



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DE LOS EXTRACTOS
METANÓLICO, HEXÁNICO, Y DE ACETATO DE ETILO DE
Oreocallis grandiflora SOBRE RATONES MEDIANTE EL
MODELO DE ÚLCERA INDUCIDA POR ETANOL/HCl.**

**TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:
PATRICIA ALEXANDRA SISA SANI**

**TUTOR:
BQF. DIEGO VINUEZA**

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTO

En primer lugar deseo agradecer a Dios por permitirme culminar la etapa estudiantil. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, por impartirme sus conocimientos, orientación, formación académica y profesional.

Al BQF. Diego Vinueza, por su asesoramiento durante el desarrollo y culminación de la investigación.

A toda mi familia, de la que de una u otra manera recibí su apoyo incondicional. A mis amigos por su amistad durante toda mi carrera.

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen Santísima que con su sabiduría, fuerza e inspiración pude llevar a cabo esta investigación y culminar un escalón más en mi vida profesional.

A mi madre Narciza que es el pilar fundamental de mi vida, mis abuelos Luis Eduardo y Rosa, quienes han sido mi soporte y apoyo durante toda la vida estudiantil y me formaron como un gran ser humano.

A mis tíos/as Wilson, Gladys, Nancy, Eduardo que con sus consejos y palabras de aliento fueron la inspiración para no darme por vencida y luchar hasta el final y continuar con mis proyectos de vida.

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

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación **ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO, HEXÁNICO, Y DE ACETATO DE ETILO DE *Oreocallis grandiflora* SOBRE RATONES MEDIANTE EL MODELO DE ÚLCERA INDUCIDA POR ETANOL/HCl**, de responsabilidad de la señorita egresada Patricia Alexandra Sisa Sani, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy C. Veloz, M.Sc.
DECANA FAC. CIENCIAS

Dra. Ana K. Albuja Landi, M.Sc.
DIRECTORA DE ESCUELA

BQF. Diego R. Vinueza T., M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Fausto F. Contero B.
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Lic. Karen Acosta, M. Sc
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ab. Bertha Quintanilla
COORDINADOR SISBIB
ESPOCH

NOTA DE TESIS

Yo, **Patricia Alexandra Sisa Sani**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

PATRICIA ALEXANDRA SISA SANI

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I	- 1 -
MARCO TEÓRICO	- 1 -
1. GASTRITIS	- 1 -
1.1. ETIOLOGÍA	- 1 -
1.2 CLASIFICACIÓN.....	- 2 -
1.2.1 GASTRITIS AGUDA.....	- 2 -
1.2.1.1 <i>TRATAMIENTO</i>	- 2 -
1.2.2 GASTRITIS HEMORRÁGICA	- 3 -
1.2.2.1 <i>CAUSAS</i>	- 3 -
1.2.3 GASTRITIS CRÓNICA	- 4 -
1.2.3.1 TRATAMIENTO DE LA GASTRITIS CRONICA	- 4 -
1.2.4 GASTRITIS TIPO A O FÚNDICA	- 4 -
1.2.5 GASTRITIS TIPO B	- 5 -
1.2.6 ENFERMEDAD DE MENÉTRIER.....	- 5 -
1.2.7 GASTRITIS LINFOCÍTICA	- 5 -
1.2.8 GASTRITIS EOSINOFÍLICA.....	- 6 -
1.2.8.1 TRATAMIENTO	- 6 -
1.2.9 GASTRITIS GRANUMOLATOSA	- 6 -
1.3 ÚLCERA PÉPTICA	- 7 -
1.3.1 SÍNTOMAS	- 8 -
1.3.2 FISIOLOGÍA GÁSTRICA	- 8 -

1.3.3	TRATAMIENTO	8 -
1.4	<i>Helicobacter pylori</i> EN LA ENFERMEDAD ÚLCERO PÉPTICA.....	10 -
1.5	ÚLCERA GÁSTRICA.....	10 -
1.5.1	CLASIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN.....	10 -
1.5.2	TERAPÉUTICA DE LA ÚLCERA GÁSTRICA.	11 -
1.5.2.1	ANTIÁCIDOS.....	11 -
1.5.2.2	ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS.....	11 -
1.5.2.3	ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES H ₂	12 -
1.5.2.4	CITOPROTECTORES	12 -
1.5.2.5	INHIBIDORES DE LA H ⁺ -K ⁺ -ATPASA	13 -
1.6	USO DE PLANTAS PARA ERRADICAR EL <i>H. pylori</i>.....	13 -
1.7	OMEPRAZOL.....	13 -
1.7.1	EFFECTOS SECUNDARIOS Y TOXICIDAD	14 -
1.8	REACTIVO BIOLÓGICO	14 -
1.8.1	Ratón <i>Mus musculus</i>	14 -
1.8.2	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA <i>Mus musculus</i>	15 -
1.8.3	DIGESTIÓN Y METABOLISMO	15 -
1.8.4	VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	16 -
1.9	METABOLITOS DE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA	16 -
1.9.1	POLIFENOLES.....	17 -
1.9.2	FLAVONOIDES	17 -
1.10	<i>Oreocallis grandiflora</i>.....	18 -
1.10.1	TAXONOMÍA DE <i>O. grandiflora</i>	19 -
1.10.2	DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA.....	19 -
1.10.3	USOS	19 -
1.10.4	HISTORIA DE <i>O. grandiflora</i>	20 -
	CAPÍTULO II	47 -
	PARTE EXPERIMENTAL	47 -
2.	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.....	47 -
2.1	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	47 -
2.1.1	MATERIAL MATERIA PRIMA.....	47 -
2.1.2	REACTIVO BIOLÓGICO	47 -
2.1.2.1	DESCRIPCIÓN.....	47 -
2.1.3	MATERIALES Y EQUIPOS.....	48 -

2.1.4	REACTIVOS.....	- 49 -
2.2	TÉCNICAS Y MÉTODOS.....	- 50 -
2.2.1	CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA	- 50 -
2.2.2	CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO	- 50 -
2.2.3	TAMIZAJE FITOQUÍMICO	- 51 -
2.2.4	Obtención de los extractos de <i>O. grandiflora</i>	- 55 -
2.2.5	Preparación de los animales de experimentación, ratones (<i>Mus musculus</i>) ..	- 55 -
2.2.6	Aplicación del tratamiento	- 56 -
2.2.6.1	DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	- 57 -
2.2.6.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	- 57 -
2.2.7	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	- 58 -
2.2.8	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	- 58 -
	CAPITULO III	- 59 -
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 59 -
3.	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DROGA CRUDA.	- 59 -
3.1.	PREPARACIÓN DE LA DROGA CRUDA	- 59 -
3.2	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS.....	- 60 -
3.3	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	- 61 -
3.4	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	- 62 -
3.5	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	- 64 -
	CONCLUSIONES	- 67 -
	RECOMENDACIONES	- 68 -
	BIBLIOGRAFÍA	- 69 -
	ANEXOS	- 73 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
°C	Grado Celsius
g	Gramo
Kg	Kilogramo
ml	Mililitro
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo por kilogramo de peso
mm	Milímetro
min	Minuto
OMS	Organización Mundial de la Salud
SOLCA	Sociedad de Lucha Contra el Cáncer
RPM	Revoluciones por minuto
P/V	Peso volumen
NRSP	Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas.
PGS	Prostaglandinas
LAMG	Lesiones agudas sobre la mucosa gástrica
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
HCl	Ácido clorhídrico

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Control de calidad. Laboratorio de productos naturales ESPOCH.....	73
ANEXO No. 2	Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico <i>Oreocallis grandiflora</i>	74
ANEXO No. 3	Preparación de los extractos hexánico, metanólico y acetato de etilo.....	74
ANEXO No. 4	Administración y disección del animal de experimentación.....	74
ANEXO No. 5	Índice de refracción de sólidos solubles.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Protocolo de Experimentación.....	56
CUADRO No. 2	Control de calidad de la planta seca de <i>Oreocallis grandiflora</i> . Laboratorio de productos naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Octubre 2014.....	58
CUADRO No. 3	Determinación de los parámetros físico químicos del extracto hidroalcohólico de <i>Oreocallis grandiflora</i> . Laboratorio de productos naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Octubre 2014.....	59
CUADRO No. 4	Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>Oreocallis grandiflora</i> . Laboratorio de productos naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Octubre del 2014.....	60
CUADRO No. 5	Grado de ulceración en los animales de experimentación. Diciembre 2014.....	62
CUADRO No. 6	Porcentaje de protección de la lesión gástrica en los animales de experimentación. Diciembre 2014.....	63
CUADRO No. 7	Protocolo histopatológico de ratones <i>Mus musculus</i> a los q se les administro diferentes extractos de la planta <i>Oreocallis grandiflora</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Ubicación del tipo de Úlceras.....	11
FIGURA No. 2	Esquema de los metabolitos secundarios.....	51
FIGURA No. 3	Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico.....	52
FIGURA No. 4	Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.....	53

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Ratón (<i>Mus musculus</i>).....	14
FOTOGRAFÍA No. 2	<i>Oreocallis grandiflora</i>	18
FOTOGRAFÍA No. 3	Materia prima <i>Oreocallis grandiflora</i>	73
FOTOGRAFÍA No. 4	Determinación de la humedad de la droga cruda de <i>Oreocallis grandiflora</i>	73
FOTOGRAFÍA No. 5	Determinación de cenizas de la droga <i>Oreocallis grandiflora</i>	73
FOTOGRAFÍA No. 6	Extracto metanólico 50 mg/ml.....	75
FOTOGRAFÍA No. 7	Extracto metanólico 25 mg/ml.....	75
FOTOGRAFÍA No. 8	Extracto acetato de etilo 100 mg/ml.....	75
FOTOGRAFÍA No. 9	Extracto acetato de etilo 50 mg/ml.....	76
FOTOGRAFÍA No.10	Extracto hexánico 50 mg/ml.....	76
FOTOGRAFÍA No.11	Extracto hexánico 50 mg/ml.....	76
FOTOGRAFÍA No.12	Extracto hexánico 25mg/ml.....	77
FOTOGRAFÍA No.13	Control positivo omeprazol 30 mg/kg.....	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Porcentaje de protección de la lesión gástrica y comparación entre dosis y concentración de los diferentes extractos de <i>Oreocallis grandiflora</i>	65
---------------	---	----

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Características más relevantes de las gastritis crónicas según la clasificación del sistema Sydney.....	7
TABLA No. 2	Fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad úlcero-péptica.....	10
TABLA No. 3	Taxonomía del ratón (<i>Mus musculus</i>).....	16

RESUMEN

Se evaluó la actividad gastroprotectora de los extractos metanólico, hexánico y de acetato de etilo de cucharilla (*Oreocallis grandiflora*) mediante el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol/HCl en ratones (*Mus musculus*) machos, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Guayaquil. Aplicando los tratamientos administrados en bloques al azar fueron: tres dosis (25, 50 y 100 mg/kg) de los diferentes extractos, un control positivo de omeprazol (30 mg/kg) y un control negativo al que se administró la solución utilizada como vehículo (polisorbato 80, 1 % p/v). Los extractos fueron obtenidos mediante maceración dinámica (1000 rpm) seguida de sonicación (15 minutos) con posterior evaporación bajo condiciones controladas (100 rpm, 60 °C), partiendo cada vez de 20 g de inflorescencias de la planta *Oreocallis grandiflora* con 80 ml de cada solvente extractivo. Se observaron resultados que demuestran una eficacia significativa a nivel macroscópico, hecho que después de la aplicación de las pruebas del análisis estadístico (ANOVA y DUNNET $p < 0,05$) son significativas, siendo el extracto metanólico (100 % de protección a la lesión gástrica) el que implica mejores resultados, sin embargo no serían despreciables los efectos debidos a los extractos hexánico y de acetato de etilo, dado que exhiben un porcentaje de protección a la lesión gástrica superior al 97 %. A nivel microscópico, el estudio realizado por un médico patólogo corroboró los resultados anteriormente indicados. El estudio fitoquímico determinó la presencia mayoritaria de compuestos tipo flavonoide, seguidos de compuestos fenólicos, triterpenos, quinonas y lactonas. La investigación realizada origina nuevas perspectivas de estudio acerca de esta especie vegetal promisoría en el campo de aplicación de las ciencias de la vida y el cambio de la matriz productiva del país.

SUMMARY

Gastro protective activity of methanol extracts, hexane and ethyl acetate *cucharila* (*Oreocallis grandiflora*) was assessed using the model of gastric ulcer induced by ethanol/HCl in mice (*Mus musculus*) males from the National Research Institute Public Health Bioterio (NRIPH) in Guayaquil. By applying the treatments administered in randomized blocks were three doses (25, 50 and 100 mg/kg) of different extracts, positive control of omeprazol (30 mg/kg) and a negative control that was administered the solution used as a vehicle (polysorbate 80.1% w/v). Extracts were obtained by dynamic maceration (1000 rpm), followed by sonication (15 minutes) with subsequent evaporation under controlled conditions (100 rpm, 60°C), starting each time 20 g of inflorescences *grandiflora* *Oreocallis* plant with 80 ml each solvent extraction. Results demonstrating significant efficacy at the macroscopic level, the fact that after application of the test statistical analysis (ANOVA and DUNNET $p < 0.05$) are significant, with the methanol extract (100% protection of the gastric lesion was observed) implying better results, however not be negligible effects due to hexanicos and ethyl acetate extracts, as percentage protection exhibit superior gastric lesion to 97%. At the microscopic level, the study be a pathologist confirmed the above results. The phytochemical study found the majority presence of flavonoid-like compounds, followed by phenolic compounds, triterpenes, quinones and lactones. Research conducted study leads to new perspectives on this promising plant species in the scope of life sciences and changing the productive matrix of the country.

