las bandejas del horno y se cierra.



Fig 10: Horno GCA Gravity Convection Oven modelo 2



- Se extraen las bandejas del horno cada media hora para cambiar de posición el material (la bandeja de arriba hacia abajo y viceversa)
- Este procedimiento se realizó hasta obtener el secado deseado entre 7-14 % en peso.
- El peso del material vegetal fresco utilizado fue de 1,241.74 g, el peso seco fue de 182.4 g

IV. Trituración

Previo a la utilización del molino (Laboratory Mill. Model 4), se procede a la limpieza del mismo de la manera siguiente:

- Con los desatornilladores y llave de ajuste se desmontó el equipo con el mayor cuidado posible para evitar dañar el sistema eléctrico.
- Se desmontaron y afilaron las cuchillas.
- Con brocha y paños de limpieza se eliminó el residuo contenido de otras plantas anteriormente trituradas.
- Al montar el equipo nuevamente se añadió lubricante para mejorar el funcionamiento del equipo, ubicando las piezas en su lugar correspondiente.
- Verificación del funcionamiento eléctrico y correcto montaje de las piezas.

Para el proceso de trituración, se procedió según descripción siguiente:

1. Cubrir el orificio de salida con bolsa plástica, para recepcionar la muestra y evitar pérdida del material triturado.
2. Encender el molino.
3. Cargar en el orificio de entrada, una cantidad de hojas desecadas asegurando que éstas lleguen a las cuchillas (este paso se repite hasta terminar la cantidad de hojas a triturar).
4. Pesar polvo obtenido.
5. Peso final de 163.9g.



Fig 11: Thomas-WILEY Laboratory Mill Modelo 4



V. Extracción por Maceración Acelerada

Preparación de la solución hidroalcohólica al 35%, el procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

- ✓ La cantidad de alcohol usada fue de 331.6ml y 568.4ml de agua purificada para preparar 900ml de solución hidroalcohólica, partiendo de un alcohol etílico al 95% y se quiere una relación droga: solvente de 1:5 al 35% R-OH, obteniendo una constante dieléctrica de 58.1.

Para la realización de la maceración acelerada el procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Después de ya preparada la solución hidroalcohólica, en los Beakers se deposita la cantidad de droga y solvente calculadas anteriormente.
2. Se enciende la cocina y se colocan los Beakers cada uno con su agitador.
3. Se controla la temperatura midiéndola cada 5 minutos para asegurar que esté de 40-45°C.
4. Agitación constante.
5. El procedimiento se realizó por dos horas.



Fig 12: Maceración acelerada.

VI. Filtración

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Se coloca el embudo en el soporte.
2. Se coloca el beaker debajo del orificio de salida del embudo, a una distancia que se evite el contacto entre éstos al momento de la filtración.
3. Se coloca el paño de algodón en la boca del embudo asegurando bien que cubra toda la superficie.
4. Se deja caer suavemente en el paño una cantidad de extracto evitando el desborde de éste.



5. Con los guantes colocados se exprime el paño, dejando caer el filtrado por el embudo hacia el beaker (este paso se realiza hasta acabar con el extracto sin filtrar).
6. Se recicla en vasos de vidrio color ámbar.

Luego de filtrar se obtuvo un volumen de 520ml, este procedimiento se realiza para separar el residuo del material vegetal contenido en el extracto hidroalcohólico.

VII. Concentración del extracto hidroalcohólico al 25%

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Medir la cantidad que se obtendrá al final y depositarla en el beaker para hacer una marca en éste y tener una referencia y evitar concentrar más de lo deseado.
2. Añadir el restante de extracto al beaker.
3. Colocar en la cocina.
4. Medir temperatura constantemente para evitar aumento excesivo de temperatura la cual debe permanecer de 45-50°C.
5. Este procedimiento se llevó a cabo por tres días hasta obtener el volumen deseado de 130ml.
6. Se recicló los 130ml en vasos de vidrio color ámbar.

VIII. Separación líquido-líquido (Fraccionamiento):

El fraccionamiento líquido-líquido del extracto fluido obtenido se realiza con el fin de eliminar impurezas y mejorar la solubilidad de los metabolitos secundarios contenidos en la especie en estudio.

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Lavar los materiales y secarlos.
2. Montar el equipo.
3. Añadir el extracto hidroalcohólico de *Cnidocolus aconitifolius* (130ml) al embudo separador asegurando que la llave esté cerrada previamente.



4. Añadir al extracto contenido en el embudo 180ml de Ciclohexano, agitar por 5 minutos, dejar reposar hasta visualizar clara separación de fases, retirar del embudo la fase ciclohexánica (se realizó este paso por triplicado).
5. Añadir a la fase hidroalcohólica restante en el embudo 180 ml de Acetato de Etilo, agitar por 5 minutos, dejar reposar hasta visualizar clara separación de fases, retirar del embudo la fase hidroalcohólica (se realizó este paso por triplicado).
6. Reciclar fase de Acetato de Etilo en vasos color ámbar (458ml).



Fig 13: Separación líquido-líquido (Fraccionamiento).

IX. Concentración de la fracción de acetato de etilo al 20%

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Medir la cantidad que se obtendrá al final y depositarla en el beaker para hacer una marca en éste y tener una referencia y evitar concentrar más de lo deseado.
2. Añadir lo restante de la fase de acetato de etilo al beaker.
3. Colocar en la cocina.
4. Medir temperatura constantemente para evitar un aumento exagerado en la temperatura la cual debe permanecer de 40-45°C.
5. Este procedimiento se llevó a cabo por varios días de 8am a 5pm hasta obtener el volumen deseado de 92ml.
6. Se recicló los 92ml en vasos de vidrio color ámbar.



Fig 14: Concentración de fase de Acetato de etilo



X. Evaporación del solvente de la fase de acetato de etilo.

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Se colocaron 20 ml de fase de Acetato etílico por plato Petri para un total de cinco platos Petri
2. Colocar las mallas protectoras en la cocina a una temperatura No mayor de 40°C.
3. Se dejan en la cocina hasta desecación (evaporación completa del solvente).
4. Debe evitarse aumentos bruscos de temperatura y/o exceder el tiempo de evaporación.
5. Este procedimiento se realizó hasta sequedad dejando un residuo sólido en el plato Petri.
6. Se recicla este residuo en cada uno de sus platos Petri con sus tapas y cubriéndolos con hojas de papel o papel de aluminio. protegiéndolos así de la luz y microorganismos.

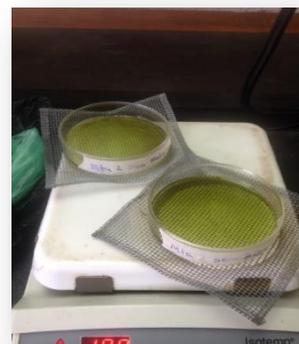


Fig 15: Evaporación de solvente (acetato de etilo).

XI. Preparación de concentración/dosis a administrar de *Cnidoscolus aconitifolius*

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

1. Se partió de la premisa: 1000µg/ml.
2. Las concentraciones a administrar se establecieron de 100µg/0.1ml y 300µg/0.3ml.
3. La posología establecida es: 100µg/0.1ml y 300µg/0.3ml, dos veces al día (8am y 5pm) por diez días.
4. Se colocó el vidrio reloj en la balanza analítica y se tara.
5. Del extracto desecado de los platos Petri reciclados en el procedimiento anterior, se toma con una espátula fina una pequeña cantidad y se coloca en el vidrio reloj previamente tarado.



