

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

*TECOMA STANS COMO FUENTE DE
ALCALOIDES HIPOGLUCEMIANTES*

MARIA PATRICIA PALACIOS RECINOS

*Trabajo de investigación presentado para
optar al grado académico de*

Licenciatura en Bioquímica

Guatemala

1986

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA



TECOMA STANS COMO FUENTE DE
ALCALOIDES HIPOGLUCEMIANTES

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

TECOMA STANS COMO FUENTE DE

ALCALOIDES HIPOGLUCEMIANTES

MARIA PATRICIA PALACIOS RECINOS

Guatemala

1986

Vo. Bo. :

(f) *Lilian Paiz*
Ingeniera Lilian Paiz
Asesor

(f) *Juan de Dios Calle*
Doctor Juan de Dios Calle
Asesor

Tribunal :

(f) *Lilian Paiz*
Ingeniera Lilian Paiz

(f) *Juan de Dios Calle*
Doctor Juan de Dios Calle

(f) *Nicholas M. Irving*
Doctor Nicholas Irving

Fecha de aprobación: 14 de Octubre 1986

DEDICATORIA

A mi mamá
Martha Alicia de Palacios

AGRADECIMIENTO

Por su colaboración durante la realización del trabajo de investigación agradezco a las siguientes personas:

Dr. Manuel Serrano; muy especialmente a usted pues desde un inicio mostró un gran interés en este trabajo.

Dr. Juan de Dios Calle; excelente asesor y gran colaborador.

Lic. Sergio Ortíz; por estar siempre dispuesto a ayudarme.

Dr. Luis Gonzaga Elías (INCAP); por proporcionarame los animales necesarios para la realización del estudio.

Dra. Amarilis Saravia y Lic. Betty Batres; por su ayuda durante el breve tiempo que estuve con ustedes.

Lic. Infieri Víctor Marcelino Cortés; por su ayuda incondicional.

Dr. Walter Zea; por su ayuda

Sr. Roque Lemus (Representante de ventas de Boehringer Mannheim) al proporcionarame parte de los materiales necesarios para la investigación.

PREFACIO

La información bibliográfica existente que se refiere a los diferentes matobolitos encontrados en la planta Tecoma stans, ha incluido a los alcaloides con propiedades hipoglucemiantes como tema principal de su investigación. En este trabajo, se presentan los diferentes alcaloides que se encuentran en la planta su origen y estructura, propiedades generales, así como los diversos estudios de caracterización realizados. La investigación sobre otros compuestos químicos presentes en la planta, se incluye en forma cualitativa.

El objetivo fundamental de esta investigación es determinar la capacidad hipoglucemiante a nivel oral, de uno de los alcaloides que se encuentran en la planta, la tecostanina. Es de vital importancia al realizar el trabajo experimental, la determinación del potencial farmacológico de Tecoma stans como hipoglucemiante oral contra la diabetes mellitus, que constituye en ésta y todas la épocas una enfermedad devastadora.

CONTENIDO

	Páginas
PREFACIO	viii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LA LITERATURA	3
A. Clasificación de la planta	3
B. Distribución Geográfica	3
C. Relaciones Biogenéticas	3
1. Biosíntesis de alcaloides del grupo piridina piperidina	4
2. Biosíntesis de los alcaloides monoterpénicos de <u>Tecoma stans</u>	5
D. Fuentes Naturales	7
E. Función Fisiológica	7
1. El sistema -(c)- piperidina como <u>mesa farmacológica</u>	7
2. Efecto antidabético de tecomina y tecostanina	8
3. Actividad hipoglicémica de piridil alcoholes	9
F. Aislamiento	10
1. Aislamiento de tecostanina	10
2. Aislamiento de tecomina	10
G. Caracterización	11
1. Aspectos generales de tecostanina tecomina y tecostidina	11
2. Análisis por cromatografía de papel de los alcaloides de <u>Tecoma stans</u>	11
3. Propiedades de tecomina	12
H. Otros alcaloides de <u>Tecoma stans</u>	13
I. Otros compuestos encontrados en <u>Tecoma stans</u>	14
1. Carotenoides	14
2. Compuestos relacionados con quinonas lipídicas	14

III.	OBJETIVOS	15
IV.	JUSTIFICACION	17
V.	MATERIALES Y METODO	17
VI.	RESULTADOS	23
VII.	DISCUSION	37
VIII.	CONCLUSIONES	39
IX.	REFERENCIAS	41
	APENDICES	
	A. Espectro infrarrojo de tecostanina	43
	B. Espectro infrarrojo de tecomina	45
	C. Espectro visible-UV de tecostanina	47
	D. Espectro visible-UV de tecomina	49

INDICE DE FIGURAS

Número de Figura	Nombre	Páginas
1.	Ejemplo clasificación de alcaloides en base al anillo presente..	1
2.	Estructura de los alcaloides tecostanina y tecomanina.....	2
3.	Biosíntesis de alcaloides vía <u>li</u> sina.....	4
4.	Biosíntesis de alcaloides del grupo piridina-piperidina.....	5
5.	Incorporación de C ¹⁴ de mevalonato a algunos alcaloides de <u>Tecoma stans</u>	6
6.	Metionina como N-metil donador....	6
7.	Sistema de ciclopentano -(c)- piperidina.....	8
8.	Estructura de tolbutamida.....	9
9.	Estructura de 3-(3-metil-2-piridil)porpan-1-ol.....	9
10.	Estructura de actinidina.....	12
11.	Estructura de algunas hidroxiactinidinas.....	13

INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

Tabla	Página
2.1 Algunos alcaloides de <i>Tecoma stans</i>	7
2.2 Aspectos generales de tecomina, tecostanina y tecostidina	11
6.1 Concentración de glucosa en sangre en ratas control.	27
6.2 Concentración de glucosa en sangre en ratas control, 5 días después de la 1a. determinación	27
6.3 Concentración de glucosa en sangre en ratas control, Tween 20.	28
6.4 Concentración de glucosa en sangre en ratas tratadas con glucagón.	28
6.5 Concentración de glucosa en sangre en ratas tratadas con glucagón y tecstanina.	29
6.6 Concentración de glucosa en sangre en ratas tratadas con glucagón y extracto etérico líquido	30
6.7 Efecto de tratamiento en la concentración de <u>glu</u> cosa.	30

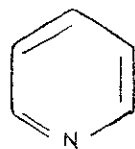


Tabla		Páginas
6.8	Análisis de Varianza.....	31
6.9	Comparación entre medias.....	32
6.10	Test de homogeneidad de varian- za.....	32
Gráfica		
4.1	Curvas de glicemia contra tiempo	33
4.2	Curvas de glicemia contra tiempo	35

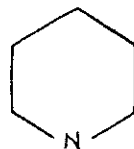


I. INTRODUCCION

Los alcaloides no representan un grupo químicamente homogéneo de tal forma que cualquier generalización acerca de ellos está sujeto a muchas excepciones. Todos ellos contienen nitrógeno, frecuentemente en un anillo heterocíclico, y muchos pero no todos son básicos como su nombre lo indica. La clasificación de alcaloides está hecha en las bases del sistema de anillo presente, por ejemplo, piridina y piperidina, (veáse figura 1).



piridina



piperidina

Figura 1. Ejemplo de clasificación de alcaloides en base al anillo presente.

Los alcaloides se distinguen de la mayoría de componentes de las plantas por su naturaleza básica. Por lo tanto, ellos normalmente existen en las plantas como las sales de varios ácidos orgánicos y son frecuentemente manejados en el laboratorio como las sales de ácido sulfúrico o clorhídrico. Estas sales, y en su gran mayoría los alcaloides libres, son compuestos cristalinos incoloros. Pocos alcaloides son líquidos, y más raros aún los colo-reados.

Los alcaloides están ampliamente distribuidos a través del reino vegetal. Se ha estimado que el porcentaje de alcaloides contenidos en varias especies de plantas oscila entre 15-30%. Generalmente los alcaloides que se encuentran en las plantas poseen alguna propiedad farmacológica o de otra índole; como lo que ocurre con los alcaloides tecostanina y tecomanina extraídos de Tecoma stans, (véase figura 2).

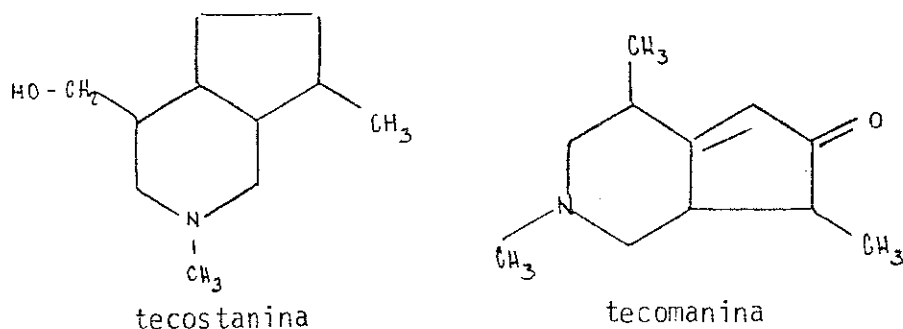


Figura 2. Estructura de los alcaloides tecostanina y tecomanina.