INTRODUCCIÓN

Las úlceras del tracto gastrointestinal son causadas por la acción agresiva del ácido clorhídrico y la pepsina sobre la mucosa; sin embargo, este tipo de lesiones pueden ser ocasionadas por múltiples factores ya sean defensivos (secreción de bicarbonato, secreción de moco, secreción de prostaglandinas, etc.) o agresivos (secreción de ácido, pepsina, infección por *Helicobacter pylori*) y su mayor incidencia se debe al consumo excesivo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (VASCONCELOS, PC., etal, 2008).

Las enfermedades gastrointestinales se encuentran entre las 10 primeras causas de mortalidad a nivel mundial; ocupando el octavo lugar las enfermedades digestivas que afectan principalmente a personas de la tercera edad, (Organización Mundial de la Salud) 2008, determinando que aproximadamente el 9 % de las muertes a nivel mundial son debidas a esta patología. Según el INEC en el Ecuador para el año 2011 la tasa de mortalidad es de 4.08 % por cada 1 000 habitantes (SIISE, 2011). Siendo una enfermedad frecuente la úlcera gástrica que afecta el 3 % de la población. Es más usual en el hombre siendo su mayor incidencia en las edades de 46 a 65 años (GARIBA, Ricardo Raña, 2009).

Se presume que para el año 2020 la población mundial habrá alcanzado la cifra de 7500 millones de habitantes de los cuales el 75 % vivirá en países en vías de desarrollo, que hoy consume menos del 15 % del mercado farmacéutico, lo que hace suponer que esta masa poblacional buscará cada vez más plantas medicinales como principal recurso terapéutico para satisfacer sus necesidades de salud (ATAL, CK., y BM, Kapur, 1982).

En la actualidad, el tratamiento farmacéutico de un paciente con úlceras gastrointestinales implica un costo muy elevado. Por ello, es necesario buscar alternativas más económicas que ayuden a mejorar o aliviar los síntomas de las personas que padecen esta patología. Así, exploramos el potencial etnobotánico de nuestro país minimizando gastos y evitando reacciones adversas que pueden ocasionar estos fármacos mejorando la calidad de vida del paciente y su entorno.

Los metabolitos secundarios de origen vegetal de más importancia para tratamiento de úlceras son los compuestos fenólicos, especialmente, los flavonoides por que se ha comprobado que tienen acción protectora de la mucosa gástrica, dentro de estos compuestos están la quercetina y rutina, los cuales son considerados protectores celulares contra los rayos ultravioleta, virus, hongos, entre otros. A la vez, se conoce su actividad como atrapadores de radicales libres y antioxidante. (BEIL, 1995).

La planta en la cual se centra este estudio es *Oreocallis grandiflora* por su gran importancia en la medicina tradicional. Entre sus usos etnobotánicos se encuentran el alivio del dolor de cabeza, dolor hepático, diabetes, fiebre entre otros, las partes más utilizadas son las hojas, corteza y la flor estos usos vienen ancestralmente.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica y Bioterio de la Facultad de Ciencias, se utilizaron los extractos: metanólico, hexánico y acetato de etilo de *Oreocallis grandiflora* obtenidos mediante el método de maceración y evaporación. Para evaluar su actividad gastroprotectora, se tomó como guía el modelo de úlcera inducida por etanol/HCl (LEMOS., 2011). En la aplicación de los tratamientos se utilizaron ratones machos de un peso promedio de 27 ± 5 gramos. Las dosis a administrar fueron: 25, 50, 100 mg/kg de los extractos crudos preparados a partir de la droga vegetal; lográndose determinar un resultado positivo, el cual posteriormente fue corroborado por el criterio emitido en el análisis histopatológico.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. GASTRITIS

Es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica producida por factores exógenos y endógenos que produce síntomas dispépticos atribuibles a la enfermedad, los cuales se sospecha clínicamente y la confirmación histológica (VALDIVIA, 2011).

1.1. ETIOLOGÍA

FACTORES EXÓGENOS

- Helicobacter pylori y otras infecciones
- AINES
- Irritantes gástricos
- Drogas
- Alcohol
- Tabaco
- Cáusticos
- Radiación

FACTORES ENDÓGENOS

- Ácido Gástrico y pepsina
- Bilis
- Jugo pancreático
- Urea (Uremia)
- Inmunes (VALDIVIA, 2011).

1.2 CLASIFICACIÓN

La gastritis se clasifica en: aguda, crónica, hemorrágica, fúndica, enfermedad de Menétrier.

1.2.1 GASTRITIS AGUDA

Es una inflamación transitoria de la mucosa que se produce por varias causas como es el consumo de alcohol o cigarrillos, el uso de AINES, entre otros. Esta inflamación puede cambiar a un estado severo dando lugar a la presencia de eritema, una erosión y ulceración de la mucosa gástrica. En los casos leves en el diagnóstico microscópico se observa una congestión capilar de la lámina propia y datos de infiltrado neutrófilo.

Sobre la ulceración aguda de la mucosa, esta puede ocurrir en el marco de cualquiera de las causas de gastritis aguda que se han mencionada anteriormente. Algunas úlceras agudas específicas se han descrito en situaciones de estrés fisiológico importante, como es el caso de sepsis, trauma, shock, quemaduras severas, enfermedades intracraneales (VACAS, M., 2014).

1.2.1.1 TRATAMIENTO

Existen varias opciones para tratar esta gastritis ya que en algunos casos no necesita tratamiento, siendo importante evitar los alimentos irritantes o sustancias como los antiinflamatorios que ocasionan daño a la mucosa gástrica.

Para la prevención de la aparición de la gastritis se utilizan fármacos como: Los antiácidos y los antagonistas H₂.

La principal función de estos fármacos es mantener un pH en el estómago no tan ácido, sin embargo, esto tiene un inconveniente, pues al disminuir la acidez se favorece que puedan crecer bacterias que produzcan otro tipo de infecciones, como las infecciones pulmonares.

Cuando aparecen complicaciones como la hemorragia digestiva es necesaria la realización de una gastroscopia, aunque la mayoría de las veces la hemorragia cede de forma espontánea sin necesidad de realizar pruebas invasivas (VACAS, M., 2014).

1.2.2 GASTRITIS HEMORRÁGICA

Es una inflamación frecuente de la gastritis aguda a menudo grave, que presentan lesiones agudas sobre la mucosa gástrica (LAMG), con erosiones y úlceras múltiples superficiales agudas de la mucosa gástrica extendidas por el cuerpo y el antro junto a zonas de mucosa congestiva y con pequeñas petequias. Al realizar una endoscopia se observan erosiones múltiples, superficiales con sangrado activo en forma de babeo, mucosa eritematosa alternando con zonas pálidas (ABREU, 2007).

1.2.2.1 CAUSAS

Dentro de las causas de la gastritis hemorrágica se hallan:

- La ingesta de fármacos (aspirina y AINES): La existencia de estas lesiones agudas presupone el desarrollo posterior de ulceración o complicación grave. En estos casos se utiliza como criterio endoscópico diferenciador el tamaño de la lesión, ya que como norma tienen un tamaño superior a 5 mm.
- Tratamientos radioterápicos: Estos causan lesiones ulcerosas solitarias, por lo general son pequeñas y de localización antral.
- Lesión directa del epitelio gástrico por agentes tóxicos (alcohol, drogas, agentes químicos): Estos agentes pueden provocar lesiones en la mucosa gástrica, preferentemente focos de hemorragia subepiteliales y erosiones ampliamente distribuidas por la superficie gástrica.
- Hipoxia o hipoperfusión de la mucosa gástrica en situaciones de shock hipovolémico o stress grave: Existe la presencia de erosiones superficiales de la mucosa gástrica, generalmente se trata de lesiones múltiples. Este tipo de lesiones cicatrizan espontáneamente y la hemorragia que producen es auto limitada.
- Agentes infecciosos: La mayor parte de los casos son observados en pacientes inmune deprimidos, el agente causal más común es el citomegalovirus

- Reflujo biliar: La patogenia de esta gastritis es multifactorial, implicándose tanto el reflujo biliar, como fenómenos isquémicos_(ABREU, 2007)

1.2.3 GASTRITIS CRÓNICA

Este tipo de gastritis es causada en un 80% de los casos por *Helicobacter pylori* y un 10 % es producida por la gastritis auto-inmunitaria, incluyendo otros factores como el consumo de irritantes, uso crónico de AINES, estrés psicológico, etc. Su evolución es progresiva, por lo que las lesiones inflamatorias superficiales de la mucosa gástrica pueden terminar en atrofia.

1.2.3.1 TRATAMIENTO DE LA GASTRITIS CRONICA

Es importante evitar alimentos irritantes y antiinflamatorios, en la gastritis atrófica producida por *H. pylori* es necesario un tratamiento con antibióticos la cual consiste en una asociación de inhibidores de la bomba de protones como el omeprazol con amoxicilina y claritromicina por 7 a 10 días.

La dosificación oral con omeprazol 20 mg una vez al día produce una rápida y efectiva inhibición de la secreción ácida gástrica diurna y nocturna, consiguiéndose un efecto máximo en los 4 primeros días de tratamiento.

En pacientes con úlcera duodenal se mantiene a partir de este momento un descenso medio de acidez intragástrica de 24 horas con omeprazol 20 mg de, al menos, un 80%, con una reducción media de la excreción ácida máxima tras la estimulación con pentagastrina de alrededor del 70% a las 24 horas de la administración. La dosificación oral con omeprazol 20 mg mantiene un pH intragástrico >3 durante un tiempo medio de 17 horas en un periodo de 24 horas en pacientes con úlcera duodenal.

1.2.4 GASTRITIS TIPO A O FÚNDICA

Es un tipo de gastritis muy poco frecuente, en la cual la inflamación afecta al cuerpo y al fundus, siendo esta la causante de la anemia perniciosa que se produce por la deficiencia de vitamina B12 y el debilitamiento de la pared del estómago. Este tipo de gastritis predispone a desarrollar un cáncer de estómago (VACAS, M., 2014).

1.2.5 GASTRITIS TIPO B

Es el tipo de gastritis más común, la cual afecta a la porción inferior del estómago cercana al píloro, denominada antro la cual se presenta en personas jóvenes o en su totalidad el estómago de los ancianos, la causa principal es la infección crónica por la bacteria *H. pylori*. Este tipo de gastritis también predispone a tener mayor riesgo de cáncer (fundamentalmente los tipos adenocarcinoma tipo intestinal y linfoma MALT) (VACAS, M., 2014).

1.2.6 ENFERMEDAD DE MENÉTRIER

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de pliegues en la pared del estómago los cuales son engrosados, en este tipo de gastritis se produce una disminución de la secreción ácida y un aumento de la secreción de moco. Los síntomas que se pueden observar son dolor abdominal, pérdida de peso, niveles bajos de la proteína albúmina en sangre, anemia y edemas.

Existe un mayor riesgo de úlceras y cáncer gástrico El diagnóstico se realiza mediante endoscopia y biopsia de la mucosa gástrica. El tratamiento específico para este tipo de gastritis es la utilización de anticolinérgicos, corticoides y agonistas H2. (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

Además de la enfermedad de Menétrier, existen otros tipos especiales de gastritis:

- Gastritis por agentes corrosivos
- Gastritis infecciosa
- Gastritis eosinofílica
- Gastritis granulomatosa
- Gastritis linfocítica

1.2.7 GASTRITIS LINFOCÍTICA

Esta gastritis se caracteriza por la presencia de abundantes linfocitos los cuales están localizados entre las células epiteliales de las foveolas y cuellos glandulares. Esta infiltración puede no asociarse a lesiones macroscópicas definidas o la vez asociarse con erosiones crónicas con el patrón endoscópico asociado a la gastritis varioliforme.

La etiología de este tipo de gastritis es desconocida. (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

1.2.8 GASTRITIS EOSINOFÍLICA

Es la afectación gástrica denominada gastroenteritis eosinofílica, la cual afecta la región antral del estómago produciendo un enlentecimiento del vaciamiento gástrico con es náuseas y vómitos y presentando anemia secundaria (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004).

1.2.8.1 TRATAMIENTO

En este tipo de gastritis se utilizan fármacos como son los corticosteroides para controlar los síntomas, requiriendo algunos pacientes tratamiento quirúrgico por presentar una obstrucción pilórica persistente y refractaria al tratamiento médico. (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

1.2.9 GASTRITIS GRANUMOLATOSA

Es producida por la inflamación crónica granulomatosa la cual está asociada con enfermedades sistémicas como la tuberculosis, sífilis o la enfermedad de Crohn, esta se presenta notablemente en pacientes inmunodeprimidos. Este tipo de gastritis afecta con mayor frecuencia al antro produciendo un engrosamiento de los pliegues gástricos con un estrechamiento de la luz.

Los síntomas dependerán del grado de afección, presentando dolor, anemia ferropénica y hemorragia digestiva alta si hay úlceras, también suelen aparecer vómitos. El tratamiento específico es el de la causa que la produce (tuberculosis, sífilis, parásitos, sarcoidosis). Como terapia sintomática se utilizan los anti-secretorios y los cito protectores gástricos. (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

TABLA N°1: CARACTERÍSTICAS MÁS RELEVANTES DE LAS GASTRITIS CRÓNICAS SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DEL SISTEMA SYDNEY.