6. Se pesa la cantidad de 100mg (0.1g) en la balanza analítica.
7. Añadir 10ml de agua destilada en el vidrio reloj donde se contiene lo pesado anteriormente, con la espátula mezclar hasta diluir.
8. Colocar el embudo en el vial y dejar caer lo diluido en el vidrio reloj, completar con los 90ml de agua destilada restante.
9. Mezclar para crear uniformidad del contenido.
10. Sellar bien, para protegerlos de la luz y microorganismos.
11. Almacenar en refrigeradora, evitando se congele, previo a la administración a los animales de experimentación.



Fig 16: Disolución en el vidrio reloj

XII. Preparación de los extractos de Narciso (*Nerium oleander*)

El extracto de *Nerium oleander* (narciso) se preparó para la inducción de diabetes en ratones de cepa *Balb-C*.

1. Recolección de la muestra

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

- ✓ La muestra se obtuvo de arbustos de *Nerium oleander* (narciso), las hojas desarrolladas y recolectadas se eligieron según los criterios de inclusión.
- ✓ La recolección se realizó en la ciudad de León a las 11.00am.
- ✓ Con las tijeras de podar limpias se recolectaron las hojas cortándolas por el pecíolo.



Fig 17: Hojas de *Nerium oleander* (narciso) desprendidas del pecíolo.



- ✓ Fueron guardadas en bolsas de plástico limpio para su transporte inmediato a la facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-León.

2. Pesado

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

- ✓ Primeramente, se calibro la balanza de brazo.
- ✓ Se colocó por grupos las hojas sobre la balanza limpia, para el pesado.
- ✓ Obteniendo un peso de: 195g

3. Maceración

La cantidad de alcohol usada fue de 368ml y 632ml de agua para preparar 1000ml de solución hidroalcohólica, partiendo de un alcohol etílico al 95% y se quiere una relación droga:solvente de 1:5 al 35% R-OH, obteniendo una constante dieléctrica de 58.1.

3.1. Maceración acelerada:

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

- ✓ Las hojas se lavaron con agua destilada.
- ✓ Debido a la cantidad de hojas, se cortaron y depositaron en 3 Beakers de 500ml.
- ✓ Con probeta se midió el agua destilada y el alcohol necesario para la solución hidroalcohólica al 35%.
- ✓ A cada beaker (con 65g de hojas cada uno), se le adicionaron 325 ml de solución hidroalcohólica al 35%.
- ✓ Se colocó en la cocina previamente calentada.
- ✓ La maceración acelerada fue por una hora; midiendo cada 10 minutos la temperatura, para mantener un rango de 35°-40°C.



Fig 18: Maceración acelerada



3.2. Maceración:

Luego de la maceración acelerada, el procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

- ✓ Se taparon los beakers con papel de aluminio, para evitar contaminación.
- ✓ Se colocaron en un lugar fresco y protegido de la luz.
- ✓ Se maceró por siete días.



Fig 19: Maceración de *N. oleander*

4. Filtración

El procedimiento se realizó, según descripción siguiente:

- ✓ Después de los siete días de maceración se extrajeron los beakers del lugar almacenados.
- ✓ Se coloca el embudo en el soporte y el beaker de bajo del orificio de salida del embudo.
- ✓ Se coloca el paño de algodón en el embudo, asegurando que cubre toda la superficie de la boca del embudo.
- ✓ Se vierte en el paño poco a poco el extracto fluido hidroalcohólico de *Nerium oleander* contenido en los beaker anteriormente macerados, evitando derramar extracto.
- ✓ La solución obtenida se recicló en frascos de vidrio color ámbar, y se guardaron en cadena de frío hasta la administración a los ratones.



Fig 20: Extracto después de las maceraciones y antes de la filtración.

XIII. Solución de referencia (Glibenclamida)

- ✓ Se utilizó patrón terciario del principio activo.



XIV. Características de los ratones a utilizar en el estudio

Ratones de la cepa *Balb-C* del Bioterio de Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias UNAN-León. Se utilizaron un total de 44 ratones, divididos en cajas de 5 y 6 ratones por caja. La grosa de las cajas se cambia dos veces a la semana, la comida (concentrado de engorde) y el agua el cambio es diario. Se mantienen en ambientes controlados, los cuales están cerrados con la luz apagada y temperatura controlada para evitar situaciones de estrés. En el bioterio los ratones son divididos por sexo, edad, camadas o hembras con crías.

Normalmente los ratones tienen un nivel de agresividad moderada; pero con la inducción de la diabetes se observó que los ratones aumentaban su nivel de agresividad entre sí.

A cada ratón se le hicieron cortes pequeños en sus orejas para su correspondiente identificación.

XV. Separación de los ratones en grupos

Los ratones se dividieron en 3 grupos de estudio, y 2 grupos control.

- ✓ El primer grupo conformado por 11 ratones:
 - Administración de solución de referencia (Glibenclamida) en concentración de 50µg / 0.1ml
- ✓ El segundo grupo conformado por 12 ratones:
 - Administración de extracto acuoso de *Cnidoscolus aconitifolius* en concentración de 100µg/0.1ml.
- ✓ El tercer grupo conformado por 11 ratones:
 - Administración de extracto acuoso de *Cnidoscolus aconitifolius* en concentración 300µg/0.3ml.
- ✓ El cuarto grupo conformado por 5 ratones:
 - Control negativo (sin inducción de diabetes).
- ✓ El quinto grupo conformado por 5 ratones:
 - Control positivo (con inducción de diabetes y sin tratamiento).



XVI. Inducción de diabetes a los ratones a utilizar en el estudio

La diabetes en ratones fue inducida administrando por vía oral 300 µg/0.3ml de narciso (*Nerium oleander*), por un periodo de tres días, una vez al día. Luego de la administración los ratones sometidos al estudio se dejaron 3 días sin administración de ningún tipo de extracto, con alimentación y toma de agua sin restricción. (2)(18)(28)

XVII. Administración de extracto de Narciso (*Nerium oleander*)

- ✓ Administración por vía oral, utilizando jeringas para insulina de 100 unidades.
- ✓ Se administró 300µg/0.3ml por un periodo de tres días, una vez al día (8:00am).

XVIII. Administración de solución de referencia (*Glibenclamida*)

- ✓ Administración por vía oral, utilizando jeringas para insulina de 100 unidades.
- ✓ Se administró 50µg/0.1ml por un periodo de diez días, dos veces al día (8:00am y 5:00pm).

XIX. Administración de extracto de *Cnidioscolus aconitifolius*

- ✓ Administración por vía oral, utilizando jeringas de insulina de 100 unidades.
- ✓ Se administró 100µg/0.1ml y 300µg/0.3ml (cada concentración a su respectivo grupo) por un periodo de diez días, dos veces al día (8:00am y 5:00pm).

XX. Medición de glicemia en sangre

- ✓ Para la medición de glicemia se utilizó un glucómetro marca Wellpro.
- ✓ Se procedió a extraer sangre directamente de las venas de la cola, por su facilidad.
- ✓ Se utilizaron jeringas de insulina de 30 unidades por el diámetro y grosor de la aguja que facilita la extracción de sangre.



- ✓ Se aplicó una gota de sangre en las cintas de medición para tazar su valor.
- ✓ En algunos ratones se procedió a cortar la punta de la cola para extraer la sangre debido a que las venas no estaban lo suficientemente visibles.

XXI. Sacrificio de los animales de experimentación utilizados

La eutanasia de los ratones fue por dislocación cervical, las responsables del Bioterio fueron las encargadas de este proceso para realizarlo de forma rápida, segura evitándoles el mayor dolor posible a los ratones. La aplicación correcta del método produce una lesión irreversible del tallo cerebral e inconsciencia inmediata. La muerte se confirmará posteriormente por exanguinación o lesión grave e irreversible en el corazón o cerebro.

XXII. Procesamiento de la información y Plan de análisis:

Para el procesamiento de la información se tabularon los datos en el paquete de Microsoft Excel 2010 versión 15.0.4128.1014 e IBM SPSS Statistics Versión 21, la cual permitió la creación de la base de datos digitalizada para su posterior utilización.