La propiedad que se le atribuye a estos alcaloides es el de ser potentes hipoglucemiantes.

II. REVISION DE LA LITERATURA

A. Clasificación de la planta:

Género: *Tecoma*

Especie: *Tecoma stans* (L) HBK

Familia: Bignoneaceae

B. Distribución geográfica:

Tecoma stans (L) HBK. *Stenolobium stans*. Timboco; timboque; chacté; barreto.

En bosques densos húmedos o secos, frecuentemente sobre laderas rocosas, a 1500 metros o menos, principalmente debajo de los 1000 metros; Baja Verapaz; El Progreso; Zacapa; Chiquimula; Jalapa; Jutiapa; Santa Rosa; Escuintla; Guatemala; Sacatepéquez; Retalhuleu; Quetzaltenango; San Marcos. Suroeste de los Estados Unidos a través de México; El Salvador a Panamá; Oeste de las Indias; Sur de América. (19).

C. Relaciones biogenéticas:

Las unidades simples de donde provienen los alcaloides son los aminoácidos resultantes de la descomposición de proteínas.

1. Biosíntesis de alcaloides del grupo piridina-piperidina

En la naturaleza una serie de anillos de bases homólogas, presuntamente derivan del aminoácido lisina. Por ejemplo para la biogénesis de metilisopelletierina, puede ser representado por la secuencia de lisina, (metil-isopelletierina), y deconiina vía lisina, (veáse figura 3).

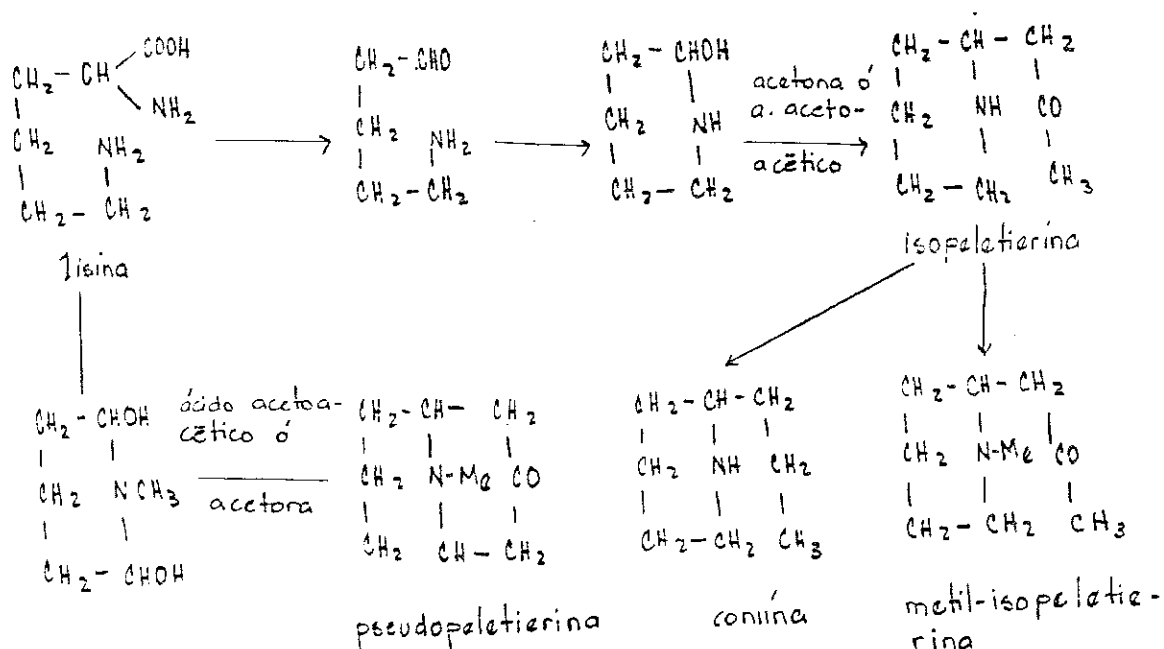


Figura 3. Biosíntesis de algunos alcaloides vía lisina.

La participación de C_3 y C_4 (compuestos de tres y cuatro carbonos) en varios puntos en la figura anterior son evidentes, y éstos participantes están la mayoría interrelacionados por ejemplo, acetona y ácido acético. Estos compuestos sin embargo, derivan de los componentes de las plantas. Algunos intermediarios con cadenas de cuatro carbonos son probablemente hechos por adición de acetoacetato o por adiciones sucesivas de dos unidades de acetato a algún precursor del anillo heterocíclico, (veáse figura 4).

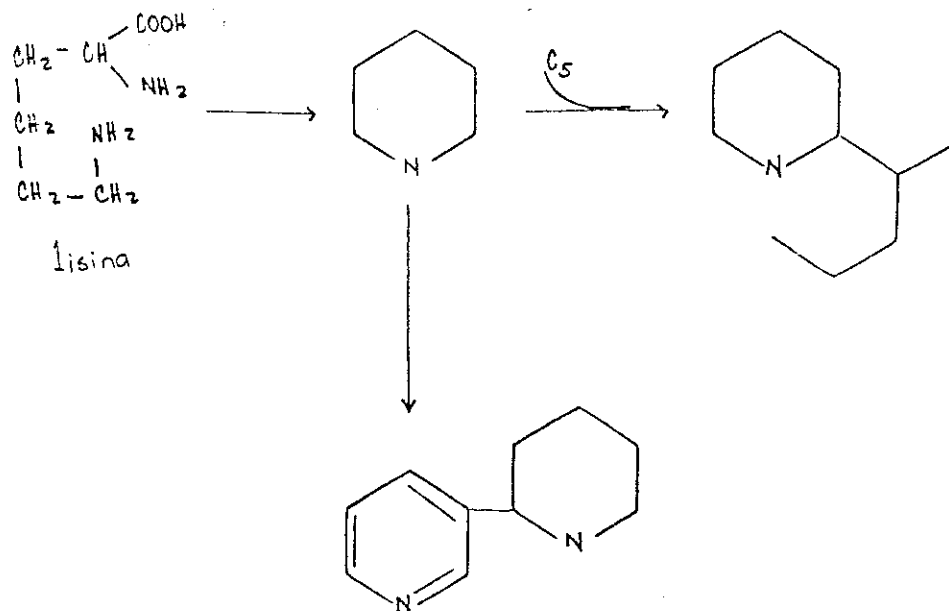


Figura 4. Biosíntesis de alcaloides del grupo piridina-piperidina.

2. Biosíntesis de los alcaloides monoterpénicos de Tecoma stans.

Estudios sobre la biosíntesis de los alcaloides de la planta muestran que la radioactividad del C¹⁴ es incorporado dentro de esquitantina, (veáse figura 5). Los resultados proveen evidencia del origen monoterpénico de estos alcaloides; ya que también se incorpora el carbono marcado del mevalonato a 5-dihidroesquitantina, tecostanina, tecomanina y boschniaquina. N-normetilesquitantina y esquitantina muestran una alta velocidad de incorporación y pueden servir como precursores de los otros alcaloides piperdínicos de Tecoma, (6)

El grupo N-metil es derivado de Metionina, (veáse figura 6).

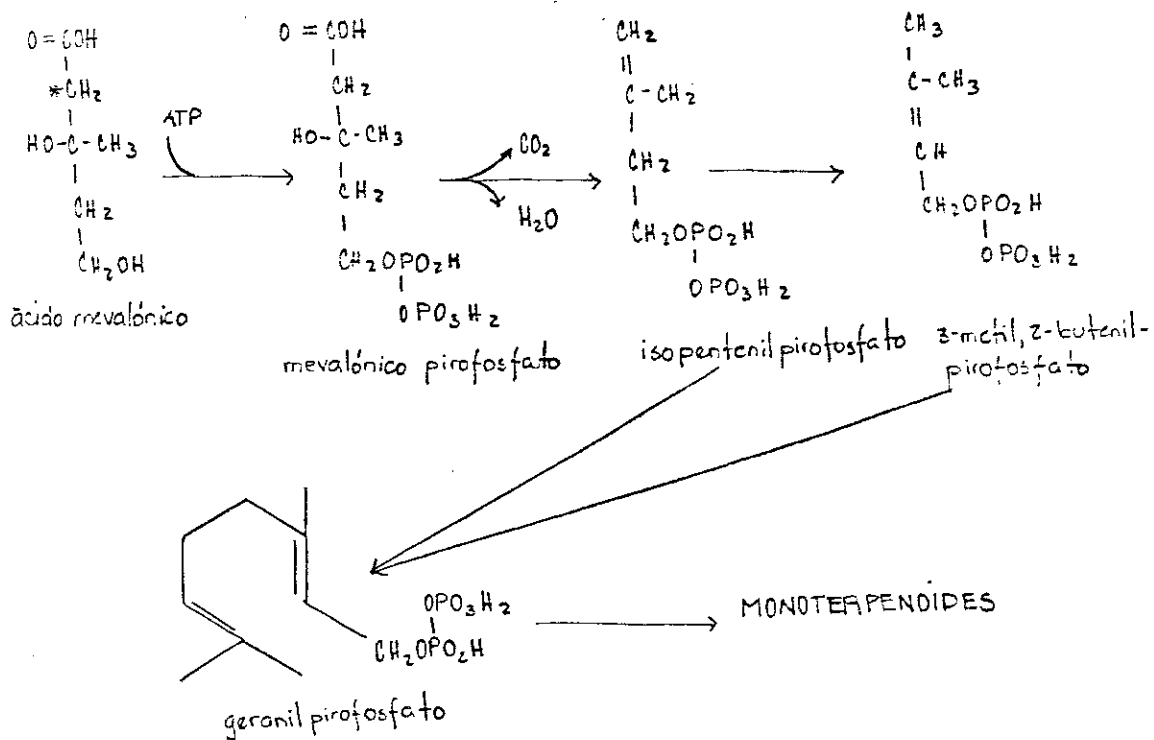


Figura 5. Incorporación de C¹⁴ de mevalonato a algunos alcaloides de Tecoma stans.