	NO ATROFICA		ATROFICA
	ANTRAL	AUTOINMUNE	MULTIFOCAL
	DIFUSA		
Topografía	Antro	Cuerpo, fundus	Antro, cuerpo, fundus
Histopatología	Infiltrado linfoide	Atrofia, metaplasia, displasia	Atrofia, metaplasia, displasia
Predisposición genética	No aclarado	Autosómica dominante	Autosómica recesiva
Distribución	Centros urbanos	Norte de Europa	China, Japón, Norte de Europa, Andes
Úlcera péptica	Duodenal o pilórica	No	Gástrica alta
Etiología	H. pylori	Genética autoinmune	H. pylori, dieta
Secreción ácido-péptica	Aumentada	Disminuida	Disminuida
Gastrinemia	Normal o leve aumento	Disminuida	Disminuida
Riesgo de carcinoma	No	Elevado	Elevado

FUENTE: (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

1.3 ÚLCERA PÉPTICA

La úlcera péptica es una enfermedad que se puede dar a partir de muchas causas. Es caracterizada desde el punto de vista anatómo-patológico por una lesión localizada de la mucosa del estómago o del duodeno que se extiende hasta la muscularis mucosae. Esta patogenia está relacionada con el consumo excesivo de medicamentos como son

los AINEs, al tabaquismo, estrés, *H. pylori*, entre otros factores. (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

No hay conocimientos respecto a las causas que ocasiona la ulcera péptica por lo que se le atribuye que *H. pylori* desempeña un papel fundamental y son necesarios el ácido y pepsina y el resultado de la ulcera péptica depende del equilibrio entre estos factores. La aparición de la ulcera se da cuando las defensas de la mucosa gastroduodenal son incapaces de proteger el epitelio de la mucosa por lo que es necesario comprender la fisiología gástrica. (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

1.3.1 SÍNTOMAS

El síntoma principal que puede presentar un paciente es una sensación de malestar en la zona central del abdomen o acidez en el estómago, siendo así menos frecuentes náuseas y vómitos; ésta puede llegar a complicarse presentado hemorragia digestiva, perforación, estenosis; es decir, cicatrices de ulceras que pueden impedir el paso del alimento (PRADOS, Martin de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004).

1.3.2 FISIOLOGÍA GÁSTRICA

La mucosa secreta ácido siendo las células parietales localizadas en las glándulas mucosas del cuerpo y fondo gástrico las que segregan ácido clorhídrico mediante un proceso de fosforilación oxidativa el cual consiste ion de hidrogeno con un ion de cloruro liberando así bicarbonato a la circulación venosa gástrica cuando el hidrógeno es segregado a la luz del estómago. En esta regulación de la secreción acida gástrica intervienen factores químicos, hormonales y nerviosos la misma que estimulada por la gastrina y fibras vagales pos-ganglionares. El principal estímulo fisiológico de la secreción ácida es la ingestión de alimentos por lo que la regulación de la secreción ácida del estómago se ha dividido en tres fases: cefálica, gástrica e intestinal (HARRISON, 1998).

1.3.3 TRATAMIENTO

La infección por *H. pylori* se trata con combinación de tres medicamentos un IBP y dos antibióticos por siete días esto resulta el 80 % de eficaz en la eliminación, pero si es

resistente se utiliza un IBP y dos antimicrobianos con el cual se logra la eliminación casi total. Por consumo excesivo de los AINEs y otros factores, se debe suspender el tratamiento con estos fármacos, para lograr una cicatrización empleando el IBP (PRADOS, Martín de Argila., & MIQUEL, Boixeda , 2004)

TABLA N° 2. FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ÚLCERO-PÉPTICA.

FARMACO	DOSIFICACION	FORMULACION
<i>Antagonistas H2</i>	8-10mg/kg/día cada 12h	Comprimidos 150 y
Ranitidina	máximo 150mg 2 dosis al día	300mg comprimidos efervescentes 150 y 300mg
<i>Inhibidores bomba de protones</i>		
Omeprazol	1mg/kg/día(0.7-3.3mg/k/d) Máximo 20mg 2 dosis al día	Comprimidos de 20mg y 40 mg
Lansoprazol	15mg < 30 kg	Capsulas y comprimidos bucodispersables 15 y 30 mg
Pantoprazol	30mg>30kg	mg
Esomeprazol	0.6-0.9mg/kg/d Dosis máxima 40mg al día 1-11 años 10mg<20kg 10-20mg>20kg 12-17 años 20-40mg	Comprimidos de 20 y 40 mg 40mg Sobres 10 mg Comprimidos de 20 y 40 mg Comprimidos gastroresistentes (mups) 20 y 40 mg
<i>Agentes citoprotectores</i>		
Sucralfato	40-80mg/kg/día Máximo 1 gramo 4 dosis al día	Tabletas 1 gramo Sobres 5ml/1 gramo

FUENTE: (CROOM, Kf, 2005)

1.4 *Helicobacter pylori* EN LA ENFERMEDAD ÚLCERO PÉPTICA.

Trabajos realizados en los últimos años, han establecido que el factor de mayor riesgo en la etiología de la úlcera péptica, es la infección por la bacteria *H. pylori*. Se ha observado que un 95 a 100% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal, se encuentran infectados por *H. pylori*. Esta bacteria, un bacilo gram negativo, se sitúa en el microambiente neutral existente entre el mucus producido por la mucosa y la superficie del epitelio del estómago. *H. pylori* posee una gran actividad de tipo ureasa, lo que le permite metabolizar la urea en amoníaco, haciendo que la bacteria resista el medio ácido y colonice la mucosa. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud clasificó al *H. pylori* como carcinógeno humano del tipo I. A pesar de ello, sólo un pequeño número de niños infectados con *H. pylori* desarrolla úlceras pépticas en la etapa adulta de su vida. (ALBORNOZ, Olga, 2004).

Investigaciones recientes realizadas en ratones, han mostrado que existiría una cepa de *H. pylori* portadora de un gen que la hace extremadamente tóxica, y que induciría el apareamiento de úlceras en la mucosa gástrica. Esta misma cepa retrasa la curación de las lesiones, debido a que disminuye la microcirculación en la zona ulcerada, lo que provoca una prolongada inflamación de la zona afectada. Trabajos realizados en ratones infectados, a los que se les induce una úlcera crónica, muestran que la amoxicilina, a dosis de 10 mg/kg/día, por cinco días, erradica el microorganismo y promueve la curación de la lesión (ALBORNOZ, Olga, 2004)

1.5 ÚLCERA GÁSTRICA

Este tipo de ulcera se encuentra en la mucosa que recubre el antro la más cercana al píloro y en la curvatura menor del estómago. La presencia de ácido es esencial para la producción de la úlcera. De ahí que la coexistencia de un cráter ulceroso y aclorhidria suscite la sospecha de una neoplasia (FUENTES, Carmen., y ELIA, Patricia).

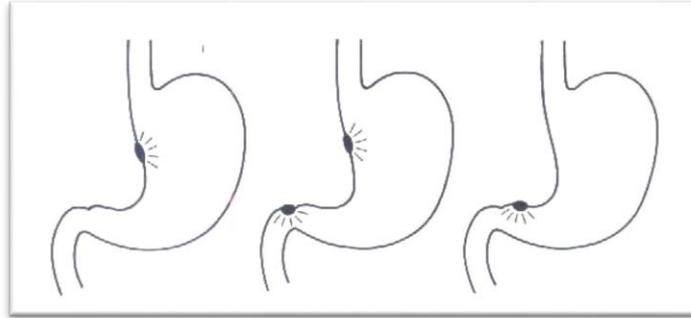
1.5.1 CLASIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN

Se diferencian diversos tipos de úlceras a los cuales se les atribuye diferentes causas:

- Tipo I: Localizado en curvatura menor y cursa con hipoacidez. Meeroff las denomina tróficas.

- Tipo II: De la curvatura menor. Asociada con úlceras del duodeno.
- Tipo III: Se localiza cerca del píloro y se comportan como las úlceras del duodeno.

Las úlceras gástricas crónicas suelen ser únicas, pero en menos del 5 % hay úlceras simultáneas. (WAYAR, Sergio, 2003).



FUENTE: (WAYAR, Sergio, 2003).

Fig. 1 Ubicación del tipo de Úlceras

1.5.2 TERAPÉUTICA DE LA ÚLCERA GÁSTRICA.

Los fármacos para combatir la úlcera gástrica están dirigidos a reducir o inhibir la secreción ácida en el estómago y a promover los mecanismos protectores de la mucosa gástrica, por ejemplo, aumentar la secreción de mucus, bicarbonato y flujo sanguíneo.

1.5.2.1 ANTIÁCIDOS

Los antiácidos gástricos son sustancias alcalinas, que neutralizan o remueven el ácido clorhídrico del contenido gástrico. Entre los antiácidos disponemos de los aniónicos básicos (carbonato, bicarbonato, citrato y trisilicato), con efectividad sintomática, pero con efectos secundarios. También se hallan las sales no absorbibles de hidróxido de magnesio, aluminio y calcio, con metales di o trivalentes, con una capacidad mayor de neutralización y menores efectos secundarios. (ALBORNOZ, Olga, 2004)

1.5.2.2 ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS

A nivel antral, el nervio vago estimula la secreción de gastrina, la cual actúa sobre células cromafines, promoviendo la liberación de histamina, la que actúa sobre la célula

parietal aumentando la secreción de ácido clorhídrico. Estos efectos pueden ser bloqueados por antagonistas muscarínicos M1. Entre los agentes nuevos, que antagonizan selectivamente con los receptores M1, está la pirenzepina. La eficacia de esta droga se aproxima a la Cimetidina cuando se administra en dosis 100 mg/ día. (ALBORNOZ, Olga, 2004)

1.5.2.3 ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES H₂

La célula parietal presenta un receptor de histamina de tipo H₂, que al unirse a histamina o agonistas H₂, se activa y estimula a las células parietales para secretar ácido clorhídrico. Este receptor puede ser bloqueado selectivamente por antagonistas H₂ (A-RH₂). Los A-RH₂, los mismos que inhiben la secreción de ácido provocada por gastrina y agonistas muscarínicos.

Dentro de los A-RH₂ están la Cimetidina (inhibe la producción de HCl hasta un 88 %) y la Ranitidina (cuatro a seis veces más potente que la cimetidina). Un A-RH₂ más reciente es la Famotidina, el más potente que se conoce, 34 veces más potente que la Cimetidina y 9 veces más que la Ranitidina. Actualmente siguen apareciendo drogas de acción similar a la Famotidina, como la Nizatidina y la Ebrotidina (ALBORNOZ, Olga, 2004)

1.5.2.4 CITOPROTECTORES

La mucosa gástrica cuando está expuesta a la acidez luminal, secreta mucus y bicarbonato (HCO₃⁻), acción conocida como cito protección, la misma que esta mediada por la síntesis de prostaglandinas (PGS) de tipo E₂ e I₂, secretadas por la propia mucosa gástrica.

Las PGs estimulan la secreción de (HCO₃⁻), y mucus, aumentando también el flujo sanguíneo de la mucosa del estómago, lo que permite la disipación de carga. Está demostrado que las PGS protegen la mucosa gástrica contra varios agentes ulcerogénicos, efecto que ha sido atribuido al fortalecimiento de la barrera mucosa.

Considerando esta acción de las PGS, y que la vida media de estas moléculas es extremadamente corta, se han desarrollado análogos estructurales de metabolización más lenta. La droga de este tipo disponible actualmente es el Misoprostol. (ALBORNOZ, Olga, 2004)

1.5.2.5 INHIBIDORES DE LA H^+K^+ ATPASA

El primer compuesto de este grupo fue el Omeprazol, que es un benzimidazol sustituido. Este compuesto tiene un grupo sulfinil, el cual es protonado en medio ácido originando una sulfonamida, que reacciona en forma covalente con los grupos sulfhidrilos de cisteínas ubicadas en la porción extracelular de la subunidad α de la bomba H^+K^+ ATPASA. Ello hace que la bomba de protones quede inhibida irreversiblemente.

Omeprazol, en dosis de 20 mg/día, reduce en un 65 % la secreción ácida a la 4-6 horas, y su administración diaria tiene efecto acumulativo. Así, a los cuatro días, la inhibición es de 80 % y a la semana puede llegar a un 92 %. El uso prolongado de Omeprazol conduce al aumento de la secreción de gastrina, lo que ocasiona la hiperplasia de las células enterocromafines que secretan histamina. (ALBORNOZ, Olga, 2004)

1.6 USO DE PLANTAS MEDICINALES PARA ERRADICAR EL *H. pylori*

Existen diversos estudios sobre el uso de plantas medicinales en contra del *H. pylori*, sin embargo, se trata en su mayoría de estudios preliminares, realizados in vitro, lo cual resulta comprensible, como decía al inicio, pues la gran mayoría de los recursos de investigación están volcados en el área de la farmacología.

Investigadores del mismo Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, comentan que se han reportado, a nivel mundial, una gran variedad de compuestos con actividad anti-*H. pylori* in vitro, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad in vivo (PALACIOS, Francisco., et al., 2011).

1.7 OMEPRAZOL

El omeprazol es un derivado bencilimidazólico sustituido, con alta potencia y selectividad en su acción inhibitoria de la secreción ácida gástrica.

Algunos fármacos anti-ulcerosos cuyo mecanismo único de actuación para reducir la secreción ácida es la inhibición de la enzima hidrógeno/potasio adenosina trifosfatasa o (H^+/K^+) ATPasa gástrica (enzima inhibitoria de la bomba de protones de las células

parietales u oxínticas, gástricas); su selectividad de acción se basa en que sólo actúa sobre la enzima de origen gástrico. (LANAS, 1998)

1.7.1 EFECTOS SECUNDARIOS Y TOXICIDAD

La frecuencia de aparición de efectos secundarios debidos al omeprazol, ha sido similar a la que se presentaba administrando placebo o un antagonista de los receptores H₂ de la histamina; además no se han detectado anormalidades significativas en los resultados de los análisis para detección de las funciones hepática o tiroidea. Aunque el omeprazol posee un pequeño efecto inhibitor de la síntesis de esteroides cortico suprarrenal ello no redundo en un efecto clínico importante sobre la función adrenérgica o sobre otras funciones endocrinas. El omeprazol presenta efectos adversos aislados tales como diarrea, náuseas, cólicos abdominales, pérdida de sensibilidad en las extremidades, debilidad, somnolencia, dolor de cabeza y alteraciones de la piel.