La presentación de los resultados detallando el comportamiento de los niveles de glicemia en cada una de los momentos de mediciones se presentan por gráficas de barras de error, y sus respectivas tablas de los promedios de las mediciones de cada grupo de la investigación, el estudio de manera general, se presentan en gráfica de líneas, para evidenciar la acción de los extractos acuosos de *C. aconitifolius* se representará en gráfica de barras de error y para determinar si existe o no diferencia significativa en los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA de un factor), representando los niveles de eficacia se realizó una gráfica de línea.



VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

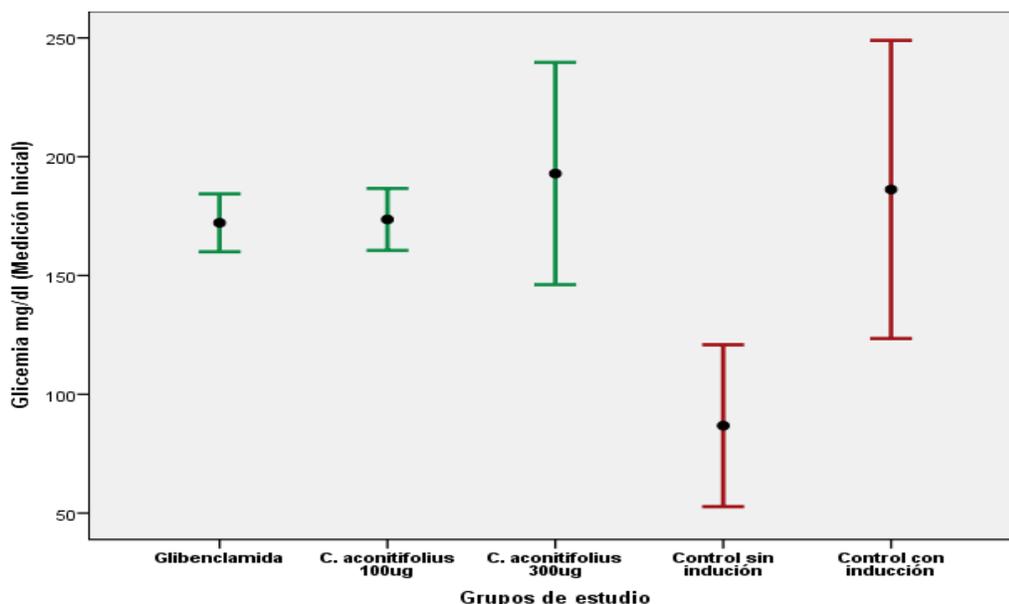


Fig 21: Niveles de Glicemia en ratones de experimentación al inicio del estudio

Tabla 5: Valores promedios mediciones iniciales.

Medición Inicial (T ₀ , día 1)			
Grupos		Media Estadística	Valor de Referencia
G ₁	Administración de Glibenclamida 50 µg/0.1ml	172.1	43-152.7 mg/dl
C ₁	Administración <i>C. aconitifolius</i> 100 µg/ 0.1ml	173.5	
C ₃	Administración <i>C. aconitifolius</i> 300 µg/0.3ml	192.9	
C.	Control Negativo (Alimentación normal)	86.8	
C ₊	Administración Control Positivo (<i>N. oleander</i>) 300 µg/0.3 ml	186.2	

*(L Avelina, B Diuris , R Barbara .2011 Valores Hematológicos y Bioquímicos de ratones producidos en CENPALB Vol 11 pag 7)

La *Figura 21* y *Tabla 5* evidencian los valores promedios obtenidos en la medición de glicemia inicial (T₀, día 1) para los diferentes grupos de estudio. Siendo sobresaliente el valor para C₃ vs el valor de referencia, la gráfica afirma la distribución de los valores de glicemia (T₀, día 1) vs la amplitud de la barra de error de cada uno de los grupos, reflejando C₃ y C₊ la mayor amplitud entre grupos tratados. Nuestra investigación no omite indicar que el nivel de glicemia inicial no puede ser controlado y varía de ratón en ratón.

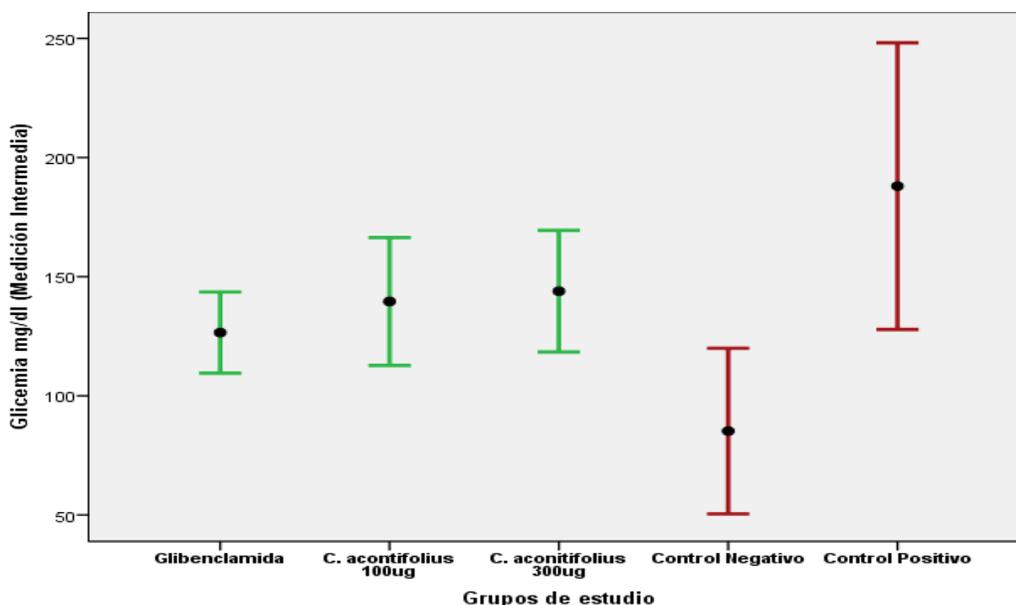


Fig 22: Niveles de Glicemia en ratones de experimentación al día 4 de tratamiento

Tabla 6: Valores promedios de las mediciones intermedias.

Medición Inicial (T ₁ , día 4)			
Grupos		Media Estadística	Valor de Referencia
G ₁	Administración de Glibenclamida 50 µg/0.1ml	126.5	43-152.7 mg/dl
C ₁	Administración C. aconitifolius 100 µg/ 0.1ml	139.5	
C ₃	Administración C. aconitifolius 300 µg/0.3ml	143.9	
C ₋	Control Negativo (Alimentación normal)	85.2	
C ₊	Administración Control Positivo (N.oleander) 300 µg/0.3 ml	188	

La Figura 22 y Tabla 6 evidencian los valores promedios obtenidos en las mediciones de glicemia (T₁, día 4) para los diferentes grupos de estudio. Siendo sobresalientes los valores obtenidos para G₁, disminución de 26.49% y C₃ disminución de 25.40%, ambos, posterior a cuatro días de administración versus valores obtenidos para T₀ medición inicial vs el valor de referencia, afirmando disminución en los niveles de glicemia, equiparándolos con el control positivo y control negativo, justipreciando así la actividad hipoglucemiante de *C. aconitifolius* en los animales de experimentación. Igualmente La Figura 21 muestra reducción en la amplitud de la barra de error de G₁ y C₃ reflejando una variación en la distribución de los niveles de glicemia obtenidos.