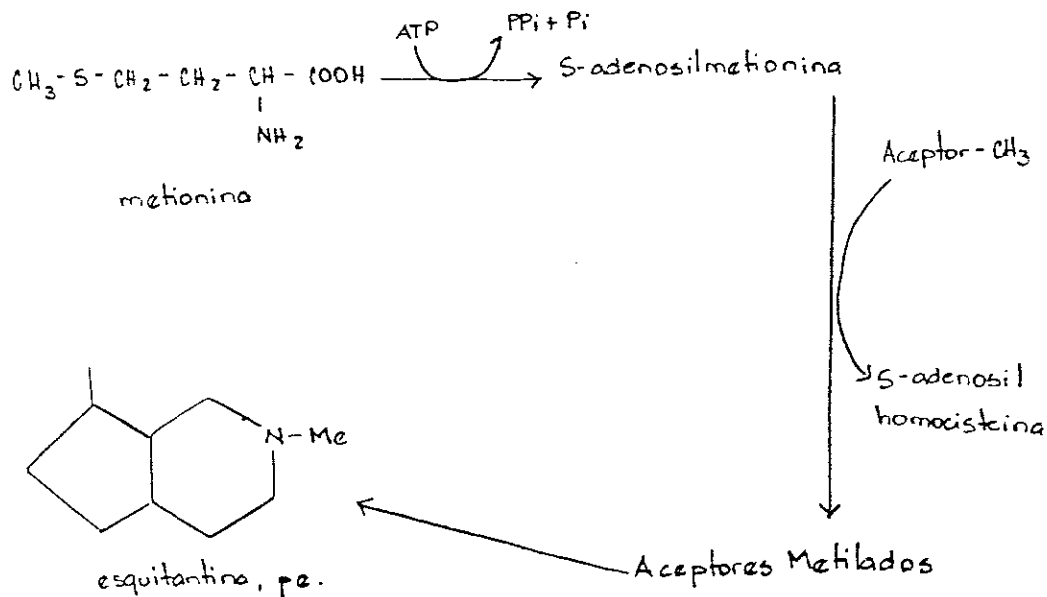


Figura 6. Metionina como N-metil donador

D. Fuentes naturales

Los alcaloides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (veáse Introducción). A través de la gran variedad de plantas en que se encuentran algunos alcaloides pueden éstos localizarse en las hojas, corteza (si la tiene), raíz y fruto de la planta. A continuación se presenta una tabla de los diferentes alcaloides que se encuentran en Tecoma stans.

Tabla 2.1. Algunos alcaloides de Tecoma stans, (16)

Familia	Género	Especie	Alcaloide
Bign-001A	Tecoma	T. <u>stans</u>	Tecomina
Gign-001A	Tecoma	T. <u>stans</u>	Tecomanina
Bign-002A	Tecoma	T. <u>stans</u>	Tecostanina
Bign-006	Tecoma	T. <u>stans</u>	Tecoma Base

E. Función fisiológica

1. El sistema -(c)-piperidina como promesa farmacológica

En el T. stans fueron encontrados varios alcaloides que son o se derivan de un trimetil derivado de ciclopentano -(c)-piperidina, (veáse figura 7).

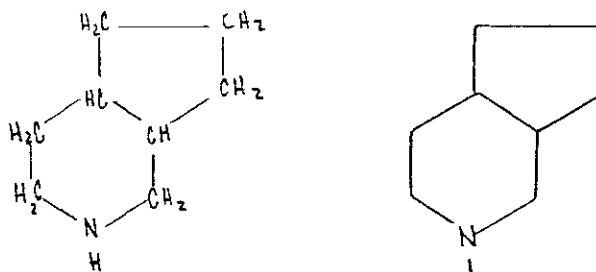


Figura 7. Sistema de Ciclopentano-(c)-piperidina

La actividad farmacológica de este sistema fue el de ser potentes agentes hipoglucemiantes, (1).

2. Efecto antidiabético de tecomina y tecostanina

Las propiedades hipoglucémicas de citrato de tecomina y cloruro de tecostanina en el azúcar de la sangre y tolerancia de glucosa se determinaron en un experimento realizado con conejos diabéticos sin páncreas, obteniéndose el resultado que solamente, en la presencia del páncreas tecomina y tecostanina, eran drogas o agentes antidiabéticos efectivos, (13).

Ensayos biológicos de las propiedades hipoglucémicas de tecomina y tecostanina se realizaron en conejos albinos normales, con un peso entre 1.5-2Kg. Los conejos se mantuvieron en ayuno durante doce horas, para luego ser inyectados con los alcaloides en solución salina isotónica. Utilizaron el compuesto tolbutamida como medio de comparación, (veáse figura 8).

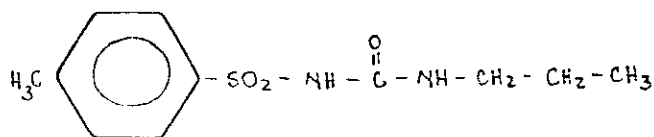


Figura 8. Estructura de tolbutamida

Tecomina y tecostanina fueron agentes hipoglucemiantes potentes cuando se les administraba intravenosamente, encontrándose la dosis letal en ratones, la cual fue de 300 mg./Kg. (12).

3. Actividad hipoglicémica de piridil alcoholes

La potente actividad hipoglicémica de 3-(3-metil-2-piridil)-propan-1-ol, (véase figura 9), indujo a sintetizar y estudiar estructuras relacionadas. Algunas de las variables estudiadas fueron la posición de los grupos metil y alcohol en las cadenas laterales, la distancia del anillo heterocíclico y el grupo hidroxilo, el efecto de sustitución nuclear adicional y los efectos de ramificación y sustitución en la cadena lateral donde se encuentra el grupo alcohol.

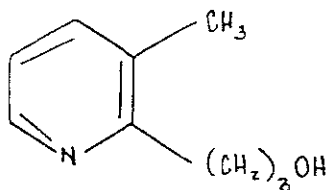


Figura 9. Estructura de 3-(3-metil-2-piridil) popan-1-ol.

Los compuestos fueron probados en ratas en ayunas de 48 horas, usualmente a una dosis de 150 mg./kg. de peso, (2).

Los efectos de la longitud de la cadena lateral sobre la actividad hipoglicémica fue determinada preparando análogos del compuesto de la figura 9, en el cual la cadena lateral de C-2 fue acortada por uno o dos carbonos, (14). El efecto producido moviendo el 3-metil sustituyente en el compuesto original a C-5 fue notado preparando 3-(5-metil-2-piridil) propan-1-ol, (5).

F. Aislamiento

1. Aislamiento de tecostanina

Polvos de las hojas secas (1.2 Kg.) de Tecoma stans fueron mezclados con 600 ml. de NH₃ acuoso al 3% y extraído continuamente con Et₂O. La solución al 5% y la otra parte lavada con Et₂O y basificada con NH₃ acuoso. Después de secar y remover el solvente, 5.4 gr. (0.45%) de un residuo aceitoso es obtenido por extracción con Et₂O. Cromatografía sobre 170 gr. de Al₂O₃ dio 357 mg de tecomina, eluida con C₆H₆, y 1.149 gr. de tecostanina, eluida con Et₂O, (7).

2. Aislamiento de Tecomina

Hojas secas pulverizadas, 500 gr. fueron tratados con Et₂O, la solución de Et₂O fue extraída con un total de un litro de ácido clorhídrico al 5% para dar una capa de Et₂O conteniendo triterpenos, hidrocarburos, resi

nas y una capa ácida (conteniendo los alcaloides) la cual se alcaliniza y extrae con CHCl_3 . La solución de cloroformo se seca con Na_2SO_4 anhidro, filtrar y evaporar. El residuo de alcaloides, 1.19 gr., se toma para cromatografía sobre 57 gr. de Al_2O_3 , colectando fracciones de 100 ml. de los solventes siguientes: 400 ml. de éter de petróleo, 400 ml. de benceno, 300 ml. de una solución Et_2O - EtOH en una proporción 2:1 y 200 ml. 1:1 en Et_2O - EtOH . La fracción₂₀ de éter de petróleo da un alcaloide líquido, tecomina, de ()_D de -20 ± 2 , mostrando un grupo CO en los espectro UV e infrarrojo, (11).