Suelen ser poco intensos y transitorios por lo que no requieren reducción de la dosis. Menos del 1% de los pacientes tratados con omeprazol presentan pancitopenia, trombocitopenia, neutropenia, anemia, leucocitosis y anemia hemolítica pero no se ha podido establecer la relación del fármaco con la aparición de estos efectos. (LANAS, 1998)

1.8 REACTIVO BIOLÓGICO

1.8.1 Ratón *Mus musculus*



Fuente: Patricia Sisa

FOTOGRAFIA No. 1.- Ratón (*Mus musculus*)

El ratón de laboratorio es un roedor, usualmente de la especie *Mus musculus*, que se utiliza para la investigación científica. Su cariotipo está compuesto por 40 cromosomas y suelen ser albinos. Los animales para utilizar en un proceso de experimentación deben tener un peso aproximado de 18-22 g y 8-9 semanas de vida, provenientes de un Bioterio. (QUEZADA, Alberto, 1997)

1.8.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA *Mus musculus*

TABLA No. 3 TAXONOMÍA DEL RATÓN (*Mus musculus*).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Familia	Muridae
Subfamilia	Murinae
Subgénero	Mus
Genero	Mus
Especie	<i>M. musculus</i>

FUENTE: LINNAEUS, 1758

1.8.3 DIGESTIÓN Y METABOLISMO

Los componentes principales en la dieta son los carbohidratos, y el que mayor representación tiene es el almidón. En la cavidad bucal se encuentra la alfa amilasa que degrada esta enzima y convierte en polímeros de glucosa. El pH óptimo para que la enzima ejerza sus funciones es de 6.7, de aquí que al llegar al estómago es degradado por los jugos gástricos.

A nivel de intestino el páncreas segrega la enzima alfa amilasa y es por ello que inicia la hidrólisis de los carbohidratos. Las enzimas responsables de la digestión adicional de los derivados de almidón se encuentran en la parte exterior del intestino delgado, en la membrana de las microvellosidades del intestino delgado (SENOO, Haruki., 2000)

1.8.4 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

VÍA ORAL.- se administra soluciones y suspensiones por sonda de calibre pequeño permitiendo la entrada del fármaco a la cámara gástrica por el hocico del animal. La sonda se sumerge en agua para verificar si está en el estómago y no en pulmones. Si esta burbujea significa que está en los pulmones, esto se aplica en conejo, rata y ratón. (KEMP, Robert. , 2013)

VÍA INTRAVENOSA. Esta vía depende del animal de experimentación que se utilice, en el conejo se elige la vena marginal de la oreja, insertando la aguja con el bisel hacia arriba, en cambio en los ratones y ratas se elige la vena marginal de la cola (KEMP, Robert. , 2013).

VÍA INTRAPERITONEAL.- Es una de las vías más utilizadas por su rápida absorción y su fácil acceso.

En caso de los conejos se toma por el dorso y se inyecta en la parte alta del cuadrante inferior izquierdo del área abdominal con una inclinación de 45 grados.

En caso de ratas y ratón se expone la región abdominal y se inyecta en el cuadrante inferior izquierdo, la aguja de 27 X 6 mm formando un ángulo de 10 grados (KEMP, Robert. , 2013).

VÍA INTRAMUSCULAR.- se presenta el dorso del animal y el fármaco se inyecta con una aguja de 27 X 13 mm en la partes posterior de los cuatro traseros (KEMP, Robert. , 2013).

VÍA SUBCUTANEA.- se inyecta el fármaco por debajo de la piel del dorso con una aguja de 27 X 6 mm levantando la piel con una mano (KEMP, Robert. , 2013).

1.9 METABOLITOS DE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA

La actividad gastroprotectora producen muchos extractos de plantas las cuales presentan terpenoides, flavonoides, alcaloides, taninos, gomas, mucílagos, glucósidos y esteroides y, en algunos, esta acción es comparable con la atropina.

Los metabolitos secundarios que representa la gran mayoría son los Flavonoides que poseen efectos beneficiosos y se encuentran potencialmente distribuidos en diversas plantas.

Dichos metabolitos tienen propiedades farmacológicas a nivel gástrico, actúan como anti-secretorios, agentes citoprotectores y antioxidante, actúan también en la curación de las úlceras gástricas y, además, éstos compuestos polifenólicos pueden ser nuevas alternativas para la supresión o la modulación de úlcera péptica asociada a *H. pylori*. (BRUNETON, J. , 2001)

1.9.1 POLIFENOLES

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas. (BRUNETON, J. , 2001)

1.9.2 FLAVONOIDES

Son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo γ pirona o fenil cromona. Se dan mucho en el reino vegetal, normalmente en forma de heterósidos. Son una estructura molecular del tipo C6 – C3 – C6. Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Existen 6 clases principales, las chalconas, las flavonas, los flavonoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las xantonas y las auronas. (BRUNETON, J. , 2001)

Para los vegetales, estos compuestos son importantes pues, además de ser responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas y por ello intervenir en la polinización atrayendo a los insectos, participan en la vida del vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo protegerle de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante. (BRUNETON, J. , 2001)

De todos ellos, los que tienen mayor interés farmacológico son dentro del grupo de los flavonoides: flavonas, flavonoles y flavanonas y sus correspondientes heterósidos y los antocianósidos. Muchos de ellos presentan actividad sobre el sistema vascular como por ejemplo el rutósido o los citroflavonoides, llamados así por haber sido aislados en especies pertenecientes al género *Citrus*. Ejercen su acción sobre el sistema vascular por sus efectos vasodilatadores. Además, presentan actividad captadora de radicales libres. (BRUNETON, J. , 2001)

Entre las plantas medicinales cuya actividad está relacionada con su contenido en flavonoides están la flor de pasión (*Passiflora incarnata*) con aproximadamente un 2 % de flavonoides; la manzanilla romana (*Chamaemelum nobile*) y la aquilea (*Achillea millefolium*); el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) y el ginkgo (*Ginkgo biloba*), el cardo Mariano (*Sylibum marianum*) y el espino blanco (*Crataegus ssp.*). Las isoflavonas poseen actividad fitoestrogénica por lo que se emplean para el tratamiento de los síntomas de la menopausia. (BRUNETON, J. , 2001)

1.10 *Oreocallis grandiflora*



FUENTE: UTUANA RESERVE, ECUADOR

FOTOGRAFIA No. 2 (*Oreocallis grandiflora*)

Se ha considerado el estudio de la especie vegetal *O. grandiflora*, debido a que estudios etnobotánicos preliminares realizados en la Planta de Productos Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja indican que empíricamente se emplean las hojas, los frutos y las flores de la planta para tratar: hernias, dolencias hepáticas, afecciones del tracto intestinal, colesterol, nefritis, diabetes, úlcera gástrica, inflamaciones, problemas de los ojos, y la gripe (ESPINOZA, Alejandro. , 2012).

1.10.1 TAXONOMÍA DE *O. grandiflora*

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

FUENTE: MINISTERIO DEL AMBIENTE DE LA REPÚBLICA DEL PERÚ

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

1.10.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

Las hojas, que están dispuestas en espiral a lo largo de las ramas, la forma de las hojas varía de un estrecho y alargado a la amplia y en forma de elipse, Estas son coriáceas, simples o compuestas, enteras, dentadas o lobuladas, sin estípulas (REYNEL, C., & J, Marcelo., 2009).

Las inflorescencias, que suelen ser 7-17,5 cm de largo, pero en ocasiones tanto como 38 cm, flores oso que pueden ser blanco, rosa, amarillo o rojo. Fruto en folículo, a veces leñoso. Las semillas son aladas en muchas ocasiones. (REYNEL, C., & J, Marcelo., 2009). Tienen tres poros, condición que se cree que es primitivo en la Proteácea. Para poder reconocer una especie de otra se fundamenta específicamente en los frutos y las flores que son característicos de cada especie. No presenta peligro de extinción esta especie (REYNEL, C., & J, Marcelo., 2009).

1.10.3 USOS

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

Además se emplea la parte aérea para tratar problemas como: Diabetes, fiebre, trastornos intestinales, afecciones renales, dolores hepáticos etc (REYNEL, C., & J, Marcelo., 2009).

1.10.4 HISTORIA DE *O. grandiflora*

Su nombre proviene del vocablo griego oreos que significa (montaña), y kalli (bella) es decir es la bella de la montaña. Descrita en el año 1786 por el naturalista francés St. Jean Baptiste Lamarck como *Embothrium grandiflora*. Luego el botánico holandés Herman Otto Sleumer cambia al género *Oreocallis*.

De esta forma es como se la conoce hoy en día, solo existe dos especies *O. grandiflora* (Lam) R. Br., y *O. mucronata* (Willd) Sleumer. (REYNEL, C., & J, Marcelo., 2009)

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica y en el bioterio de la Facultad de Ciencias, Escuela Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo perteneciente a la Parroquia Maldonado de la Ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1.1 MATERIAL MATERIA PRIMA

La materia prima en este caso es especie vegetal *O. grandiflora* conocida como cucharilla, la cual fue recolectada en la provincia de Chimborazo en la ciudad de Riobamba a 2750 msnm, cuya temperatura del lugar oscila entre 10 a 18 °C.

2.1.2 REACTIVO BIOLÓGICO

Para la experimentación se utilizaron ratones de laboratorio *Mus musculus* los mismos que fueron obtenidos de la ciudad de Guayaquil del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

2.1.2.1 DESCRIPCIÓN

Peso promedio de los ratones: 23-33 g

Sexo: machos

Procedentes del INSPI de la ciudad de Guayaquil

Periodos 12 h luz / 12 h oscuridad

2.1.3 MATERIALES Y EQUIPOS.

- Espátula
- Fundas rojas para desechos infecciosos
- Fundas negras para desechos comunes
- Frascos ámbar 30 ml
- Gradilla
- Guantes quirúrgicos
- Hojas de bisturí
- Jeringuillas de 1 ml
- Pinza para cápsula
- Reverbero eléctrico
- Trípode
- Vaselina
- Varilla de agitación
- Sonicador
- Mangueras
- Mascarilla
- Molino Manual
- Mortero y pistilo
- Papel filtro
- Picnómetro
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml graduadas
- Toallas adsorbentes
- Tubos de ensayo
- Vasos precipitación de 250, 50, 100, y 500 ml
- Embudo Buchner
- Rotavapor
- Kitasato

- Lupa

2.1.4 REACTIVOS

- Agua destilada
- Metanol
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Tricloruro férrico 5%
- Acetato de etilo
- Ácido sulfúrico
- Magnesio metálico
- Alcohol potable
- Reactivo de Baljet
- Suero Fisiológico
- Metanol
- Etanol
- Éter etílico
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Fehling
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético
- Ácido clorhídrico al 1%
- Ácido clorhídrico concentrado
- Omeprazol de 20 mg de laboratorios La Santé
- Solución de Ninhidrina al 5%
- Hexano
- Acetato de etilo

2.2 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.2.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA

La evaluación de la droga vegetal se realizó por varios métodos como son: la percepción, la microscopía, el análisis físico-químico, y el análisis biológico.

En primer lugar se llevó a cabo el análisis físico-químico que se muestra a continuación: (MIRANDA, Martha, 2006).

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

2.2.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO

Las flores de la planta fueron sometidas a secado y molienda, luego se pesó 30 g de dicha muestra y se lo colocó en un recipiente ámbar con un volumen de éter tres veces superior a la muestra. La misma que se dejó en maceración por 48 horas. Al finalizar el tiempo estimado se procedió a filtrar y se obtuvo el extracto etéreo, y un residuo sólido a partir de este, se obtiene un extracto alcohólico y un extracto acuoso.

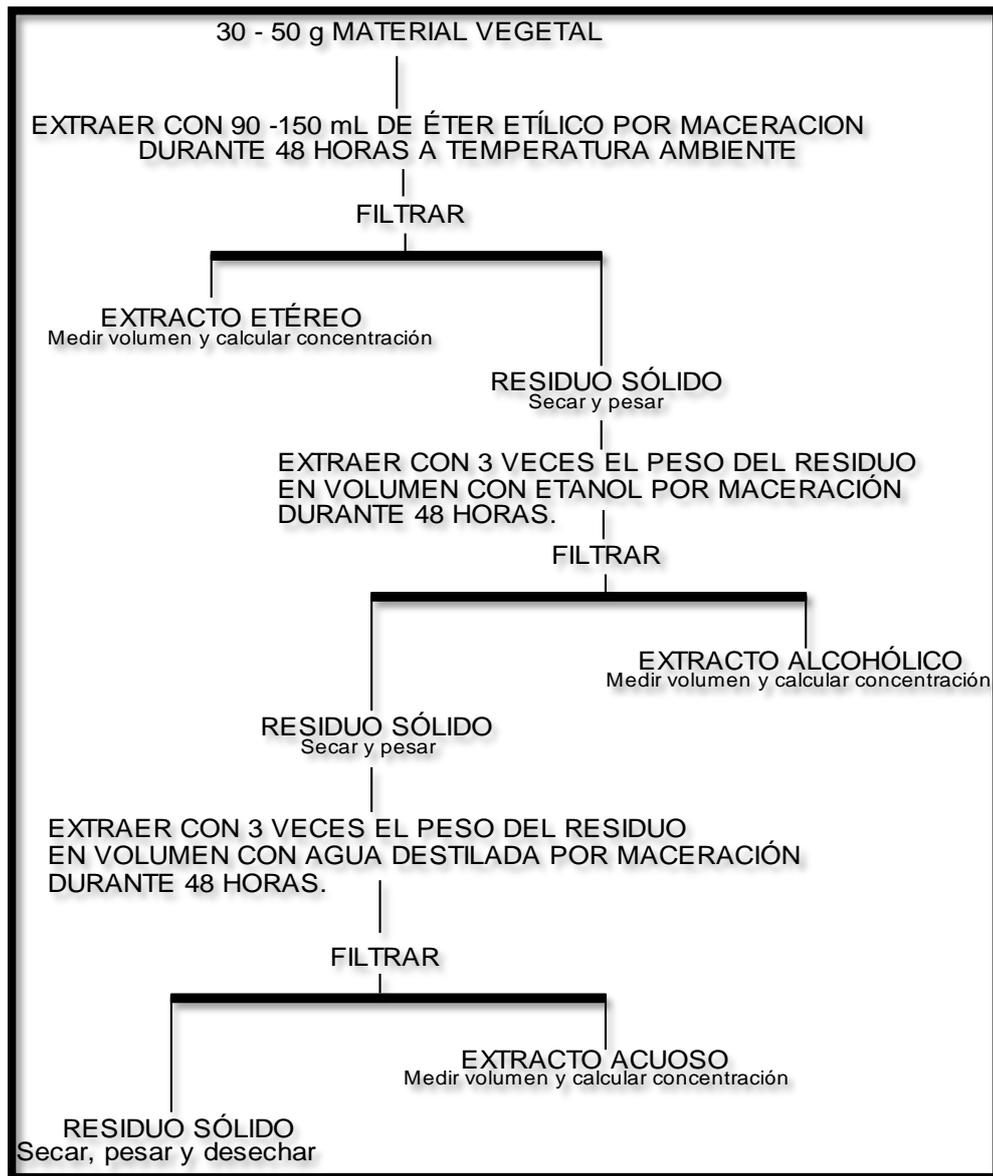
La calidad de este extracto obtenido se determinó a través de las siguientes pruebas.