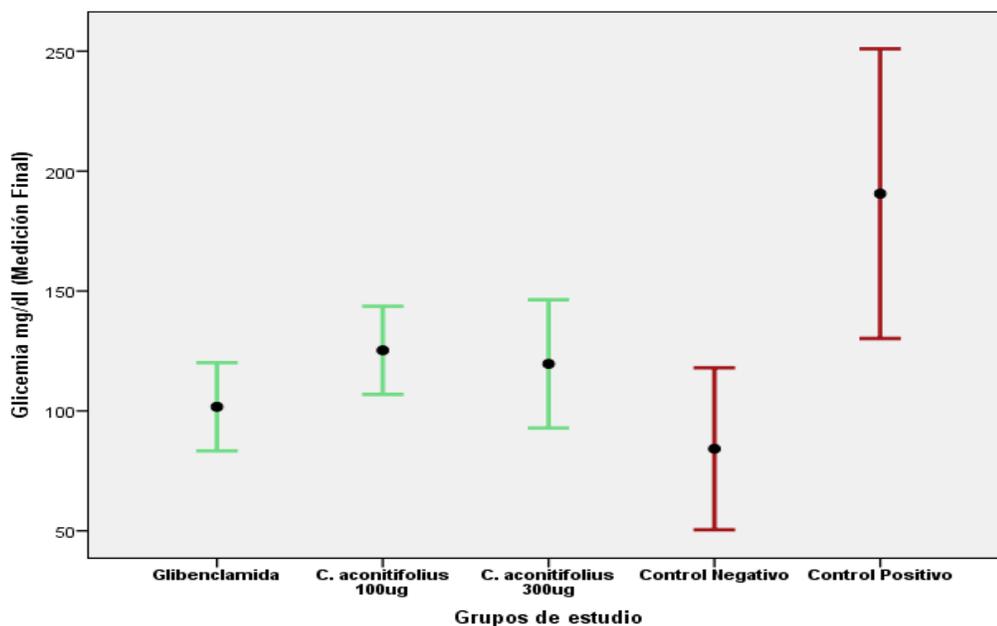
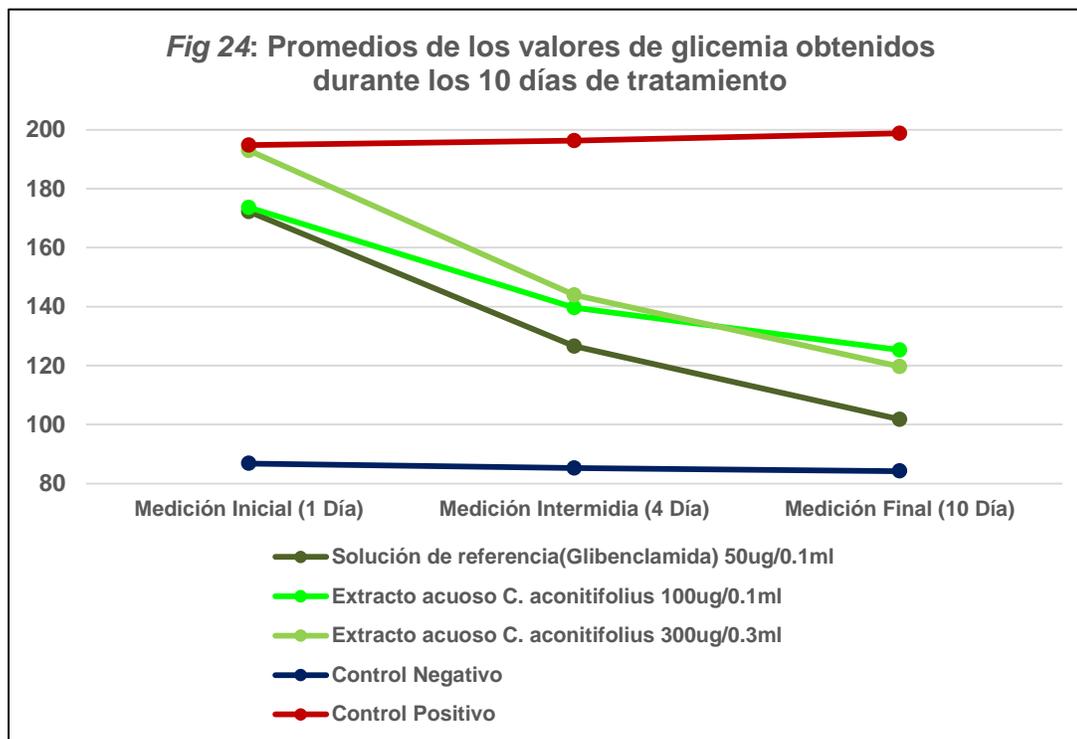


Fig 23: Niveles de Glicemia en ratones de experimentación al finalizar el estudio

Tabla 7: Valores de los promedios de las mediciones finales.

Medición Inicial (T ₂ , día 10)			
Grupos		Media Estadística	Valor de Referencia
G ₁	Administración de Glibenclamida 50 µg/0.1ml	101.7	43-152.7 mg/dl
C ₁	Administración C. aconitifolius 100 µg/ 0.1ml	125.2	
C ₃	Administración C. aconitifolius 300 µg/0.3ml	119.6	
C	Control Negativo (Alimentación normal)	84.2	
C ₊	Administración Control Positivo (N.oleander) 300 µg/0.3 ml	190.6	

La Figura 23 y Tabla 7 evidencian los valores promedios obtenidos en las mediciones de glicemia (T₂, día 10) para los diferentes grupos de estudio. Siendo sobresalientes los valores obtenidos para G₁, disminución de 19.60% y C₃ disminución de 16.88%, ambos, posterior a diez días de administración versus valores obtenidos para T₁ día cuatro, apreciando un descenso en los niveles de glicemia, lo que afirma actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos de *C. aconitifolius* en los animales de experimentación, la amplitud de las barras de error de los grupos de estudio, indican similitud en la distribución de los valores finales obtenidos.



La figura 24 evidencia los valores promedios obtenidos en la medición de glicemia (T_0 , día 1- T_1 , día 4- T_2 , día 10) para los diferentes grupos de estudio (G_1 , C_1 , C_3 , C_+ , C_-). La gráfica constata y resume lo expuesto en las gráficas Fig. 20 - Fig. 22, siendo relevante la disminución de glicemia en C_3 versus G_1 para los tiempos de medición. No se muestran variaciones significativas para C_+ y C_- .

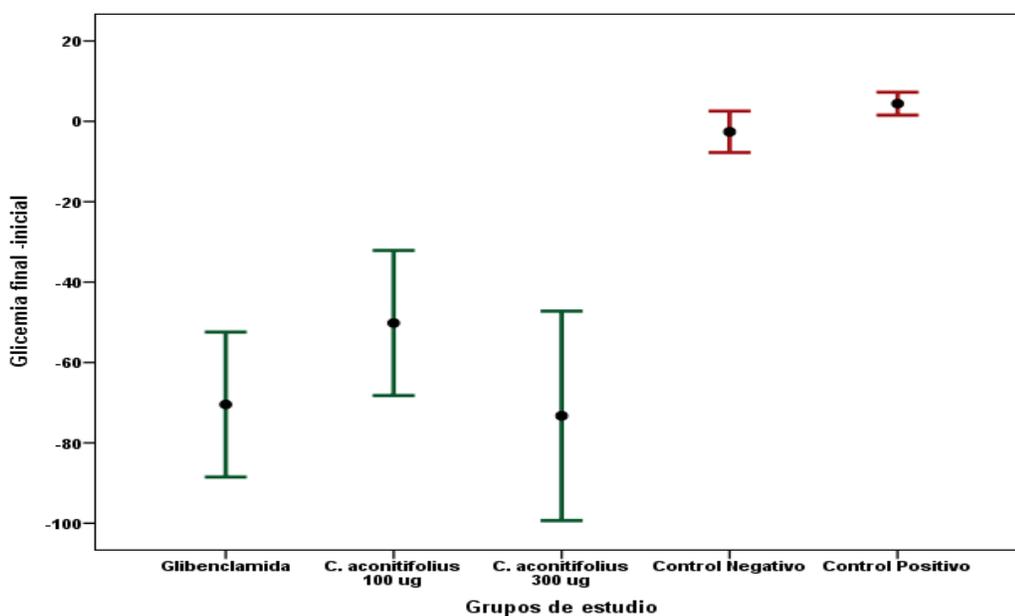


Fig 25: Disminución en la glicemia después de 10 días de tratamiento en los diferentes grupos de estudio

Tabla 8: Promedio de la disminución de los niveles de glicemia entre la medición final en comparación con la inicial.