G. Caracterización

1. Aspectos generales de tecomina, tecostanina y tecostidina

Tabla 2.2

Alcaloide	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Punto Fusión
Tecomina	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$	179.17 gr/mol	125
Tecostanina	$\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}$	183.30	82
Tecostidina	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$	163.22	aceite

2. Análisis por cromatografía de papel de los alcaloides de Tecoma stans

Fue investigado el contenido de alcaloides en el tejido calloso de Tecoma stans, el cual se sembró en los medios de cultivo siguientes: Mura

shogui-Mei-Lie Lin (M-L) y Rt-K suplementados con los precursores de los alcaloides de Tecoma, como lisina, ácido mevalónico, lactona, y ácido quinolí-nico, (4). Los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos paralela-mente por el análisis de hojas de la planta. Siete manchas de alcaloides fue-ron detectados en las hojas del extracto: actinidina (véase figura 10), 4-noractinidina, boschniaquina, tecomanina, dos manchas de derivados de esqui-tantina y una mancha no identificada.

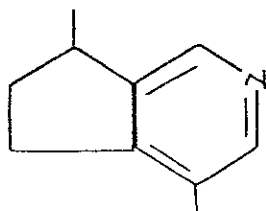


Figura 10. Estructura de actinidina

Una mancha correspondiente a un derivado de esquitantina aparece en los extractos del tejido calloso en cultivo sobre el medio basal M-L su-plementado con lisina, lactona o ácido mevalónico. Sin embargo, 3 manchas de alcaloides fuerin revelados en extractos de parénquima homogéneo. Además de los derivados de esquitantina mencionados, actinidina y tecomanina fueron identificados.

3. Propiedades de tecomina

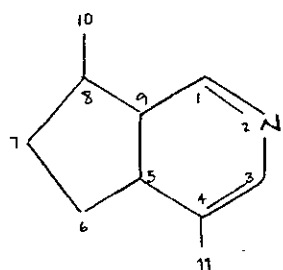
Tecomina, el alcaloide consierado como el mayor factor antidiabé-tico de I. stans, pero aparentemente baja estabilidad, fue sometido a un es-tudio para determinarla. La degradación del alcaloide está sujeto al pH de

su solución y los antioxidantes son benéficos en demorar su deterioro. La forma cristalina establece del alcaloide es como picrato de tecomina (10).

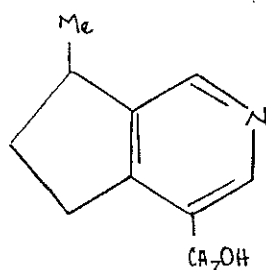
Las constantes física de tecomina y tecamanina son muy similares y las dos son probablemente idénticas (8).

H. Otros alcaloides de *Tecoma stans*

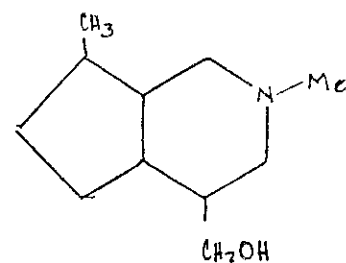
El alcaloide tecostidina, es la 11-hidroxiactinidina y la tecostanina es la correspondiente N-metilpiperidina, (véase figura 11), (9).



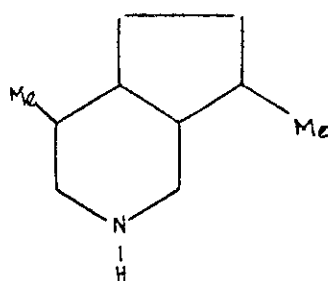
actinidina



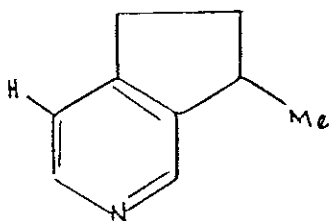
tecostidina



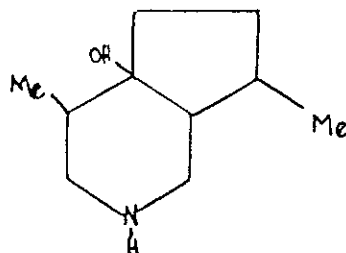
tecostanina



N-normetilesquitantina



4-noractinidina



boschniaquina

Figura 11. Estructuras de algunas hidroxiactinidinas.

I. Otros compuestos encontrados en Tecoma stans

1. Carotenoides

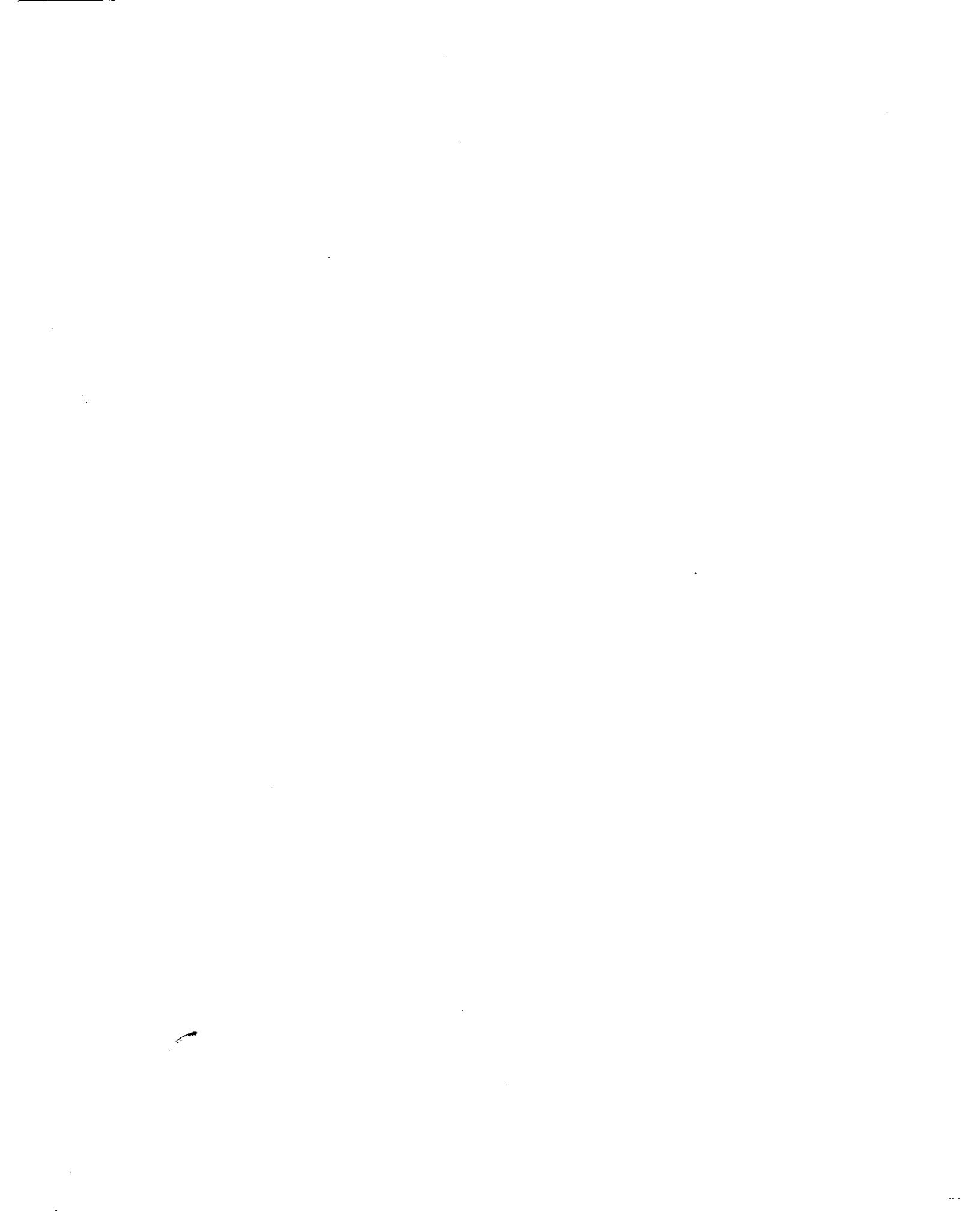
Los pétalos de las flores de este árbol contiene 45.01 mg. de carotenoides totales/ 100 gr. Los carotenoides incluían fitoeno, fitoflueno I, fitoflueno II -caroteno. -caroteno y mutatocromo. (20). Las xantófilas encontradas fueron cis-violaxantín, criptoxantín, mono y diepoxieriptoxantín, (15).