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

- Determinación del pH por potenciometría. (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992).

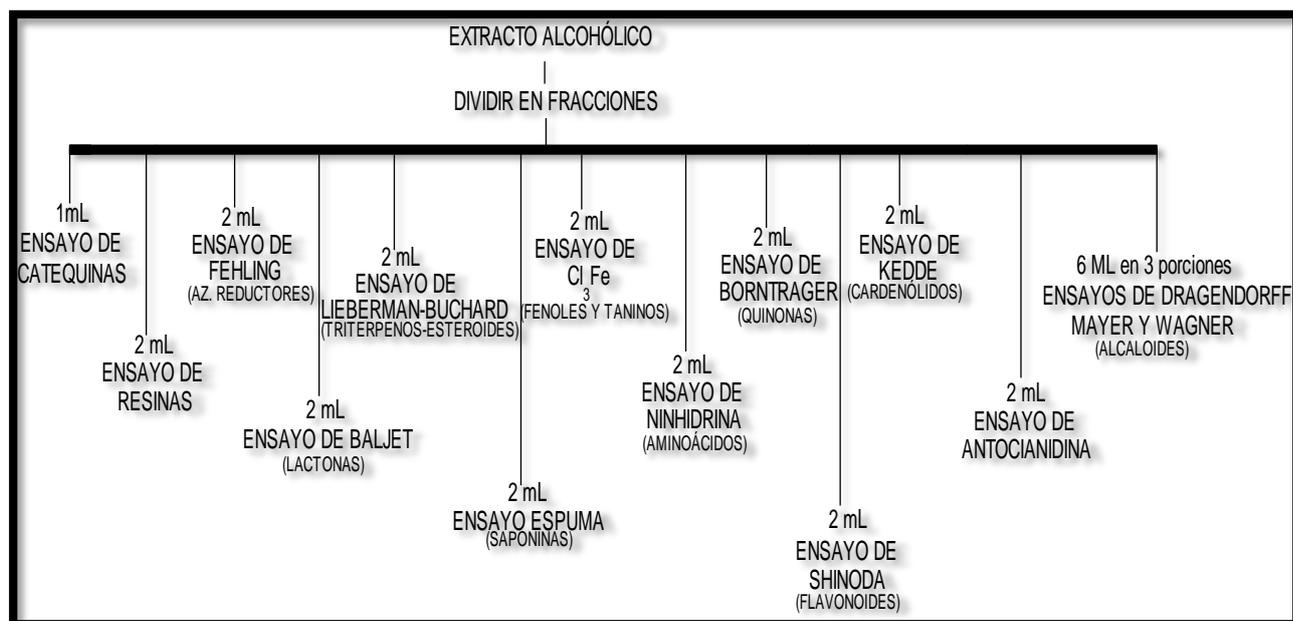
A los extractos se realizó el tamizaje fitoquímico para determinar los metabolitos secundarios.

2.2.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO



FUENTE: MIRANDA, M. FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES

FIG. 2. ESQUEMA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS



FUENTE: MIRANDA, M. FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES

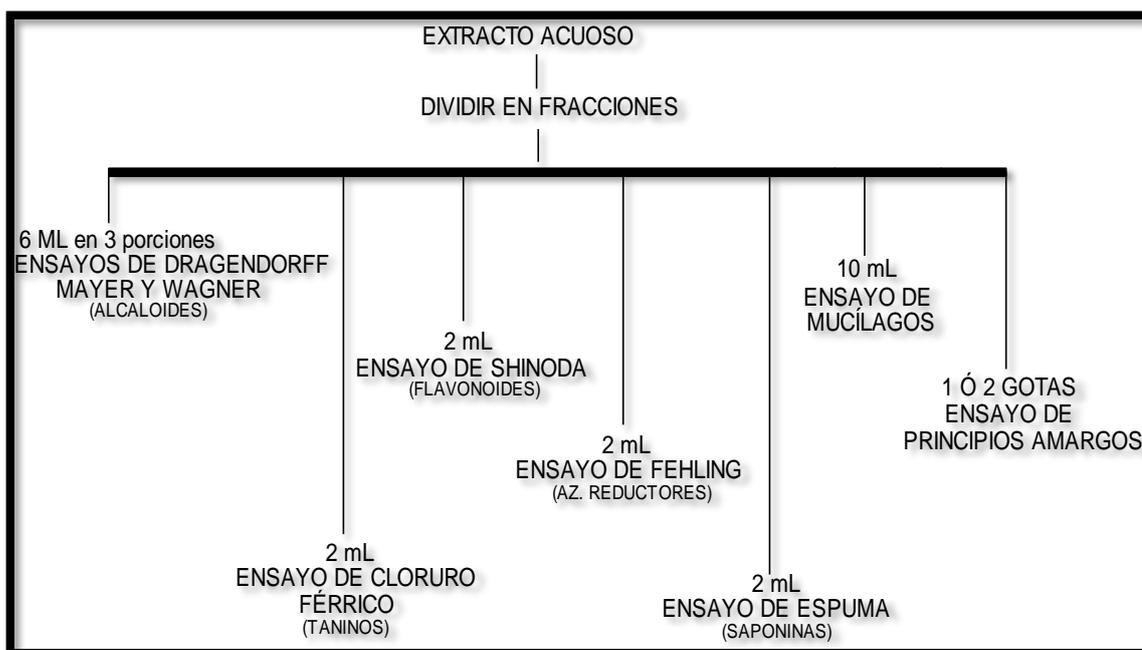
Fig. No 3.- TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

Ensayo de Dragendorff: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua.

Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++). (MIRANDA, Martha, 2006)

Ensayo de Mayer: Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++). (MIRANDA, Martha, 2006)

El tamizaje del extracto acuoso se procedió de la siguiente manera.



FUENTE: MIRANDA, M. FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES

Fig. No 4.- TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO

Ensayo de Wagner: Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. (MIRANDA, Martha, 2006)

Ensayo de Baljet: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. (MIRANDA, Martha, 2006)

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente. (MIRANDA, Martha, 2006)

Ensayo de Hidroxamato férrico para cumarinas: Una gota del extracto se coloca en una placa de porcelana y se añade una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol al 10 %. Se añaden unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en etanol y se calienta a la llama hasta burbujeo, se añaden unas gotas de ácido

clorhídrico 0.5 mol/L y una gota de cloruro férrico al 1% en agua. El desarrollo de una coloración violeta (+) (MIRANDA, Martha, 2006).

Ensayo de Borntrager: Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo.

Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++), coloración roja (+++) (MIRANDA, Martha, 2006)

Ensayo de Liebermann-Burchard: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo.

Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado *sin agitar*. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración. (MIRANDA, Martha, 2006)

- Rosado-azul muy rápido.
- Verde intenso-visible aunque rápido.
- Verde oscuro-negro-final de la reacción claro (++), intenso (+++).

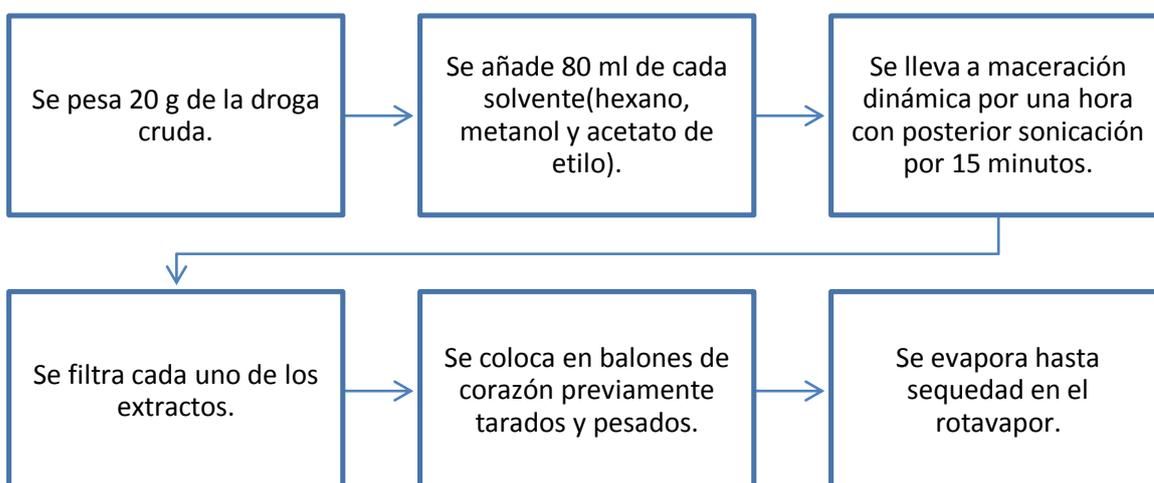
Ensayo del cloruro férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de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

al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general: (MIRANDA, Martha, 2006).

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

2.2.4 Obtención de los extractos de *O. grandiflora*

Para la obtención de los extractos se procedió de la siguiente manera, utilizando solo la parte de inflorescencias de la planta *O. grandiflora*



2.2.5 Preparación de los animales de experimentación, ratones (*Mus musculus*)

Material biológico.- Para la experimentación se utilizaron ratones machos de 27-33g de peso. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas antes de iniciar la experimentación, dejándoles únicamente con agua *ad libitum*.

Agente ulcerogénico.- Para la formación de úlceras se utilizó HCl/60 % en solución etanol, se administró 0.5ml por animal.

Preparación del control positivo.- Se disolvió en 1 % tween 80 en solución acuosa 20mg de Omeprazol.