Descriptivos								
diferencia2	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	11	-70.4545	26.84162	8.09305	-88.4870	-52.4221	-107.00	-25.00
2	11	-50.1818	26.87310	8.10255	-68.2354	-32.1282	-98.00	-14.00
3	11	-73.2727	38.79456	11.69700	-99.3353	-47.2102	-144.00	-18.00
4	5	-2.6000	4.15933	1.86011	-7.7645	2.5645	-9.00	2.00
5	5	4.4000	2.30217	1.02956	1.5415	7.2585	1.00	7.00
Total	43	-49.3953	39.68395	6.05175	-61.6083	-37.1824	-144.00	7.00



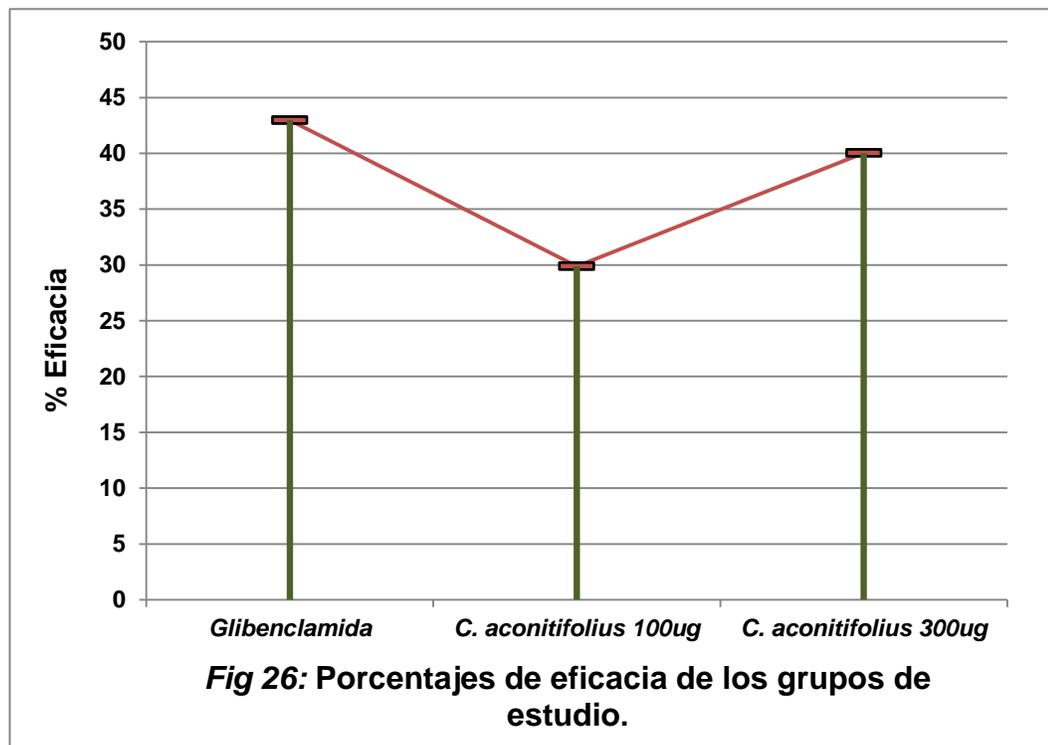
Tabla 9: Análisis de varianza (ANOVA de un factor) de los promedios de las disminuciones entre la medición final en comparación con la inicial.

ANOVA de un factor					
diferencia2					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	36575.334	4	9143.833	11.752	.000
Intra-grupos	29566.945	38	778.078		
Total	66142.279	42			

Tabla 10: HSD de Tukey^{a,b}

diferencia2			
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3	11	-73.2727	
1	11	-70.4545	
2	11	-50.1818	
4	5		-2.6000
5	5		4.4000
Sig.		.509	.988

La Figura 25, Tablas 8-10, exponen los valores de glicemia obtenidos posterior a los tratamientos, posterior a 10 días de administración, para lo cual el grupo G₁ disminuye en promedio 70.45 mg/dl, C₁ disminuyo 50.18 mg/dl, C₃ 73.27 mg/dl, el Análisis de Varianza (ANOVA de un factor), no muestra diferencia significativa entre los tres tratamientos anteriores ($p \geq 0.05$), no obstante existe marcada diferencia en la comparación de C₊ y C₋ para ($p \leq 0.01$), y disminución promedio de 2.6 mg/dl en C₋ e incremento de 4.40 mg/dl en C₊, indicando claramente la actividad hipoglucemiante que poseen los extractos acuosos de *Cnidioscolus aconitifolius*. La distribución de los valores obtenidos para los tres grupos de tratamiento, según la amplitud de la barra de error muestra que No existe diferencia significativa entre ellos, pero muestran diferencia significativa versus C₋ y C₊ principalmente.



La Figura 26 evidencia los porcentajes de Eficacia de los extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius* vs solución de referencia (Glibenclamida), en relación a C+. Los porcentajes fueron calculados en el paquete estadístico Microsoft Excel V 15.0.4128.1014 mediante la fórmula:

Fórmula 1: Porcentaje de Eficacia.

$$\left(\left(\frac{G-Gi}{Gi} - \frac{Gcp-Gicp}{Gicp} \right) * -1 \right) * 100$$

Dónde:

G: Glicemia final del grupo en estudio.

Gi: Glicemia inicial del grupo en estudio.

Gcp: Glicemia final del control positivo.

Gicp: Glicemia inicial del control positivo.

(Mejía. et al; 2012)



Tabla 11: Porcentajes de Eficacia de los grupos de estudio.

Porcentajes de eficacia		
Grupos		%
G ₁	Administración de Glibenclamida 50 µg/0.1ml	42.9
C ₁	Administración <i>C. aconitifolius</i> 100 µg/ 0.1ml	29.8
C ₃	Administración <i>C. aconitifolius</i> 300 µg/0.3ml	40.0

Equiparando los tres grupos representados gráficamente, (Fig 26) se evidencia similitud en la eficacia de G₁ versus C₃ posterior a 10 días de tratamiento, dado que el porcentaje de eficacia mayor pertenece a G₁ (Glibenclamida) obteniendo un 42.97%, seguido por C₃ con 40.03% y C₁ con 29.88%, valores que justifican que C₃ es el nivel de concentración con mejor actividad hipoglucemiante versus G₁.



VIII. CONCLUSIÓN

En esta investigación se concluye que los extractos acuosos de *Cnidoscolus aconitifolius* (Sinonimia: *Cnidoscolus chayamansa*), modifican los valores de glicemia (disminuyéndolos) en ratones *Balb-C*, con potencial uso en Diabetes Mellitus.

Al realizar el procedimiento en los grupos de estudio, bajo condiciones similares, C₃ evidencia el mayor efecto hipoglucemiante, obteniendo un promedio de disminución final de 73.27mg/dl, lo anterior tazado y comparado con la respuesta moduladora de glicemia de solución de referencia (glibenclamida).

Al contrastar los porcentajes de eficacia calculados en referencia al control positivo se concluye que la solución de referencia (G₁) presenta mayor eficacia obteniendo un valor del 42%, seguido por el extracto acuoso de *Cnidoscolus aconitifolius* (C₃) con 40%.