2. Compuestos relacionados a quinonas lípidas

Por saponificación de las hojas de I. stans fue preparado un compuesto al cual se le denominó compuesto "s". Lípidos no saponificables fueron fraccionados en alúmina desactivada al 5%, con petróleo claro. El compuesto "s" fue eluido en benceno al 20% y ubiquinona en Et₂O al 5%. Cromatografía de fracciones conteniendo el compuesto "s" sobre sílica gel G con bencenopetróleo claro al 5% en fenol y salesenol en dioxano en presencia de BF₃ a temperatura ambiente fue realizada. El compuesto "s" muestra fluorescencia azul al exponerlo a luz ultravioleta. Da un color rosado estable con álcali. La absorción máxima de UV fue de 272 y 310 nm. con los bordes a 260 y 298 nm. Al tratarlo con Ag₂O, resulta perdiendo las características de fluorescencia y el color rosado en el test fenólico. El espectro IR muestra bandas mayores a 800 1020, 1270, 1470, 1640, 2850, 2925 y 2900 1/cm. La región 3300-3600 no muestra bandas lo que significa la ausencia de grupos OH libres. El compuesto "s. no tiene una movilidad relativa a ubiquinona, (18), (3).

III. OBJETIVOS

1. Lograr aislar los alcaloides tecomina y tecostanina del árbol Tecoma stans; por medio de métodos químicos ya establecidos.
2. Determinar si el alcaloide tecostanina, presenta efecto hipoglucemiante, al ser administrados oralmente.



IV. JUSTIFICACION

Siendo el Tecoma stans una planta que se encuentra ampliamente distribuida en el territorio de Guatemala, y teniendo como referencia inicial que popularmente, se utilizaban sus hojas en infusiones para combatir la diabétes mellitus; me entró la inquietud de realizar una investigación más a fondo que lo corroborara. Pero no simplemente era importante llegar a un resultado ya fuese éste positivo o negativo; sino que al obtenerlo poder dar a conocerlos efectos farmacológicos de esta planta. Para que pueda ser utilizada como un potente hipoglucemiante, especialmente a nivel rural, y llegar a tener la importancia y utilidad en el tratamiento de la diabétes como la tiene la insulina; además de ser ésta una via más accesible en el aspecto económico.



V. MATERIALES Y METODO

1. Materiales

- Ampolla de decantación (4000; 100 ml)
- Erlenmeyer (1000, 250 ml)
- Beakers (1000, 250, 50, 25, 10 ml)
- Probetas (1000, 100 10 ml)
- Embudo Buchner y embudo de vástago largo
- Columnas para Cromatografía

2. Reactivos

- Dietil-éter (grado industrial)
- Hidróxido de amonio (industrial)
- Acido clorhídrico
- Benceno
- Alúmina Neutra Actividad I (0% de agua)
- Polioxietileno sorbital monolaurato (Twee 20)
- Glucagón
- Glucocintas (Haemo-Glukotest 20-800 R)

3. Procedimiento

- A. Se molieron 2500 gramos de hojas secas de Tecoma stans
- B. Se agregaron 10,100 ml de Dietil-éter
2,100 ml de Hidróxido de amonio al 3%

1a. extracción:

4000 ml de dietil éter

1500 ml de hidróxido de amonio al 3% dejándose reposar durante 4 semanas.

2a. extracción:

1500 ml de dietil éter

dejándose reposar durante 4 días.

3a. extracción:

2600 ml de dietil éter

dejándose reposar durante 2 semanas

4a. extracción:

200 ml de dietil éter

600 ml de hidróxido de amonio al 3% dejándose reposar durante una semana.

C. Reducción del volumen del extracto etérico en rotavapor, de 10 litros a aproximadamente 800 ml.

D. Extracción de alcaloides con HCl 5%, utilizándose para ello 4950 de ácido, en porciones de 250 ml en cada extracción.

E. El extracto ácido fue basificado con hidróxido de amonio (280 ml, 15 M), el pH resultante fue de 9.

F. Se extrajo con dietil éter, 10,000 ml en porciones de 200 mililitros.

- G. Se redujo el volumen a 200 ml de extracto etérico, el cual se seca utilizando sulfato de sodio anhidro. El solvente remanente se elimina burbujendo N_2 , utilizando bajo de vapor.
- H. El residuo (5.3 gr) se hace pasar en Cromatografía de columna con óxido de alúmina neutra (actividad I). Se utilizaron los eluentes en la siguiente forma.

1a. columna:

Benceno: 700 ml
Benceno-Dietil éter: 300 ml
Dietil éter: 550 ml

2a. columna:

Benceno: 600 ml
Benceno-Dietil éter: 200 ml
Dietil-éter: 800 ml

3a. columna:

Benceno: 1100 ml
Benceno-Dietil éter: 200 ml
Dietil éter: 2300 ml

- I. Se redujo volumen de dietil éter, logrando hasta que el volumen fuera de aproximadamente 20 ml, se iniciara cristalización.

4. Modelo Matemático:

Factorial

$$Y = \mu + T_i + Q_j + TQ_{ij} + E_{m(i,j)}$$

Y = Concentración glucosa sanguínea en ratas

= Media total de glucosa sanguínea

T_i = Tiempo, $i = 1, 2, 3, 4, 5$ (efecto)

Q_j = Tratamiento, $j = 1, 2, 3, 4$ (efecto)

TQ_{ij} = Efecto por interacción tiempo y tratamiento

$E_{m(i,j)}$ = Efecto por aleatorización, $m = 1, 2, 3, 4, 5$ para todo i, j .

Hipótesis:

H_0 : No existe diferencia significativa entre medias

$H_0(1)$: $T_i = 0$ No existe efecto significativo debido al tiempo

$H_0(2)$: $Q_j = 0$ No existe efecto significativo de tratamiento sobre la concentración de glucosa en la sangre

$H_0(3)$: $TQ_{ij} = 0$ No existe diferencia significativa por el efecto interacción tiempo

5. Trabajo Experimental

Muestreo: se colocaron 25 ratas (machos, de 5 semanas después de destete, línea en 5 jaulas; 5 por jaula, totalmente al azar.

Jaula # 0: Control

Jaula # 1: Contro Tween 20

Jaula # 2: Tratadas sólo con Glucagón

Jaula # 3: Tratadas con Glucagón y Tecostanina

Jaula # 4: Tratadas con Glucagón y extracto etérico líquido

Control:

A un grupo de cinco ratas con un peso promedio de 100.7 gr., en ayuno de 12 horas, se les determinó glucosa sanguínea a intervalos de media hora, durante dos horas. Para ello se hizo uso de glucocintas, en las que se colocó una gota de sangre tomada del tronco de la cola de la rata. Se tomaron las lecturas en un reflectómetro (RefloLux, de la casa comercial de productos químicos Boehringer Mannheim).

Control Tween 20:

A un grupo de cinco ratas con un peso promedio de 139.5 gr., en ayuno de 12 horas, se les administró oralmente con una sonda metálica, una solución de Tween 20 (solución acuosa). Determinándoles la glicemia media hora después del tratamiento. Previo a la administración se les realizó una determinación.

Tratadas sólo con Glucagón:

A un grupo de ratas con un peso promedio de peso de 127.6 gr., en ayuno de 12 horas, se les inyectó intraperitonealmente 6.5 /ml de glucagón. Determinándoseles glicemia antes del tratamiento y después a intervalos de 45 minutos durante 3 horas.

Tratadas con Glucagón y Tecostanina:

A un grupo de ratas con un peso promedio de 110.5 gr., en ayuno de 12 horas, se les determinó la glicemia antes y después del siguiente tratamiento: se les inyectó 6.5 /ml de glucagón intraperitonealmente 105 minutos después se determinó la glicemia. Después se les administró oralmente 15 mg de tecostanina en suspensión con Tween 20. Se realizaron 3 determinaciones de la glicemia a intervalos de 30 minutos.

Tratadas con Glucagón y extracto etérico líquido:

A un grupo de ratas con un peso promedio de 129 gr., en ayuno de 12 horas, se le administró el extracto etérico líquido en suspensión con Tween 20, llevándose a cabo la misma secuencia de tratamiento que el experimento anterior. La concentración de extracto fue de 98 mg por rata.