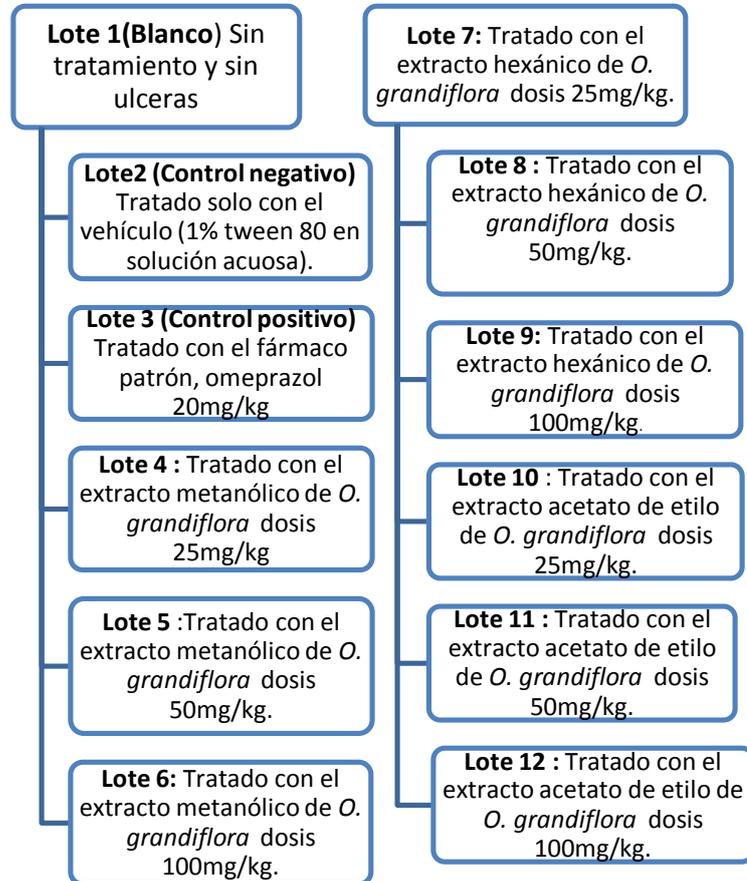
2.2.6 Aplicación del tratamiento

CUADRO N. 01 Protocolo de experimentación

CÓDIGO	PESO, g	TRATAMIENTO	Cantidad de sustancia o extracto, mg	Concentración teórica de la solución, mg/mL	Concentración práctica de la solución, mg/mL	Volumen de administración, mL
RATÓN 1	20,8	Vehículo	N/A	N/A	N/A	0,5 mL de vehículo
RATÓN 2	19,9	Vehículo	N/A	N/A	N/A	0,5 mL de vehículo
RATÓN 3	22,1	Vehículo	N/A	N/A	N/A	0,5 mL de vehículo
RATÓN 4	23,3	Omeprazol, 30 mg/Kg	0,699	1,398	1,4	0,50
RATÓN 5	23,3	Omeprazol, 30 mg/Kg	0,699	1,398	1,4	0,50
RATÓN 6	24,1	Omeprazol, 30 mg/Kg	0,723	1,446	1,4	0,52
RATÓN 7	24,5	Extracto Hexánico, 25 mg/Kg	0,6125	1,35	1,3	0,47
RATÓN 8	25,6	Extracto Hexánico, 25 mg/Kg	0,64	1,28	1,3	0,49
RATÓN 9	26	Extracto Hexánico, 25 mg/Kg	0,65	1,3	1,3	0,50
RATÓN 10	26,2	Extracto Hexánico, 50 mg/Kg	1,31	2,72	2,65	0,49
RATÓN 11	26,2	Extracto Hexánico, 50 mg/Kg	1,31	2,62	2,65	0,49
RATÓN 12	26,5	Extracto Hexánico, 50 mg/Kg	1,325	2,65	2,65	0,50
RATÓN 13	26,6	Extracto Hexánico, 100 mg/Kg	2,66	5,32	5,35	0,50
RATÓN 14	26,7	Extracto Hexánico, 100 mg/Kg	2,67	5,34	5,35	0,50
RATÓN 15	26,9	Extracto Hexánico, 100 mg/Kg	2,69	5,48	5,35	0,50
RATÓN 16	27	Extracto acetato de etilo, 25 mg/Kg	0,675	1,425	1,4	0,48
RATÓN 17	27,4	Extracto acetato de etilo, 25 mg/Kg	0,685	1,425	1,4	0,49
RATÓN 18	27,7	Extracto acetato de etilo, 25 mg/Kg	0,6925	1,385	1,4	0,49
RATÓN 19	28	Extracto acetato de etilo, 50 mg/Kg	1,4	2,97	3	0,47
RATÓN 20	28,1	Extracto acetato de etilo, 50 mg/Kg	1,405	2,97	3	0,47
RATÓN 21	28,2	Extracto acetato de etilo, 50 mg/Kg	1,41	2,82	3	0,47
RATÓN 22	28,2	Extracto acetato de etilo, 100 mg/Kg	2,82	6,14	6	0,47
RATÓN 23	28,3	Extracto acetato de etilo, 100 mg/Kg	2,83	6,14	6	0,47
RATÓN 24	28,4	Extracto acetato de etilo, 100 mg/Kg	2,84	5,68	6	0,47
RATÓN 25	28,6	Extracto metanólico, 25 mg/Kg	0,715	1,545	1,5	0,48
RATÓN 26	29,5	Extracto metanólico, 25 mg/Kg	0,7375	1,545	1,5	0,49
RATÓN 27	29,5	Extracto metanólico, 25 mg/Kg	0,7375	1,475	1,5	0,49
RATÓN 28	29,8	Extracto metanólico, 50 mg/Kg	1,49	3,21	3,2	0,47
RATÓN 29	31	Extracto metanólico, 50 mg/Kg	1,55	3,21	3,2	0,48
RATÓN 30	31	Extracto metanólico, 50 mg/Kg	1,55	3,1	3,2	0,48
RATÓN 31	31,5	Extracto metanólico, 100 mg/Kg	3,15	6,8	6,8	0,46
RATÓN 32	31,5	Extracto metanólico, 100 mg/Kg	3,15	6,8	6,8	0,46
RATÓN 33	31,7	Extracto metanólico, 100 mg/Kg	3,17	6,34	6,8	0,47

2.2.6.1 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

El material biológico (ratones) de experimentación se distribuyó en lotes cada uno de tres animales de la siguiente forma:



2.2.6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1. Se etiquetó a cada uno de los lotes de animales con los cuales se trabajó.
2. Transcurridas las 12 horas del ayuno se dividió en grupos a los animales de experimentación
3. El primer grupo recibió 0.5 ml del vehículo (1 % tween 80 en solución acuosa)
4. El segundo grupo tratado con omeprazol 20 mg/kg.
5. Los demás grupos recibieron los tratamientos con los extractos metanólico, hexánico, acetato de etilo, tal y como se indica en el esquema.
6. Transcurrida una hora después de los tratamientos se administró el agente necrosante 0,5 ml de HCl/60 % en solución etanol.

7. Después de una hora, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.
8. Se extrajeron los estómagos, los cuales fueron abiertos por la curvatura mayor, lavados con suero fisiológico y extendido para lograr una completa exposición de la mucosa para el análisis macroscópico; el cual se realizó con la ayuda de una lupa.
9. Las muestras extraídas fueron colocadas en recipientes plásticos que contenían una solución de formol al 10 %, por un período de 3 a 4 días.
10. Posteriormente se realizó cortes de las muestras para el estudio histopatológico.

2.2.7 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

El análisis histopatológico del tejido gástrico de los sujetos de experimentación fue necesario para correlacionarlo con los resultados obtenidos a nivel experimental, fue llevado a cabo por el Dr. Oswaldo Duque A. Médico patólogo, y con la ayuda del Dr. Javier Robles de la Unidad Oncológica Solca de Chimborazo.

2.2.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Debido a la obtención de datos cualitativos se procedió a expresarlos en porcentajes con los cuales se buscó realizar la prueba de la hipótesis aplicando ANOVA y con estos resultados fue necesario establecer qué dosis fue la más efectiva, por lo tanto se aplicó el test DUNNET.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DROGA CRUDA.

3.1. PREPARACIÓN DE LA DROGA CRUDA

La preparación de los extractos se realizó mediante la guía de Farmacognosia y Productos Naturales Normas Ramales. Drogas crudas y extractos y tinturas. (NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992). Después de someter la droga cruda y su extracto hidroalcohólico a las pruebas de control calidad descritas en el Capítulo II, se obtuvieron los resultados expresados a continuación.

CUADRO No. 02 CONTROL DE CALIDAD DE LA PLANTA SECA DE *O. grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE DE 2014

PARÁMETRO	<i>O. grandiflora</i>	LÍMITES ACEPTADOS (REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA)
HUMEDAD (%)	12.6	14%
CENIZAS TOTALES (%)	2.35	5%
CENIZAS SOLUBLES EN AGUA (%)	0.60	2%
CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHIDRICO (%)	0.018	1%

FUENTE: Patricia Sisa

El contenido de humedad es de 12.6 %. Comparando con los datos bibliográficos (Farmacopea Española 2002) se observa que se encuentra dentro de los límites aceptados; además el porcentaje de agua que presenta se hace referencia con las condiciones ambientales a las que fue sometida durante su hábitat, ya que la parte que se utilizó de la planta para el estudio fueron las inflorescencias

El contenido de cenizas totales es de 2.35 %; el porcentaje de cenizas solubles en agua es de 0.60 %. En la determinación de cenizas insolubles en HCl se obtuvieron valores de 0.018 %; Según la Farmacopea Española (2002), el valor límite para cenizas totales en droga cruda es del 5 % por lo tanto está dentro del rango permitido teóricamente, este análisis nos permite ver el contenido de residuos de arena, proveniente de la cosecha y también suponer la presencia de metales pesados que contaminaron la materia vegetal, mientras se encontraba en su hábitat previo a su recolección. Al determinarse valores bajos, de cenizas solubles, es un indicativo de que no presenta cantidades considerables de sales minerales (BARRETO, Mario, 2006).

Las cantidades bajas de cenizas insolubles ayudan a conocer la baja presencia de sílice, que es proveniente de la presencia de arena o de tierra que se encuentra presente en la parte aérea de las plantas (SHARAPIN, Nuria., 2000).

3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

CUADRO No. 3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *O. grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014.

PARAMETRO	RESULTADO
INDICE DE REFRACCION	1.4066
pH	5.76±0.05
DENSIDAD RELATIVA	0.86±0.02

FUENTE: Patricia Sisa

Al obtener los resultados el índice de refracción del extracto de *O. grandiflora*, es de 1.4066 y al comparar con el índice del agua que su valor es 1 nos hace suponer que

existen compuestos solubles presentes en el extracto hidroalcohólico. El índice de refracción indica la ausencia de sólidos solubles (sacarosa) según la tabla adjunta al Manual de Técnicas de Laboratorio de Bromatología y Análisis de alimentos de Lucero O. (2011).

El resultado obtenido de pH en el extracto fue de 5.76 con una variación ± 0.05 entre muestras, y al comparar con el alcohol que se utilizó para la maceración que tiene una concentración del 96 % y con un pH de 6.95 significa que el extracto viene hacer ligeramente ácido.

La densidad relativa del extracto de *O. grandiflora*, fue de 0.86 con una variación de ± 0.02 entre muestras, comparado con el solvente utilizado (alcohol etílico al 96%) que tiene un valor de 0.70, por lo que se asume que el extracto presenta compuestos provenientes de la droga cruda.

3.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

CUADRO No. 4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *O. grandiflora*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2014.

TIPO DE ENSAYO	COMPUESTO A IDENTIFICAR	RESULTADO
DRAGENDORFF	Alcaloides	-
MAYER	Alcaloides	-
WAGNER	Alcaloides	-
BALJET	Lactonas	++ coloración precipitado
LIEBERMAN-BUCHARD	Triterpenos	++ verde oscuro
CATEQUINAS	Catequinas	+
RESINAS	Resinas	-
FeCl ₃	Compuestos fenólicos	++ verde
BORNTRANGER	Quinonas	++
SHINODA	Flavonoides	+++
FEHLING	Azúcares	++

FUENTE: Patricia Sisa

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

Según los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *O. grandiflora* se pudo evidenciar la presencia de los siguientes compuestos: catequinas, quinonas, lactonas triterpenos, azúcares. Además se observó una alta cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides los mismos que se ha comprobado que tienen acción protectora de la mucosa gástrica, dentro de estos compuestos están la quercetina y rutina, los cuales son considerados protectores celulares contra los rayos ultravioleta, virus, hongos, entre otros. A la vez, se conoce su actividad como atrapadores de radicales libres y antioxidante. También, se ha demostrado que con el tratamiento de una fracción enriquecida de flavonoides se induce un incremento en la producción de prostaglandinas y somastostatina y la reducción de gastrina, que son algunos de los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica, en ratas sin sometimiento a lesión. (BEIL, 1995).

Los triterpenos por su parte abundan fundamentalmente en los vegetales pero también se encuentran en los animales, a partir de ellos se forman los esteroides que son compuestos liposolubles; entre sus principales actividades farmacológicas se destaca su poder antiinflamatorio, aunque en literatura con reportes de acción estimulante y depresora del sistema nervioso central (CUELLAR., 2001).

También ha sido propuesto que el grupo hidroxilo libre o derivado en C-3 es necesario para que esteroides y triterpenoides presenten actividad anti-ulcerosa (NAVARRETE, 2002).

3.4 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

CUADRO N° 5 PROTOCOLO HISTOPATOLÓGICO DE RATONES (*Mus musculus*) TRATADOS CON DIFERENTES EXTRACTOS DE *O. grandiflora*

MUESTRA	EXÁMEN MACROSCÓPICO	EXÁMEN MICROSCÓPICO
VEHÍCULO (V) E	Mucosa gástrica de contextura macroscópica normal.	Integridad de la mucosa gástrica, composición de la lámina propia adecuada, luz glandular libre
OMEPRAZOL (O) E (O) H	Estómago.- Presencia de mucosa congestiva, pliegues ligeramente engrosados.	Estómago.- mucosa gástrica con proceso de cicatrización de un 98 %. Hígado.- lobulillos hepáticos de distribución normal; sinusoides

	Hígado.- coloración normal, contextura normal	de calibre adecuado; espacios porta con vasos de calibre normal.
HEXANO (H) E (H) H	Estómago.- Presencia de engrosamiento de los pliegues gástricos a nivel del cuerpo. Macroscópicamente se observa palidez a nivel de la mucosa a nivel del cuerpo, engrosamientos nodulares. Hígado.- coloración normal, contextura normal	Estómago.- mucosa gástrica con proceso de cicatrización en un 96 %. Hígado.- lobulillos hepáticos de distribución normal; sinusoides de calibre adecuado; espacios porta con vasos de calibre normal.
A. DE ETILO (A) E (A)H	Estómago.- Presencia de engrosamiento de los pliegues gástricos. Hígado.- coloración normal, contextura normal	Estómago.- mucosa gástrica con proceso de cicatrización en un 99 %. Hígado.- lobulillos hepáticos de distribución normal; sinusoides de calibre adecuado; espacios porta con vasos de calibre normal
METANOL (M) E (M) H	Estómago.- Presencia de engrosamiento de los pliegues gástricos. Hígado.- coloración normal, contextura normal	Estómago.- mucosa gástrica con proceso de cicatrización en un 99%. Hígado.- lobulillos hepáticos de distribución normal; sinusoides de calibre adecuado; espacios porta con vasos de calibre normal

FUENTE: Patricia Sisa

Después de realizar la extracción de los estómagos de los sujetos de experimentación se procedió a realizar la macroscopía y microscopía, se obtuvo como resultados: en el caso del grupo control la mucosa gástrica estuvo integra, en el caso del control negativo presento estrías hemorrágicas, en el control positivo donde se administró omeprazol existió una protección total de las lesiones, lo mismo ocurrió en las tres dosis de extracto administradas a los lotes 4, 5 y 6, por lo que la investigación fue exitosa ya que se comprobó que hubo una protección de la lesión gástrica del 100 %. Los resultados obtenidos del análisis

macroscópico y microscópico se expresaron en porcentajes de protección sobre la mucosa gástrica. En base a estos parámetros se planteó la hipótesis estadística permitiendo aplicar ANOVA para verificar si existían diferencias entre cada uno de los tratamientos:

H₀: No existe diferencia entre cada uno de los extractos administrados a los sujetos de experimentación tras una inducción de úlceras gástricas.

H₁: Al menos uno de los tratamientos administrados es diferente.