IX. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar más estudios con animales de experimentación, tomando en cuenta el cambio del comportamiento normal animales, antes y después del estudio.
- ✓ Utilizar otras partes de la especie *C. aconitifolius* para encontrar otras propiedades medicinales.
- ✓ Separar el principio activo con las propiedades hipoglucemiantes.
- ✓ Realizar estudios clínicos.
- ✓ Elaborar forma farmacéutica a base de la especie *Cnidocolus aconitifolius*.



X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adame, L. G. M., Pérez, F. J. G., & Rodrigo, J. A. R. (2002). Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus, conceptos actuales. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 10(2), 62-68. Extraído desde: <http://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2002/er022d.pdf>
2. Ahmet Levent Bas, Sule Demirci, Nuray Yazihan, Kamil Uney, y Ezgi Ermis Kaya. 2012. *Nerium oleander Distillate Improves Fat and Glucose Metabolism in High-Fat Diet-Fed Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*.
3. Akah P. A., Okoli C. O., Nwafor S. V. Phytotherapy in the management of Diabetes mellitus. 2002. Mini Review Journal of Natural Remedies vol 2/1.pag. 01-10.
4. Arredondo Gómez Alberto, Ávila Ayala Rolando & Muñoz Gutiérrez Liliana. 2012. Fichas descriptivas de 52 plantas ornamentales que se comercializan en la Huasteca Potosina. 1^{ra} ed. Disponible en: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/904.pdf>
5. Brush Ayauca Catherine Wallenka. 2005-2006. Estudio del procesamiento tecnológico para la elaboración de un té a partir de la *Cnidioscolus aconitifolius* (chaya). Universidad de Guayaquil. Guayaquil-Ecuador Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/609/1/971.pdf>



6. Cifuentes Rolando, Poll Elfriede, Bressani Ricardo, Yurrita Sebastián. 21 de abril 2015. Caracterización botánica, molecular, agronómica y química de los cultivares de Chaya (*Cnidocolus aconitifolius*) de Guatemala. Revista de la Universidad del Valle Guatemala. Extraído de: http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-21/REV21_caract_botanica34-49.pdf. Fecha de Acceso: 13/06/17
7. Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de cardiología*, 55(5), 528-535.
8. El-Abhar Hanan S, Schaala Mona F. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives.2014. World Journal of diabetes (WJD).vol 15 5(2). Pag. 176-197.
9. Fortich Revollo Álvaro José.2015.Fisiología de la secreción de insulina y glucagón.Cartagena. Disponible en: [http://www.endocrino.org.co/wp-content/uploads/2015/10/Fisiologia de la Secrecion de Insulina AJ Fortich.pdf](http://www.endocrino.org.co/wp-content/uploads/2015/10/Fisiologia_de_la_Secrecion_de_Insulina_AJ_Fortich.pdf) Fecha de acceso:05/05/17
- 10.Fuentes Paredes Flor de María; Mendoza Yanavilca Rosa Amelia; Rosales Fernández Arturo Lorenzo & Rosario Alberto Cisneros Tarmeño. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. 2008. Lima Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud (Perú).
- 11.Grijalva Pineda Alfredo. Flora útil etnobotánica de Nicaragua(1^{ra} ed) MARENA. Managua 2005.



12. Hernández Javier, Domínguez Mónica. Mundo de roedores: el ratón de laboratorio o ratón blanco. 2014. Del sitio:
<http://mundoroedores.blogspot.com/2014/12/el-raton-de-laboratorio-o-raton-blanco.html>. Fecha de acceso: 18/06/17
13. Hugués Hernandorena Beatriz, Rodríguez García Julio Cesar, Rodríguez González Julio Cesar, Marrero Rodríguez María Teresa. 2002. Enfoque actual, Instituto Nacional de Endocrinología, Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. Vol 13(2). Pag 163-172.
Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/end/vol13_2_02/end09202.htm. Fecha de acceso: 08/05/17
14. Jiménez Arellanes Maria Adelina, Ignacio García Martínez, Rojas Tomé Susana. 2014. Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidioscolus* (Euphorbiaceae). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v45n4/v45n4a3.pdf>.
15. Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann, Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica (12^{va}ed) McGRAW-HILL Interamericana Editores, S.A. de C.V.
16. León Goñi Avelina Caridad, Blanco Diuris, Peña Amelia, Ronda Marisel, González Bárbara O., Arteaga María E., Bada Ana M., González Yana & Mancebo Axel. 2011. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. Revista electrónica de Veterinaria Volumen 12(11), pág. 7. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111/111101.pdf>. Fecha de acceso: 20/05/17



17. López Martínez Cecilia. Evaluación del extracto metanólico de chaya (*Cnidoscolus spp*, Euphorbiaceae) sobre la cascada de transducción de señales de la insulina en animales diabéticos. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro, 2007.
18. Luna Iñiguez Verónica Magaly. Evaluación de la actividad antioxidante e hipoglucemiante de un jarabe de extracto acuoso de hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) libre de glucósidos cianogénicos. Unidad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala. El Oro, Ecuador, 2014.
19. Mwafy Saleh N., Yassin Maged M. 2011. *Antidiabetic Activity Evaluation of Glimepiride and Nerium oleander Extract on Insulin, Glucose Levels and Some Liver Enzymes Activities in Experimental Diabetic Rat Model.*
20. *National Institute on Drugs Abuse (NIH)*, ¿La marihuana como medicamento? noviembre del 2014, obtenido del sitio: https://www.drugabuse.gov/sites/default/files/drugfacts_marihuana_medico_112014-2.pdf Fecha de acceso: 03/08/17
21. Nirali B Joshi, Shankar M. B. Global Market Analysis of Herbal Drug Formulations. Disponible en: <http://ijapc.com/volume4-first-issue/v4-i1-7-59-65.pdf>. Fecha de acceso: 14/07/17 Fecha de acceso:12/07/17
22. Organización Mundial de la Salud (OMS), Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Obtenido del sitio: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>. Fecha de acceso: 12/07/17



23. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS) oficina regional de las Américas. 2016. Indicadores Básicos Situación de salud en las Américas Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31288/IndicadoresBasicos2016-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de acceso: 12/07/17
24. Palacios Lozada Enrique Eduardo, Economía y Plantas Medicinales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Económicas, Boletín 52, disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/Pdf/a04.pdf>, fecha de acceso: 23/04/17
25. Palos Suárez Giovanna María del Rosario. Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en un modelo experimental de diabetes en ratas Wistar. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional. Santiago de Querétaro, QRO. 2007.
26. Porcuna José Luis Extraído de ficha técnica plantas pag 52. 2013: http://www.guanche.org/agroguanche/wpcontent/uploads/2016/12/todo_fichas.pdf
27. Prevalencia de Diabetes Mellitus y factores de riesgo en mayores de 20 años de las cabeceras departamentales de Nicaragua. UNIVERSITAS León. Revista científica de la UNAN-León. Vol 5 Agosto 2014, pp 1-10 extraído de: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/207698/2/1%20PREVALENCIA%20DE%20DIABETES%20MELLITUS.pdf>



28. Tasleem Akhtar, Nadeem Sheikh y Muddasir Hassan Abbasi. *Clinical and pathological features of Nerium oleander extract toxicosis in wistar rats*. 2014. BioMed Central.

29. Valenzuela Soto Ramón, Morales Rubio María Eufemia, Verde Star María Julia, Oranday Cárdenas Azucena, Preciado Rangel Pablo, González Jacob Antonio, Esparza Rivera Juan Ramón, Mayo 2015, *Cnidocolus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad, México, disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342015000400012 Fecha de acceso: 24/04/17.