VI. RESULTADOS

A. Pruebas cualitativas

<u>Prueba</u>	<u>Resultado</u>
1. <u>Flavonoides</u>	
a. Prueba de Shinoda	Negativo
b. Test de Cianidina	Negativo
c. Test de Leucoantocianidina	Negativo
d. Prueba de Marini Bretolo	Positivo
e. Prueba de Dimroth	Negativo
2. <u>Alcaloides</u>	
a. Reactivo de Mayer	Positivo
b. Reactivo de Dragendorff	Positivo
c. Mayer modificado	Positivo
d. Dragendorff modificado	Positivo
3. <u>Glicósidos carditónicos</u>	
a. Lactonas insaturadas	Positivo
b. Reactivo de Baljet	Positivo
c. Prueba de Legal	Positivo
d. Prueba de Raymond	Negativo

<u>Prueba</u>	<u>Resultado</u>
4. <u>2-Desoxiazúcares</u>	
a. FeCl	Negativo
b. Xantidrol	Negativo
5. <u>Esteroles</u>	
a. Prueba de Liberman Burchard	Positivo
b. Prueba Rosenheim	Positivo
c. Prueba Salkowski	Negativo
6. <u>Saponinas</u>	
a. Prueba de Liberman Burchard	Positivo
b. Prueba de Espuma	Positivo
7. <u>Quinonas</u>	
a. Prueba de Borntrager	Negativo
b. Prueba de Borntrager Modificado	Negativo
8. <u>Taninos y/o Polifenoles</u>	
a. Gelatina 1%	Negativo
b. NaCl/Gelatina 1%	Negativo
c. FeCl ₃	Positivo

Tabla 6.1

Concentración de glucosa en sangre (mg/dl) en ratas control

Peso rata (gr)	Tiempo (minutos)		
	0	30	60
1. 108.3	60	96	86
2. 99.3	64	69	52
3. 95.7	65	86	59
4. 102.3	63	52	52
5. 97.8	58	59	52

Tabla 6.2

Concentración glucosa en sangre (mg/dl) en ratas control

5 días después de la primera determinación

Peso rata (gr)	Tiempo (minutos)		
	0	30	60
1. 141.8	74	75	69
2. 126.1	83	52	65
3. 123.1	77	75	75
4. 139.7	68	57	79
5. 130.5	67	95	83

Tabla 6.3

Glicemia (mg/dl) en ratas control, Tween 20

Peso Rata (gr)	Tiempo (minutos)		
	0	30	60
1. 146.6	88	61	77
2. 139.4	74	121	71
3. 140.5	86	68	87
4. 124.8	97	67	87
5. 146.0	57	102	66

Tabla 6.4

Glicemia (mg/dl) en ratas tratadas con glucagón

6.5 g intraperitoneal

Peso Rata (gr)	Tiempo (minutos)				
	AAG 0	DAG 45	DAG 90	DAG 135	DAG 180
1. 131.8	63	91	115	72	82
2. 121.5	104	91	92	75	55
3. 140.5	119	172	94	87	78
4. 120.1	86	86	78	64	58
5. 124.1	74	74	107	87	71

Tabla 6.5
 Glicemia (mg/dl) en ratas tratadas con alcaloide
 (19 mg tecostanina/rata)

Peso rata (gr)	Tiempo (minutos)				
	0/AAG	105/DAG	<u>135/DAG</u> 30/DAT	<u>165/DAG</u> 60/DAT	<u>195/DAG</u> 90/DAT
1. 108.0	87	57	25	35	48
2. 104.6	54	58	44	46	30
3. 110.0	65	63	76	43	58
4. 117.6	47	62	41	30	44
5. 112.1	62	66	57	49	61

AAG = antes administración glucagón

DAG = después administración glucagón

DAT = después administración tecostanina

DEEL= después administración de extracto etérico

Tabla 6.6
Glicemia (mg/dl) en ratas tratadas con extracto
etérico líquido 98 mg/rata

Peso rata	Tiempo (minutos)				
	0/AAG	105/DAG	<u>135/DAG</u> 30/DEEL	<u>165/DAG</u> 60/DEEL	<u>195/DAG</u> 90/DEEL
1. 130.6	80	85	60	58	56
2. 121.4	80	63	91	55	85
3. 132.1	85	86	63	65	60
4. 123.1	65	97	47	71	50
5. 141.6	48	76	100	58	77

Tabla 6.7
Efecto por tratamiento sobre la glicemia en ratas en (mg/dl)

Observaciones	Tratamiento a=4			
	Control	Tecostanina	Glucagón	Extracto L
1	73	35	115	58
2	67	46	92	55
3	76	43	94	65
4	68	30	98	71
<u>5</u>	<u>83</u>	<u>49</u>	<u>105</u>	<u>58</u>
	367	203	506	307

Cómputos preliminares

1. Gran total = $\sum Y = 1383$
2. Suma de observaciones al cuadrado = $\sum Y^2 = 106195$
3. Suma de los totales por grupo al cuadrado dividido por $n = 1/n$
 $(\sum Y)^2 = 1/5 (526183) = 105236.6$
4. Gran total al cuadrado y dividido por el número total de muestras
 $= CT = 1/an (\sum Y)^2 = (1383)^2/5 \times 4 = 95634.4$
5. $SS_{total} = \sum Y^2 - CT$
 $= 106195 - 95634.4 = 10560.55$
6. $SS_{grupos} = 1/n (\sum Y)^2 - CT$
 $= 105236.6 - 95634.4 = 9602.05$
7. $SS_{dentro} = SS_{total} - SS_{grupos} = 10560.55 - 9602.05 = 958.5$

Tabla 6.8
Análisis de varianza

Fuente Variación	gl	SS	MS	Fa
$Y - \bar{Y}$ (entre tratamiento)	3	9602.05	3200.68	53.42
$Y - \bar{Y}$ (error por réplica)	16	958.5	59.90	
$Y - \bar{Y}_{total}$	19	10560.55		
$F_{0.05}(3,16)$	3.24*		$F_{0.01}(3,16)$	5.29**

Tabla 6.9
Comparación entre medias

	Control	Tecostanina	Glucagón	Extracto L
\bar{Y}	73.4	40.6	97.2	61.4
Y	367	203	506	307
n	5	5	5	5

$$\begin{aligned}
 SS_{(\text{control vrs. trat})} &= \frac{(367)^2}{5} + \frac{(203 + 307)^2}{10} \\
 &= \frac{(367 + 203 + 307)^2}{15} = 1672.5
 \end{aligned}$$

$$F_s \frac{1672.5}{59.9} = 27.92^{***} \quad F_{0.01}(1,16) = 8.53$$

$$F_s \quad F_{0.01}(1,16)$$

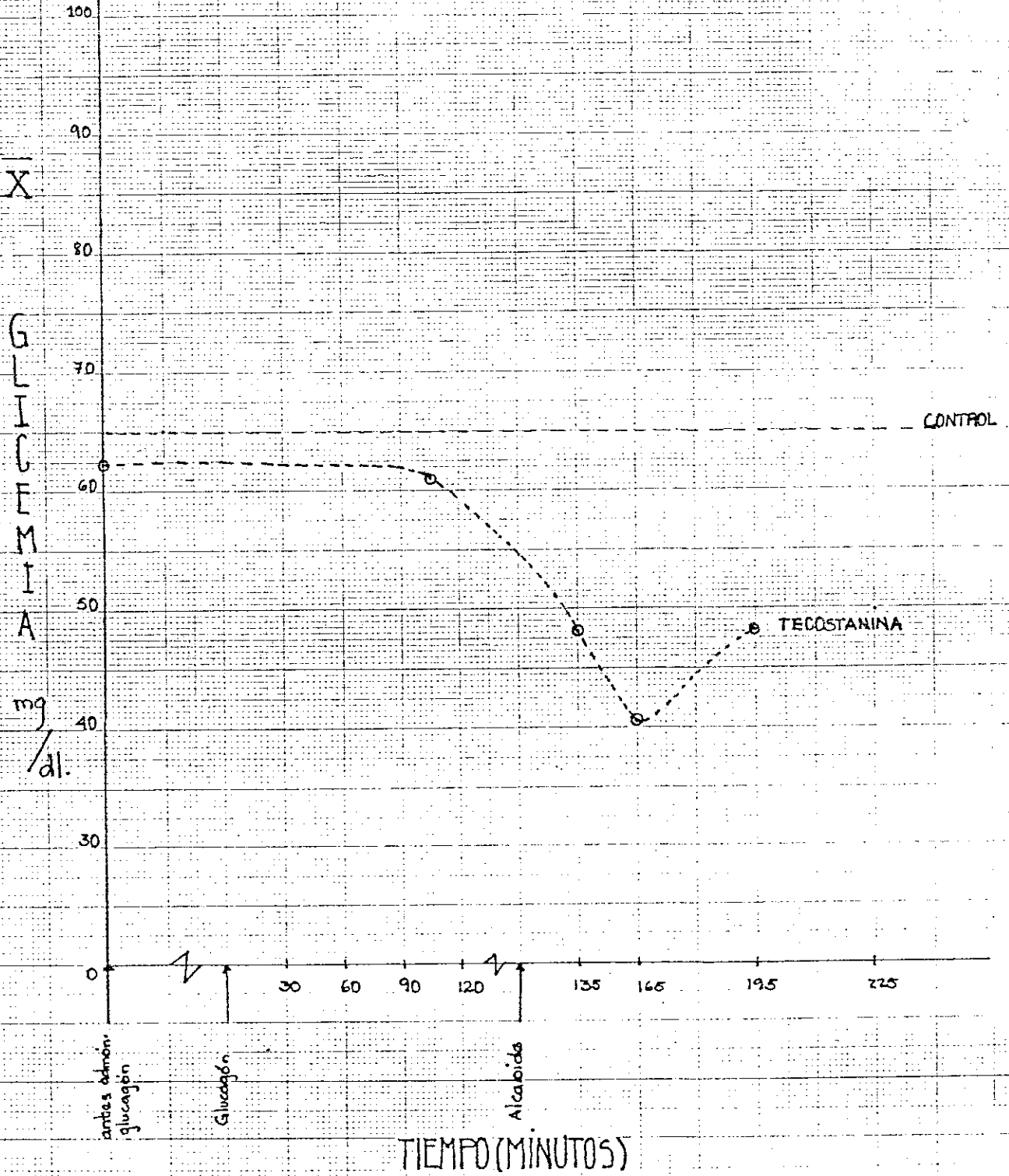
Tabla 6.10
Test de homogeneidad de varianzas