3.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

CUADRO N° 6 GRADO DE ULCERACIÓN EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DICIEMBRE 2014

TRATAMIENTO	ULCERACIÓN, mm ²
VEHÍCULO	0.104±9.16x10 ⁻³
OMEPRAZOL	6.22x10 ⁻⁴ ±3.26x10 ⁻⁵
EXTRACTO HEXÁNICO, 25 mg/kg	2.37x10 ⁻³ ±1.18x10 ⁻³
EXTRACTO HEXÁNICO, 50 mg/kg	4.63x10 ⁻⁴ ±1.74x10 ⁻⁴
EXTRACTO HEXÁNICO, 100 mg/kg	1.33x10 ⁻⁴ ±2.31x10 ⁻⁴
EXTRACTO ACETATO DE ETILO, 25 mg/kg	1.40x10 ⁻³ ±4.0x10 ⁻⁴
EXTRACTO ACETATO DE ETILO, 50 mg/kg	7.54x10 ⁻⁵ ±1.31x10 ⁻⁴
EXTRACTO ACETATO DE ETILO, 100 mg/kg	0
EXTRACTO METANÓLICO, 25 mg/kg	0
EXTRACTO METANÓLICO, 50 mg/kg	0
EXTRACTO METANÓLICO, 100 mg/kg	0

FUENTE: Patricia Sisa

Al aplicar el análisis estadístico (ANOVA y DUNNET) el cual permite diferenciar el grado de ulceración (mm²) tomando en cuenta el factor $p < 0,05$ y comparando con los valores obtenidos en el cuadro N° 4 estos son aceptables lo que significa que hubo una disminución muy altamente significativa del número y grado de úlceras con las tres

dosis respecto al grupo control, lo que indica la presencia de un alto efecto gastroprotector.

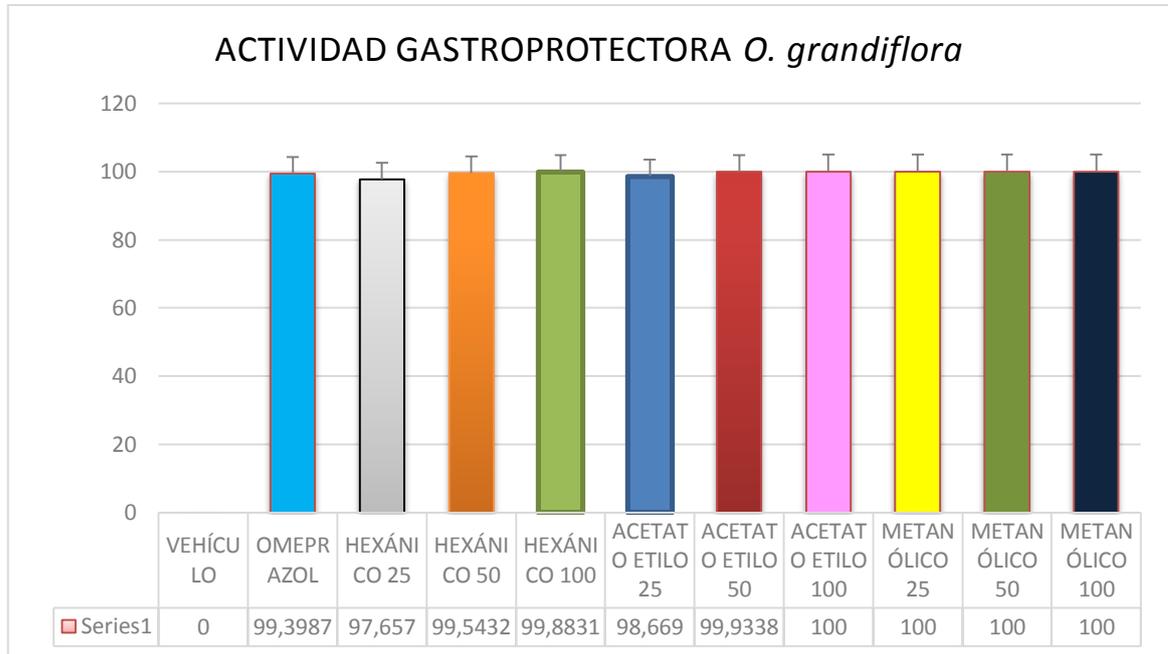
Al comparar la dosis entre sí, se observó una disminución significativa en el grado de lesión gástrica con respecto a las diferentes concentraciones lo que muestra dependencia entre dosis y el efecto gastroprotector.

CUADRO N° 7 PORCENTAJE DE PROTECCIÓN DE LA LESIÓN GÁSTRICA EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DICIEMBRE 2014

TRATAMIENTO	PROTECCIÓN LESIÓN GÁSTRICA, %
VEHÍCULO	0
OMEPRAZOL	99.39±0.063
EXTRACTO HEXÁNICO, 25 mg/kg	97.66±1.24
EXTRACTO HEXÁNICO, 50 mg/kg	99.54±0.21
EXTRACTO HEXÁNICO, 100 mg/kg	99.88±0.20
EXTRACTO ACETATO DE ETILO, 25 mg/kg	98.67±0.27
EXTRACTO ACETATO DE ETILO, 50 mg/kg	99.93±0.11
EXTRACTO ACETATO DE ETILO, 100 mg/kg	100
EXTRACTO METANÓLICO, 25 mg/kg	100
EXTRACTO METANÓLICO, 50 mg/kg	100
EXTRACTO METANÓLICO, 100 mg/kg	100

FUENTE: Patricia Sisa

GRAFICO N° 1 PORCENTAJE DE PROTECCIÓN DE LA LESIÓN GÁSTRICA Y COMPARACIÓN ENTRE DOSIS Y CONCENTRACIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *O. grandiflora*



Según los resultados obtenidos en el análisis ANOVA, se procede a aceptar H_0 y rechazar H_1 determinándose que no existe diferencia entre ninguno de los tratamientos administrados a los sujetos de experimentación con la referencia omeprazol, mostrando que el tratamiento más eficaz fue del extracto metanólico presentando un porcentaje del 100 % pero cabe recalcar que no son despreciables los otros extractos ya que estos exhiben un valor entre 97-99 %. A pesar de los resultados obtenidos estadísticamente, se comprueba que *O. grandiflora* tiene actividad gastroprotectora, haciéndose necesario resaltar el aporte científico que se ha obtenido como resultado del presente estudio ya que dará a la población mayor seguridad en el uso de esta especie vegetal como medicina tradicional preventiva y como posible tratamiento complementario al uso de anti-ulcerosos; ya que los AINEs al ser medicamentos utilizados para tratar inflamación aguda y crónica, son una de las clases terapéuticas más prescritas, cuyo uso se incrementa simultáneamente con la expectativa de vida, pero que producen efectos adversos, fundamentalmente gastrointestinales, que limitan un mayor uso. Tales antecedentes justifican la búsqueda de tratamientos preventivos.

CONCLUSIONES

1. El material vegetal posee una calidad aceptable para su uso, ya que los datos obtenidos en la determinación de los parámetros físico-químicos del control de calidad de la droga cruda de *O. grandiflora* se encontraron dentro de los límites establecidos, según la Farmacopea Española.
2. Al realizar el tamizaje fitoquímico de *O. grandiflora*, se utilizó la parte de las inflorescencias de la planta, y se comprobó que contiene lactonas, triterpenos, compuestos fenólicos, quinonas, catequinas y en mayor cantidad flavonoides.
3. En la comprobación y evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos metanólico, hexánico, y de acetato de etilo de la droga cruda de *O. grandiflora* se evidenció una completa cicatrización de la mucosa gástrica afectada, además de acuerdo al análisis estadístico aplicado se concluye que no existe diferencia significativa en la utilización de los extractos ya que con esto se comprobó que no importa la dosis que se administró por lo que cualquiera de las tres dosis es efectiva, produciendo una rápida y total protección de la mucosa gástrica evidenciándose en el análisis macroscópico y con el estudio histopatológico de los estómagos.
4. Al realizar el estudio macroscópico y microscópico del hígado no se evidenció ninguna alteración, por lo que se deduce que esta planta puede ser utilizado sin el peligro de que exista algún tipo de daño en la salud, estos datos concuerdan con bibliografía ya que esta planta ha sido usadas por la población durante mucho tiempo sin que existan efectos adversos.
5. Al comparar el efecto del omeprazol y el extracto administrado se encontró que existió integridad en la mucosa. Según bibliografía revisada el consumo de la planta *O. grandiflora* no produce efectos secundarios a diferencia del consumo de omeprazol que puede ocasionar efectos secundarios reversibles como son dolor de cabeza, diarrea, dificultad para despertar y pérdida del sueño. Existe una relación costo beneficio mucho más favorable en el consumo del extracto *O. grandiflora* que en el consumo de omeprazol.

RECOMENDACIONES

- Se requieren más estudios con el objetivo de determinar y aislar los principios activos responsables de la actividad gastroprotectora; así como su mecanismo de acción.
- Ampliar los estudios de la planta *O. grandiflora* ya que existe escasa información de la misma.
- Se recomienda elaborar un fitofármaco tratando de potenciar la actividad gastroprotectora de la planta *O. grandiflora*.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABREU, G. L.** Gastroenterología endoscopia diagnostica y terapéutica . Madrid-España. Medica Panamerican. 2007, pp. 35-40.
- **ALBORNOZ TRONCOSO, Olga Carolina.** Actividad Gastro protectora del diterpeno aromático ferruginol. (Tesis). (Quím. Farm). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Escuela de Química y Farmacia. Valdivia-Chile. 2004, pp. 24-28.
- **ATAL, C., & BM, K.** Cultivos y Utilizacion de plantas medicinales . Revistas bolivianas. 1982, p. 406.
- **BARRETO, Mario.** El Mate, su historia y cultura. 2da. Ed, Buenos Aires-Argentina. 2006, p. 44.
- **BEIL, W., et al.** Efectos of flavonoide on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and Helicobacter pylori growth. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 1995, pp. 697-700.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832009000200003
[2014/12/27](#)
- **BRUNETON, J.** Farmacognosia. Fitoquímica Plantas medicinales. 2ª Ed, Zaragoza. 2001, pp. 59-60.
- **CUELLAR, A., MIRANDA, M.,** Farmacognosia y productos naturales., 2ª. ed., La Habana-Cuba., Editorial Félix Varela., 2001., Pp. 107- 13.
- **ESPINOZA, Alejandro., etal.** Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. al sur del Ecuador. No 1. Vol. 12, Universidad de Santiago de Chile. Redalyc. pp. 59-68.

- **FUENTES, C C., & ELia, P. D.** Ulcera Gastroduodenal . Catedra Enfermería Quirúrgica. pp.3-7.
http://www.fm.unt.edu.ar/carreras/webenfermeria/documentos/Quirurgica_Modulo_05_ulcera_gastroduodenal.pdf
2014/12/5
- **FUKAI, T., etal.** Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. 2002, p.63.
- **GARIBA, R.R.** Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por úlcera péptica. Gastroenterol. 2009. pp. 22-56.
- **GB, M., SL, P.** Ginger(Zingiber officinale Roscoe) and the gingeroles inhibit the growth of Cag strains of Helicobacter pylori. Anticancer. 2003. Obtenido de <http://www.ecoosfer.com/2013/03/el-tratamiento-natural-de-la-gastritis-una-posibilidad-de-cura/>
2014/12/6
- **GUERRERO, David.** Actividad hipoglucemiante del extracto de las hojas de *Oreocallis grandiflora* en ratas (*Rattus norvegicus*) por inhibición de alfaamilasa (Tesis). (BQF). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2014, pp. 14-16.
- **HARRISON.** Principios de Medicina Interna. 14ª Ed, Mc Graw-Hill Interamericana. 1998.
- **KEMP, Robert.** Handling and Restraint. (Handbook of laboratory rat. New York-USA. pp. 36-39.
- **LANAS, A., & ARROYO, Mario.** Estrategias en la prevención de la gastropatía por AINE. Gastroenterol y Hepatol. 1998, pp. 48-54.

- **LEMOS, Marivane., etal.** Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. Santa Catarina-Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, pp. 503-507.
- **MIRANDA, Martha.** Farmacognosia y productos naturales. (Normas Ramales. De drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP, Cuba. 1992, pp. 32-62
- **PALACIOS, F., etal.** anorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. *Ciencias Químico-Biológicas*. 2011, pp. 51-61.
- **PRADOS, M.D., & Miquel, B. D.** Enfermedades digestivas . *Revista Española*. 2004
- **QUEZADA, Alberto.** Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. (Tesis). (Quím. Farm). Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ciencias. Yucatán-México. 1997, pp. 118
- **REYNEL, C., & J, Marcelo.** Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Lima-Perú. Serie de investigación y Sistematización No. 9. Programa Regional Ecobona – Intercoperation. 2009, pp. 122
- **SAGARÓ, E.** Gastritis. *Gastrohnp*, 11(3), 2009 157. Obtenido de <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/5678/1/Gastritis%204.4.pdf> 2014/12/10
- **SENOO, Haruki.** Digestion, metabolism. (Handbook of laboratory rat). New York-USA. pp. 367-372

- **SHARAPIN, Nuria.** Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. Santa Fé de Bogotá- Colombia. Azucena Martínez. 2000, pp. 146.
- **VASCONCELOS, PC., etal.** Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by Mouriri pusa treatment in acetic acid ulcer model. J. Ethnopharmacol. 2008, p. 155
- **VACAS, M.** Tipos de gastritis. Obtenido de Webconsultas: <http://www.webconsultas.com/salud-al-dia/gastritis/gastritis-aguda-causas-sintomas-y-tratamiento-13930>
2014/12/15
- **VALDIVIA, Mario.** Gastritis y Gastropatías . Perú. 2011, pp. 38-39
- **WAYAR, Sergio.** Úlcera Gastrica. monografias. 2003 Obtenido de <http://www.monografias.com/trabajos14/ulceragast/ulceragast.shtml#>
2014/12/8

ANEXOS



FOTOGRAFÍA N° 3.- MATERIA PRIMA *Oreocallis grandiflora*

ANEXO N° 1 CONTROL DE CALIDAD. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES-ESPOCH.