XI. CRONOGRAMA

DIAGRAMA DE GANTT	
TEMA	Actividad moduladora de extractos acuosos de <i>C. aconitifolius</i> sobre diabetes inducida en ratones cepa Balb-C.
UNIDAD DE TIEMPO	Días
FECHA DE INICIO	03-03-17

Actividad	Nombre	Duración	Actividad Precedente	Inicio	Finalización	Responsable
A	Documentación sobre la Chaya (<i>C. aconitifolius</i>) y sus propiedades.	2	-	03-03-17	05-03-17	Lic. Kelvin Núñez.
B	Elaboración del protocolo de trabajo.	10	A	10-03-17	20-03-17	Lic. Kelvin Núñez.
<i>Cnidocolus aconitifolius.</i>						
C	Recolección y Preservación de la planta.	1	B	25-03-17	25-03-17	Lic. Kelvin Núñez.
D	Secado.	4	C	27-03-17	31-03-17	Lic. Kelvin Núñez.
E	Trituración.	1	D	03-04-17	03-04-17	Lic. Kelvin Núñez.
F	Extracción por maceración acelerada.	1	E	05-04-17	05-04-17	Lic. Kelvin Núñez.
G	Filtración	1	F	05-04-17	05-04-17	Lic. Kelvin Núñez.



H	Concentración del extracto hidroalcohólico al 25%.	15	G	10-04-17	25-04-17	Lic. Kelvin Núñez.
I	Separación líquido-líquido (Fraccionamiento)	3	H	26-04-17	28-04-17	Lic. Kelvin Núñez.
J	Concentración de fracción de acetato de etilo al 20%.	15	I	01-05-17	15-05-17	Lic. Kelvin Núñez.
K	Evaporación del solvente de la fase de acetato de etilo.	4	J	16-05-17	19-05-17	Lic. Kelvin Núñez.
L	Preparación de las concentraciones/dosis a administrar de <i>C. aconitifolius</i> .	1	K	28-07-17	28-07-17	Lic. Kelvin Núñez.
<i>Nerium oleander</i>						
M	Recolección de la planta.	1	A	22-05-17	22-05-17	Lic. Kelvin Núñez.
N	Maceración	7	M	23-05-17	29-05-17	Lic. Kelvin Núñez.
O	Filtración.	1	N	29-05-17	29-05-17	Lic. Kelvin Núñez.
Solución de referencia						
P	Preparación de la dosis/concentración.	1	A	28-07-17	28-07-17	Lic. Kelvin Núñez.
Manejo y utilización de animales de experimentación						
Q	Elección de ratones a utilizar.	45	A	05-06-17	19-07-17	Lic. Kelvin Núñez. Lic. Lady Mejía. Lic. Violeta Bravo.
R	Separación por grupos de estudio.	1	Q	20-07-17	20-07-17	Lic. Kelvin Núñez. Lic. Lady Mejía. Lic. Violeta Bravo.

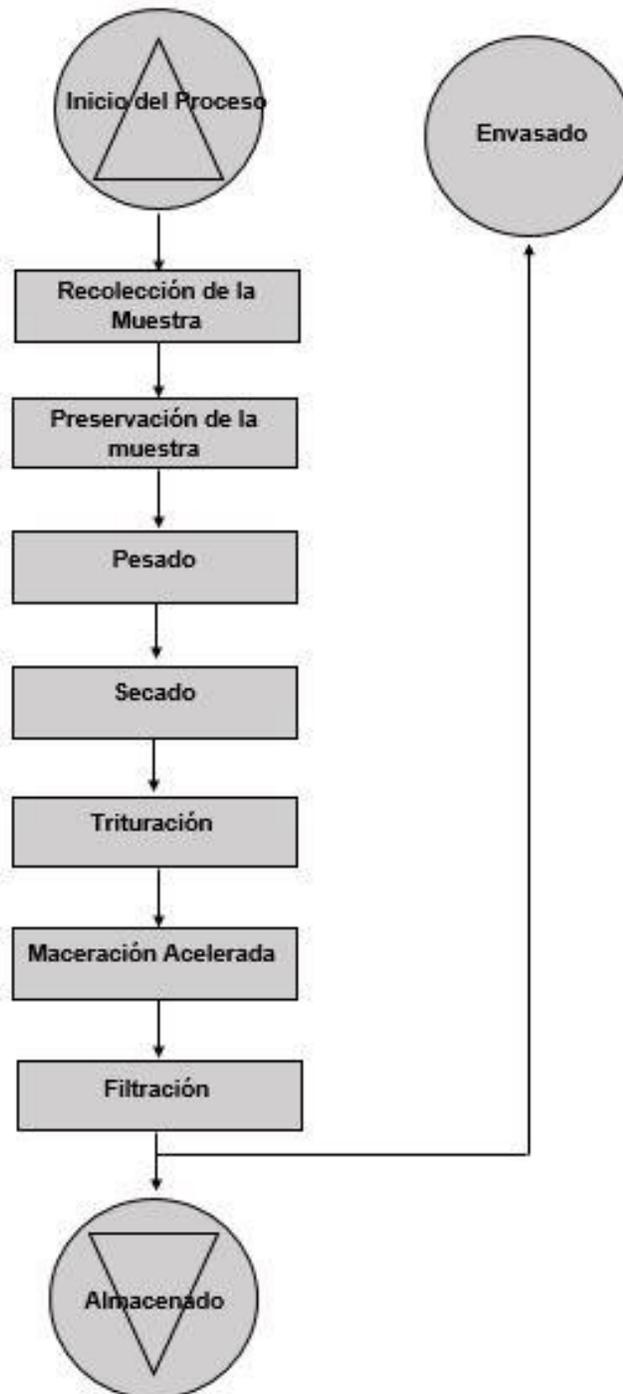


S	Inducción a la diabetes.	7	R	24-07-17	31-07-17	Lic. Lady Mejía. Lic Violeta Bravo.
T	Administración de solución de referencia y extracto acuoso de <i>C. aconitifolius</i> .	10	S	31-07-17	09-08-17	Lic. Lady Mejía. Lic Violeta Bravo.
U	Medición de Glicemia.	1	T	31-08-17	31-08-17	Lic. Lady Mejía. Lic Violeta Bravo.
				03-08-17	03-08-17	
				09-08-17	09-08-17	
V	Eutanasia.	1	U	11-08-17	11-08-17	Lic. Lady Mejía. Lic Violeta Bravo.
Documentación de resultados						
W	Procesamiento de la información.	1	U	21-08-17	21-08-17	Lic. Kelvin Núñez.
X	Plan de análisis.	3	W	22-08-17	22-08-17	Lic. Kelvin Núñez.
Y	Resultados y Análisis	30	X	04-09-17	03-10-17	Lic. Kelvin Núñez.
Z	Redacción de Conclusiones, Recomendaciones y Referencias bibliográficas.	3	Y	04-10-17	06-10-17	Lic. Kelvin Núñez.
	Elaboración de Anexos	2	Z	10-10-17	12-10-17	Lic. Kelvin Núñez.