	Control	Tecostanina	Glucagón	Extracto L
2	33.76	49.84	162.58	398.8
$F_{\text{obs.}}$		1.48	4.85	11.81

$$F_{0.01}(4,4) = 16^*$$

$$F_{\text{obs}} \quad F_{0.01}(4,4) \quad 1^2 = 2^2$$

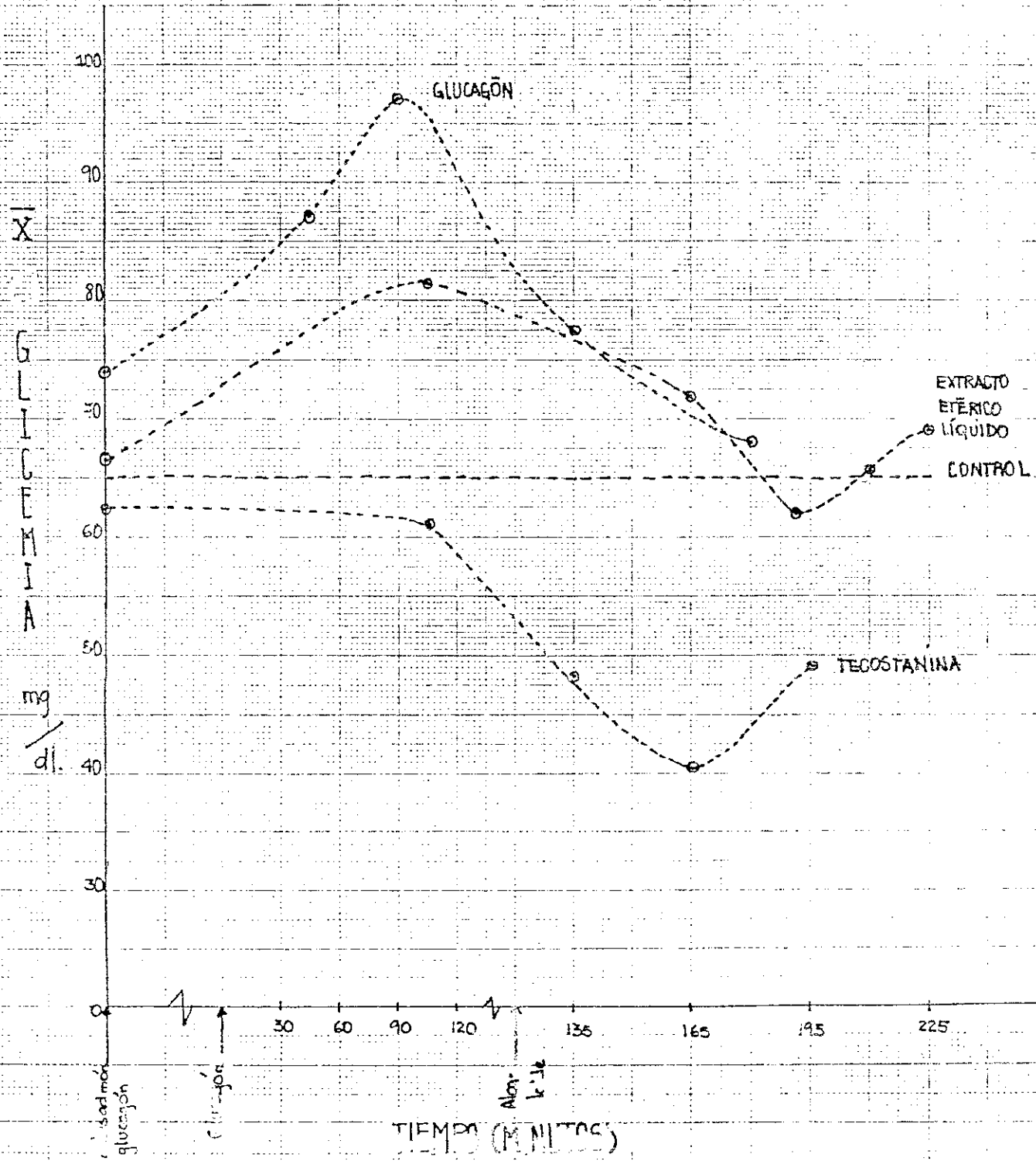
CURVAS DE GLICEMIA YRS TIEMPO



10x10cm
LITO-OFFSET FUENTES. TEL.28-3-01



CURVAS DE GLICEMIA VRS TIEMPO



10x10 cm.
LITO-OFFSET FUENTES. TEL. 28-3-01

VII. DISCUSION

Luego de concluídos, la investigación bibliográfica, pruebas cuantitativas de laboratorio y el trabajo experimental con un grupo de ratas albinas, a las que se les administró oralmente el alcaloide, extraído de la planta Tecoma stans; se pudo establecer estadísticamente que el efecto de dicho compuesto es de ser un agente hipoglucemiante.

Se puede inferir el alto grado de actividad del alcaloide con el siguiente razonamiento; las ratas a las que se les administró el alcaloide, habían sido tratadas con glucagón y sin embargo la concentración de glucosa en sangre llegó a niveles tan bajos que el reflectómetro (Reflolux) no logró detectar, obteniéndose las lecturas visualmente, comparándose con patrones establecidos.

En este tipo de investigación, es de gran importancia el tratamiento estadístico que se aplique, de acuerdo con el grupo de datos que se tengan. Es por esta razón que se hizo imperativo realizar el test para comprobar la homogeneidad de las varianzas. No existió diferencia significativa entre varianzas a un nivel de confianza del 99%.

De acuerdo a las hipótesis propuestas al inicio de la investigación, se logró establecer en primer lugar, que existe diferencia altamente significativa entre medias, a un nivel de confianza del 99.9%. Así como también que existe un efecto significativo en la concentración de glucosa en san

gre debida al tratamiento. Con respecto al efecto por interacción tiempo tratamiento, la diferencia es notoria, pues tanto el glucagón como el alcaloide tecstanina, tienen una acción farmacológica en el organismo de la rata que decae con el tiempo.

Es importante mencionar y comentar al respecto de lo que se denominó Extracto Etérico Líquido. Esta porción fue obtenida cuando por cromatografía de columna se extrajo el alcaloide tecostanina con dietil éter. Esta fue una fracción que después que se le hizo el tratamiento de secamiento y evaporación de solvente no cristalizó, sino quedó un residuo líquido con un olor penetrante, parecido al olor de la nicotina. Se obtuvo un espectro IR de este residuo de color rojizo quemado, sin embargo no pudo obtenerse mayor información, ya que el aparato no resolvió adecuadamente; o también hubiera sido necesario purificar más el compuesto. Este extracto fue utilizado también para probar su actividad farmacológica; obteniéndose que también disminuye el azúcar de la sangre. Siendo este resultado estadísticamente significativo.

Ha sido muy importante el comprobar la efectividad de uno de los alcaloides de Tecoma stans, como hipoglucemiante oral; ya que entonces esta planta se convierte en una gran promesa farmacológica.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1. El alcaloide tecostanina extraído de T. stans es un compuesto con gran actividad hipoglucemiante a nivel oral.
2. Con respecto a las hipótesis propuestas, se rechazan, estableciéndose lo siguiente:
 - a. Existe diferencia significativa entre medias
 - b. Existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 99% en el efecto por tratamiento en la concentración de glucosa sanguínea.
3. Por la respuesta obtenida se hace necesario que la concentración del alcaloide sea mayor para que tenga efecto más duradero, o que se administren varias dosis a intervalos de tiempo adecuados.