FOTOGRAFÍA N° 4.- DETERMINACION DE LA HUMEDAD DE LA DROGA CRUDA DE *Oreocallis grandiflora*



FOTOGRAFÍA N° 5 DETERMINACIÓN DE CENIZAS DE LA DROGA *Oreocallis grandiflora*

**ANEXO N° 2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO
HIDROALCHÓLICO *Oreocallis grandiflora***



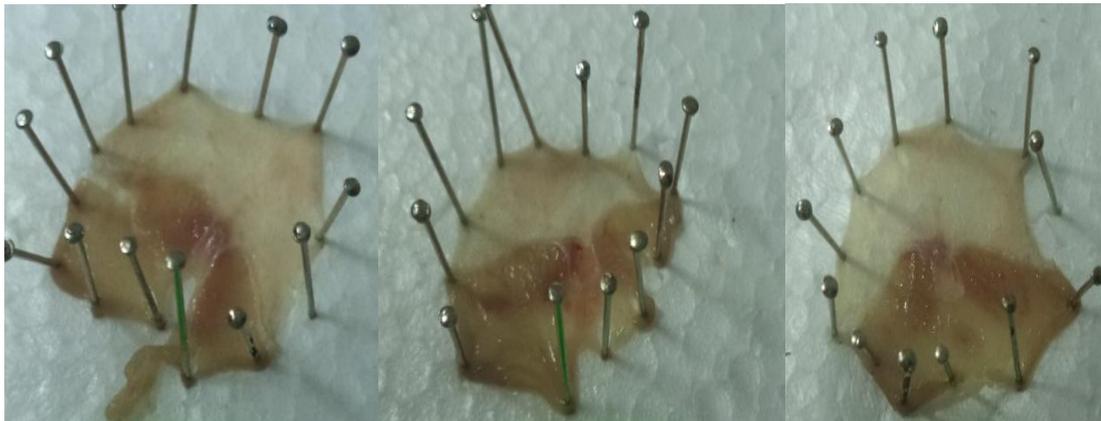
**ANEXO N° 3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO,
METANÓLICO Y ACETATO DE ETILO**



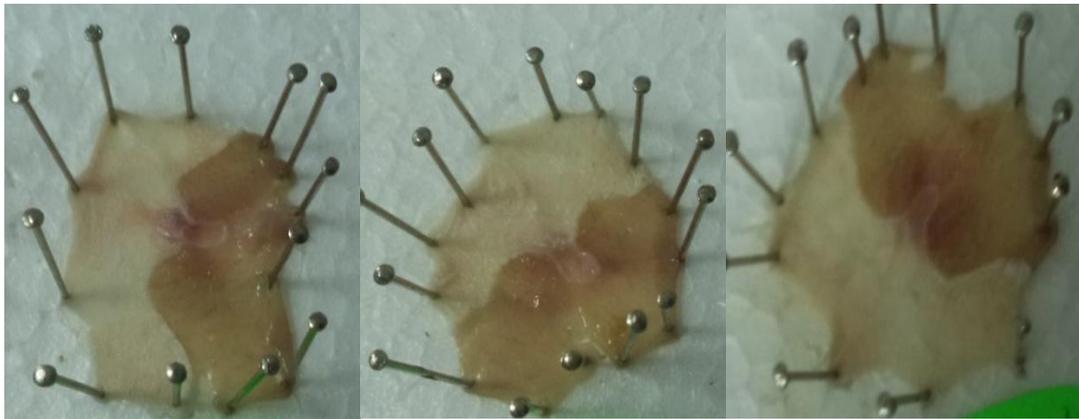
**ANEXO N° 4 ADMINISTRACIÓN Y DISECCIÓN DEL ANIMAL DE
EXPERIMENTACIÓN**



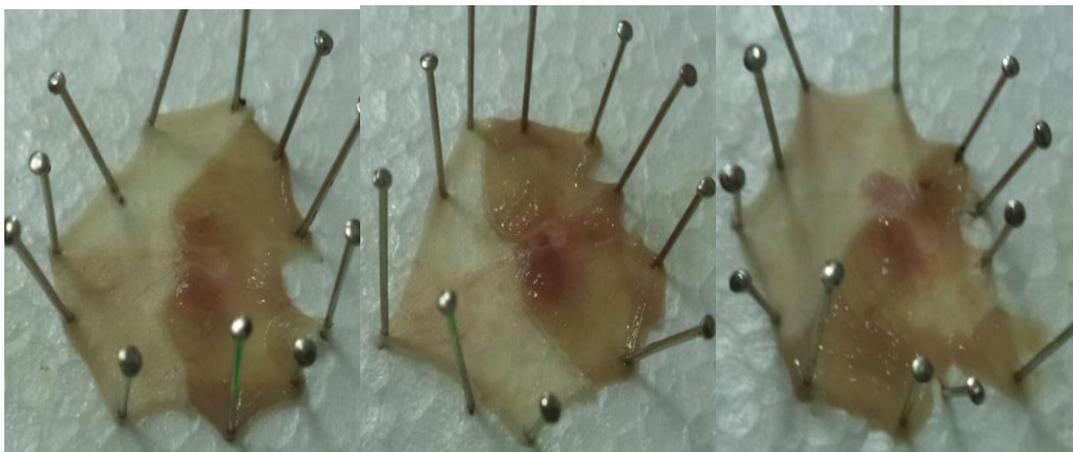
FOTOGRAFÍA N° 6 EXTRACTO METANÓLICO 50 mg/ml



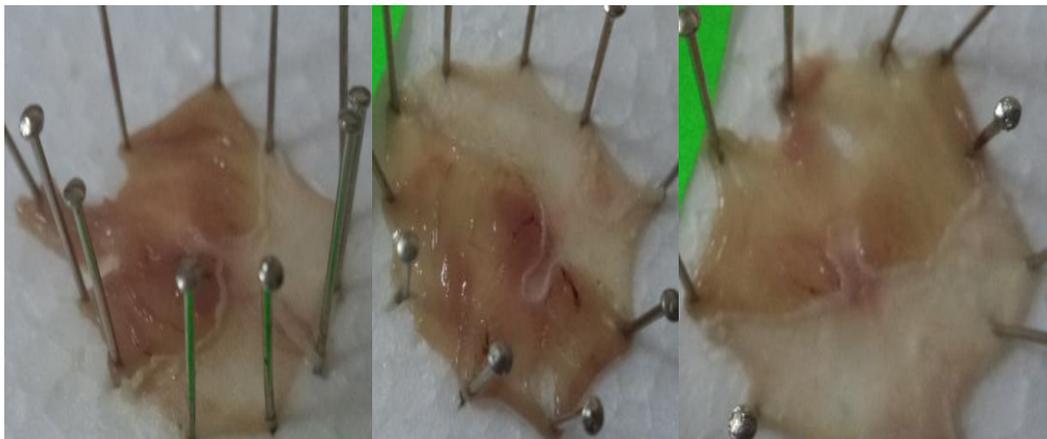
FOTOGRAFÍA N° 7 EXTRACTO METANÓLICO 25 mg/ml



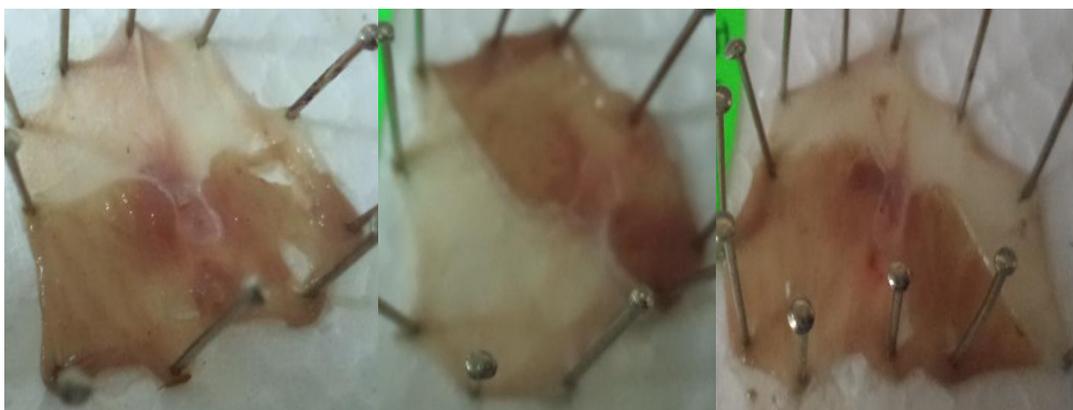
FOTOGRAFÍA N° 8 EXTRACTO ACETATO DE ETILO 100 mg/ml



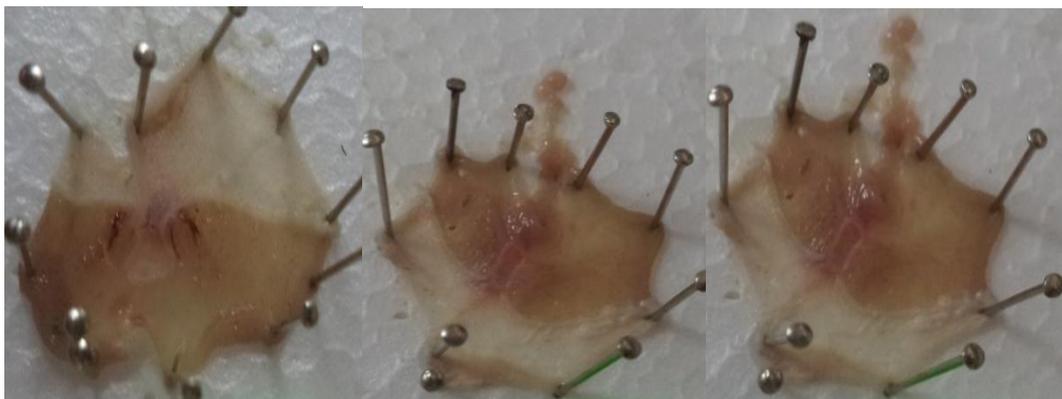
FOTOGRAFÍA N° 9 EXTRACTO ACETATO DE ETILO 50 mg/ml



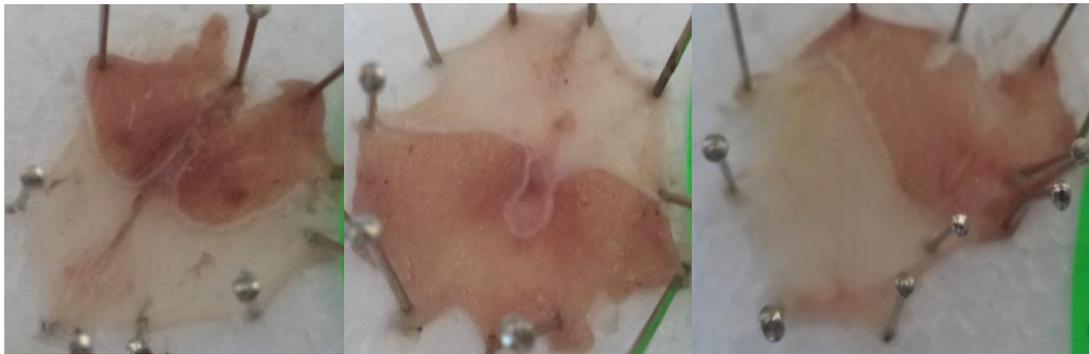
FOTOGRAFÍA N° 10 EXTRACTO HEXÁNICO 100 mg/ml



FOTOGRAFÍA N° 11 EXTRACTO HEXÁNICO 50 mg/ml



FOTOGRAFÍA N° 12 EXTRACTO HEXÁNICO 25mg/ml



FOTOGRAFÍA N° 13 CONTROL POSITIVO OMEPRAZOL 30 mg/kg



ANEXO N° 5 ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES

TABLA 2. Índice de refracción y porcentaje en masa de sólidos solubles (sacarosa) correspondiente

Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (Sacarosa)	Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (Sacarosa)	Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (sacarosa)	Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (Sacarosa)
n_D^{20}	o/o (m/m)						
1,333 0	0	1,367 2	22	1,407 6	44	1,455 8	66
1,334 4	1	1,368 9	23	1,409 6	45	1,458 2	67
1,335 9	2	1,370 6	24			1,460 6	68
1,337 3	3	1,372 3	25	1,411 7	46	1,463 0	69
1,338 8	4			1,413 7	47	1,465 4	70
1,340 3	5	1,374 0	26	1,415 8	48		
		1,375 8	27	1,417 9	49	1,467 9	71
1,341 8	6	1,377 5	28	1,420 1	50	1,470 3	72
1,343 3	7	1,379 3	29			1,472 8	73
1,344 8	8	1,381 1	30	1,422 2	51	1,475 3	74
1,346 3	9			1,424 3	52	1,477 8	75
1,347 8	10	1,382 9	31	1,426 5	53		
		1,384 7	32	1,428 6	54	1,480 3	76
1,349 4	11	1,386 5	33	1,430 8	55	1,482 9	77
1,350 9	12	1,388 3	34			1,485 4	78
1,352 5	13	1,390 2	35	1,433 0	56	1,488 0	79
1,354 1	14			1,435 2	57	1,490 6	80
1,355 7	15	1,392 0	36	1,437 4	58		
		1,393 9	37	1,439 7	59	1,493 3	81
1,357 3	16	1,395 8	38	1,441 9	60	1,495 9	82
1,358 9	17	1,397 8	39			1,498 5	83
1,360 5	18	1,399 7	40	1,444 2	61	1,501 2	84
1,362 2	19			1,446 5	62	1,503 9	85
1,363 8	20	1,401 6	41	1,448 8	63		
		1,403 6	42	1,451 1	64		
1,365 5	21	1,405 6	43	1,453 5	65		