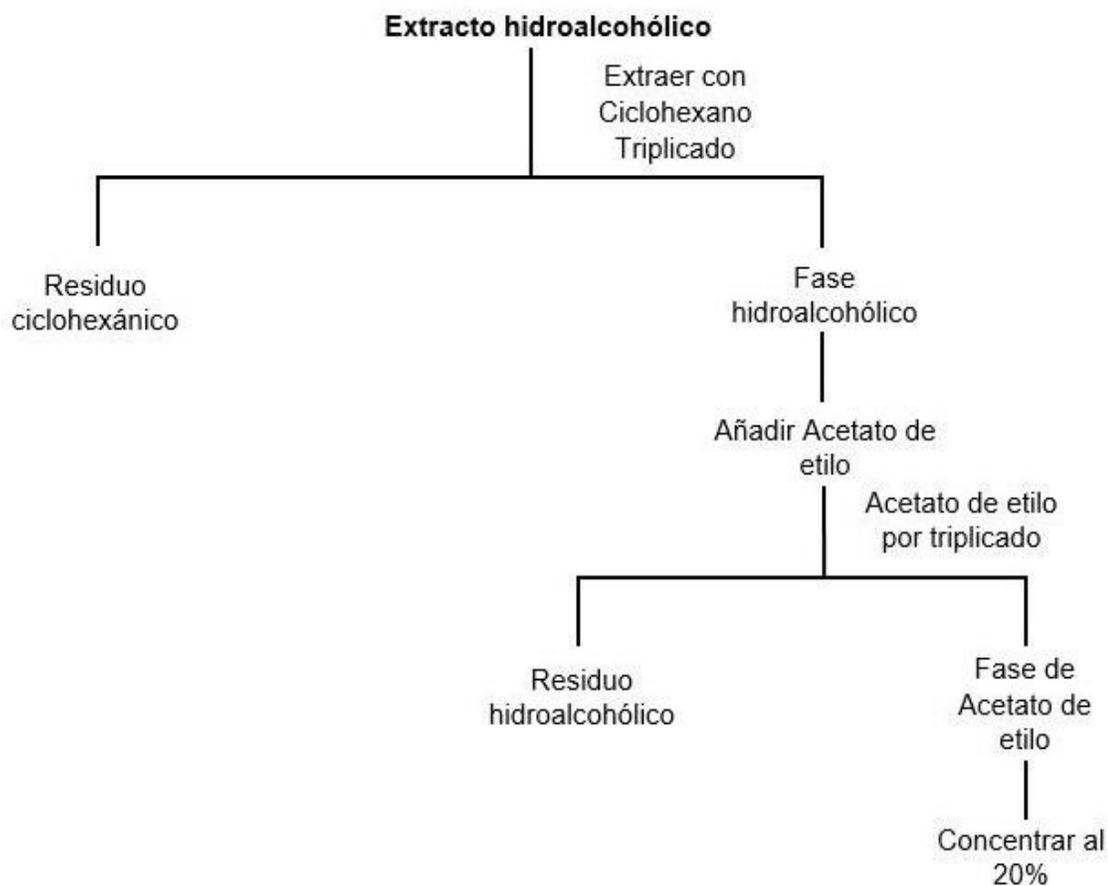
ANEXOS

ANEXO 1. Esq. 1: Procesamiento de la muestra *Cnidoscolus aconitifolius*



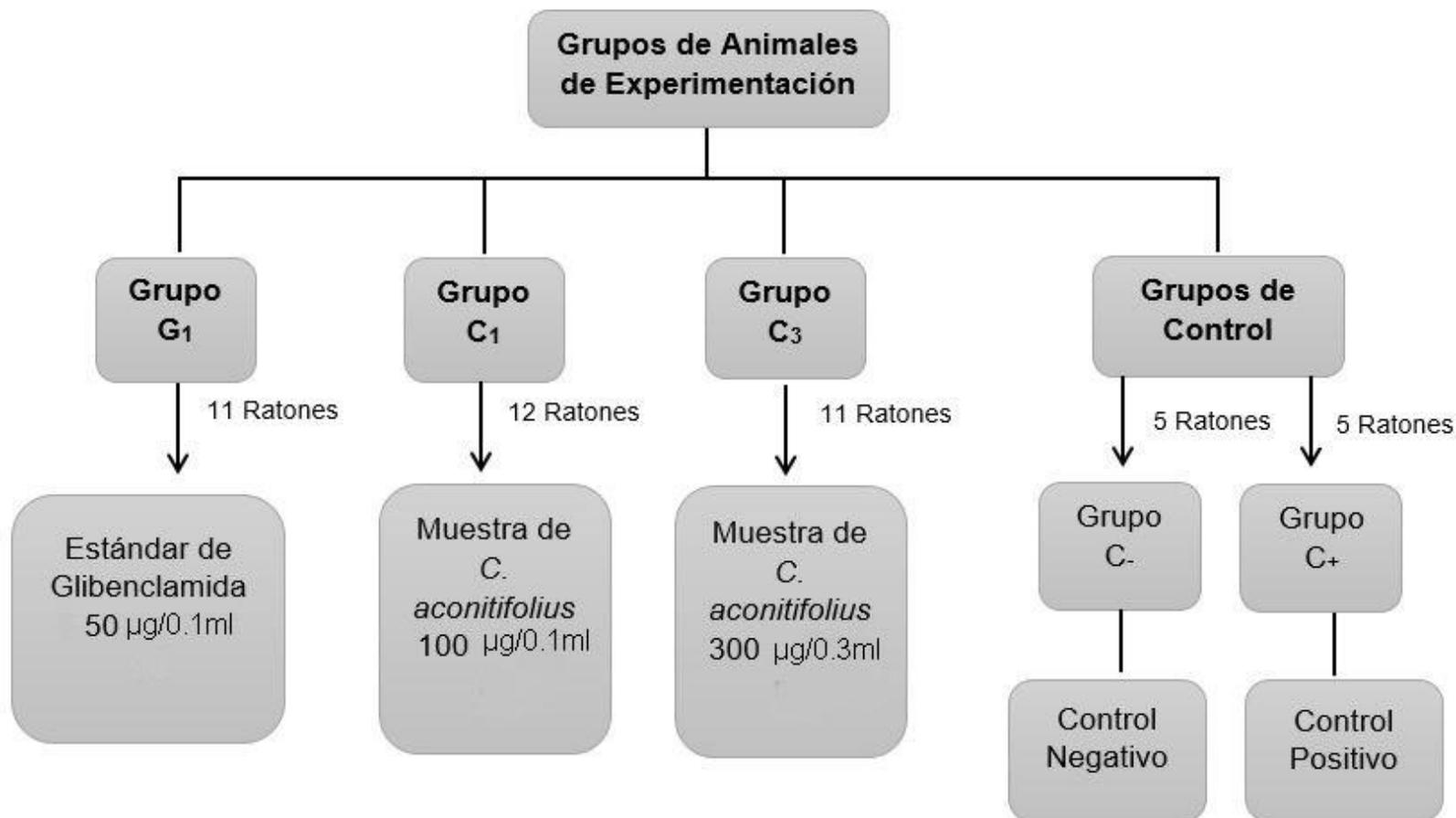


ANEXO 2. Esq. 2: Separación líquido-líquido (Fraccionamiento)





ANEXO 3. Esq. 3: Separación de los Animales de experimentación





ANEXO 4. Imágenes de Ratones de Experimentación Antes, Durante y Después del Estudio.



Fig. 27: Ratones al inicio del estudio.



Fig. 28: Ratones durante el estudio.



Fig. 29: Ratones finalizando el estudio.



Fig. 30: Ratón lisiado por otro ratón del estudio.



ANEXO 5. Procedimiento de Mediciones de Glicemia



Fig. 31: Toma de muestra de sangre.



Fig. 32: Colocación de muestra de sangre en la tira reactiva.



Fig. 33: Nivel de Glicemia más alto encontrado en el estudio.



Fig. 34: Nivel de Glicemia más bajo encontrado en el estudio.



ANEXO 6. Imágenes Misceláneas.



Fig. 35: Hojas de C. aconitifolius antes del secado



Fig. 36: Longitud de hojas de C. aconitifolius



Fig. 37: Inicio de secado de las hojas de C. aconitifolius



Fig. 38: Medición del porcentaje inicial alcohol a utilizar



Fig. 39: Evaporación de extractos de C. aconitifolius



Fig. 40: Separación de las fracciones del extracto de C.



Fig. 41: Camada de ratones de experimentación



Fig. 42: Ratón de experimentación



Fig. 43: Resultado una de las mediciones de niveles de glicemia