IX. REFERENCIAS

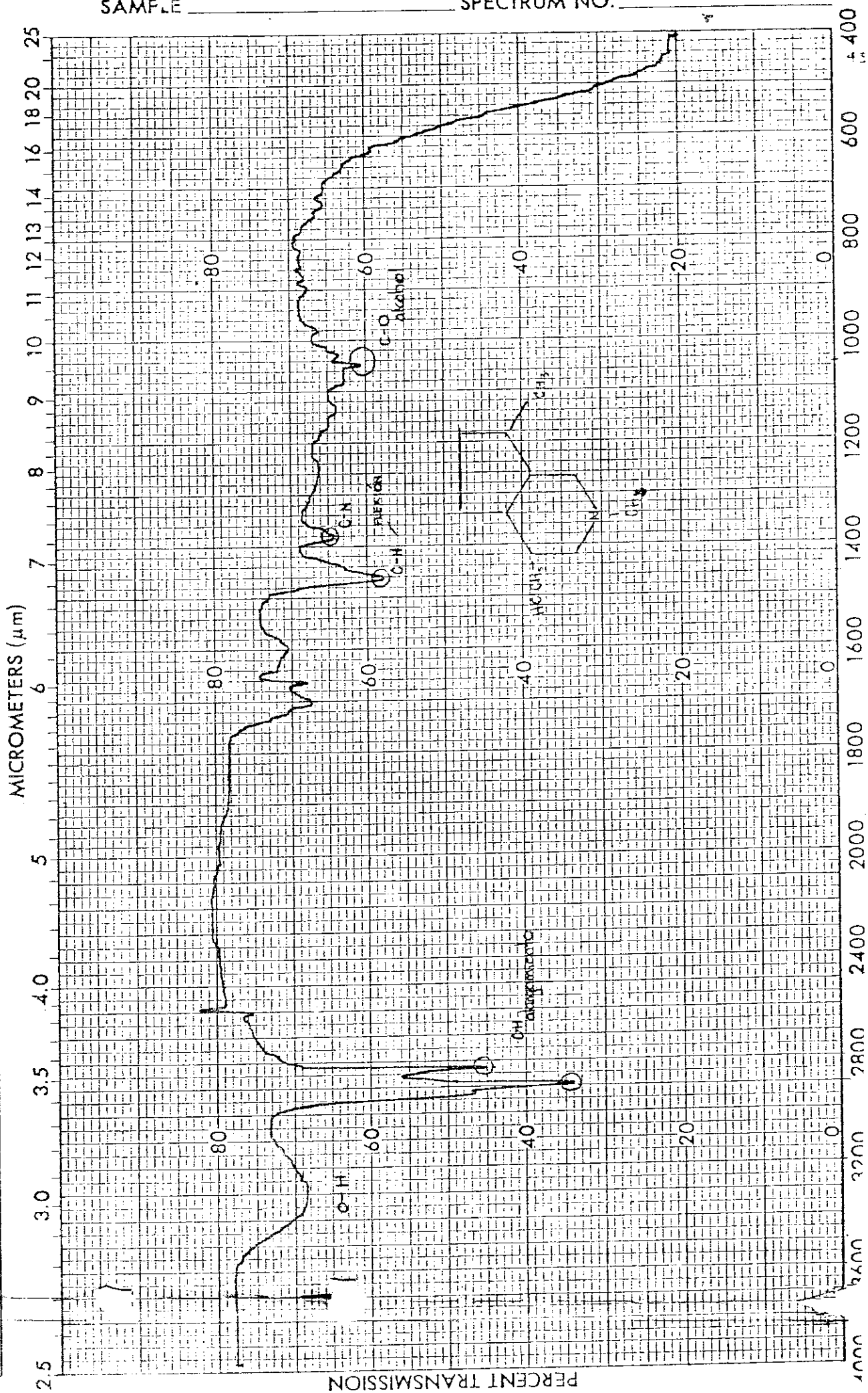
1. Appel, H. H. "Ciclopentano (c) piperidine, a new system of pharmacological promise". Scientia. 33(130); Pag. 5-9. 1966
2. Blank, B., DiTulio, W., Krog, A. J. and Saunders, H.L. "Synthesis and Hipoglycemic Activity of Pyridyl Alcohols". Journal fo Medical Chemistry. 22(7); Pag. 840-844. 1979
3. Dohnal, B., "Investigation on some metabolites of Tecoma stans Juss callus tissue. III Chromatographic search for iridoids, phenolic acid, terpenoids and sugars". Acta Soc. Bot. Pol. 2(46); Pag. 187-99. 1977
4. Dohnal, B., "Investigation on some metabolites of Tecoma stans Juss. callus tissue: II Chromatographical analysis of alkaloids and quinone compounds." Acta Soc. Bot. Pol. 4(45); Pag. 369-381. 1976
5. Folch, J., Lees, M., and Stanley, G. H. S., Journal of Biological Chemistry. 226; Pag. 497. 1957
6. Gross, D., Berg, W., and Schuete, H. R. "Biosynthesis and metabolims of the monoterpenoid alkloids of Tecoma stans". Biochem Physiol. PFlans. 163(6); Pag. 576-5B5. 1972
7. Hammouda, Y., Plat, M. and Le Men, J., "Ann. Pharm Franc. 21(9-10); Pag. 699-702. 1963
8. Hammouda, Y., Plat, M. and Le Men, J., "Structure of tecostanine an alkaloid from Tecoma stans." Bull, Soc. Chim. France. 12; Pag. 2802-5. 1963
9. Hammouda, Y., and Le Men, J., "Tecostidine a new alkaloid of Tecoma stans." Bull. Soc. Chim. France. 12; Pag. 2901-2. 1963
10. Hammouda, Y., and Khalafallah, N., "Stability of tecomine, the major antidiabetic factor of Tecoma stans." J. Pharm. Sci. 60(8); Pag. 1142-1145. 1971
11. Hammouda, Y., and Motawi, H. M., "Alkaloid and triterpens of Tecoma stans". Pharm. Bull 41(6); Pag. 73-9. 1959
12. Hammouda, Y., Kadar, A. R. and Samir, M. "Hypoglycemic properties of tecomine and tecosnine". Journal Pharm. Pharmacol. 16(22); Pag. 833-4. 1964
13. Hammouda, Y., and Samir., M., "Antidiabetic effect of tecomine and tecostanine". American, J. Pharm. Sci. 55(12); Pag. 1452-4. 1966

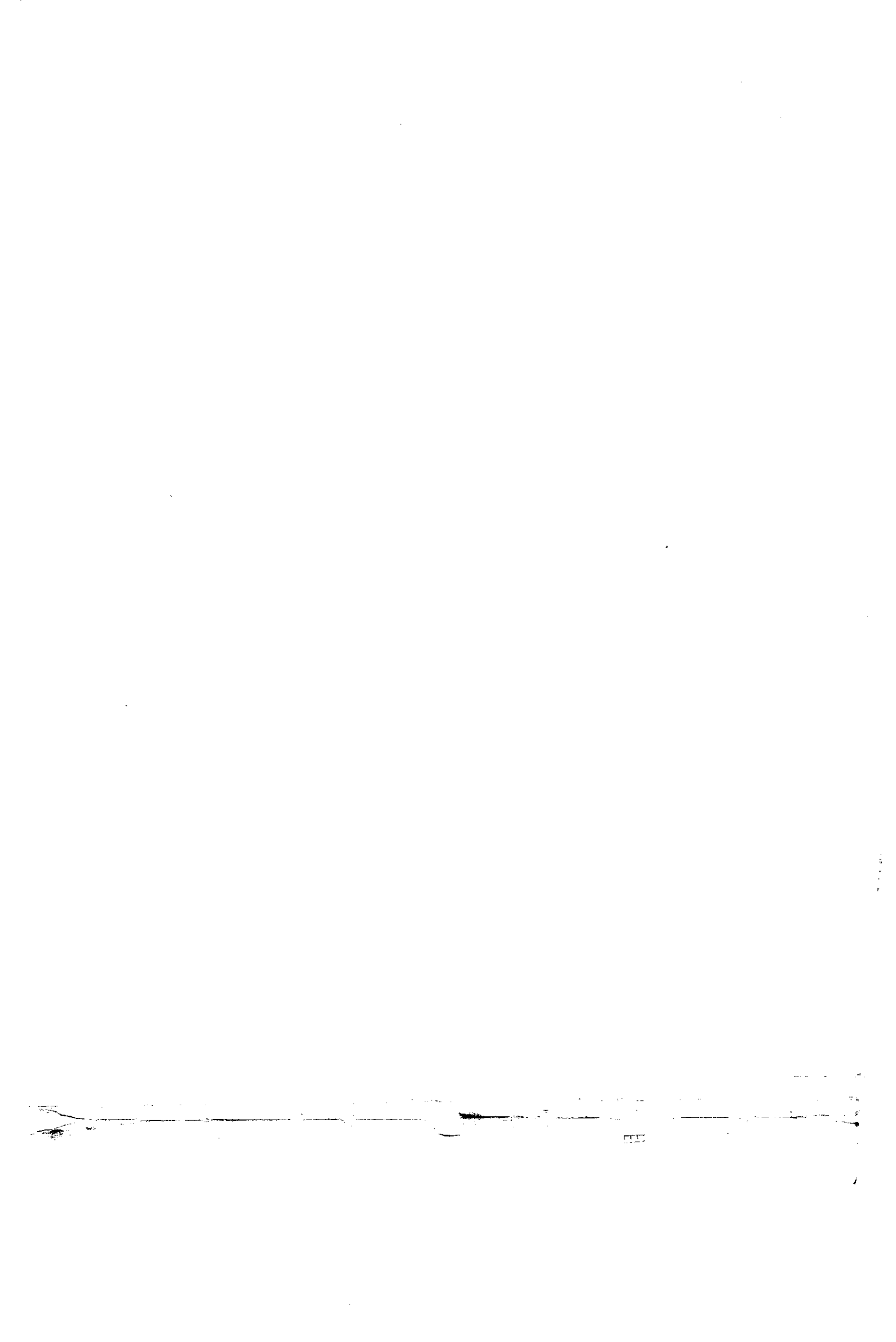
14. Jerchel, D., Bauer, E., and Hippchen, H. Chem. Ber. 88; Pag. 156
1955
15. Premachandra, B. R., Jacob, J., Cama, H. R. "Carotenoids from the flowers of Stenolobium stans". Indian Journal of Nutrition Diet 11(1); Pag. 28-32.
1974
16. Raffauf, R. F. A Handbook of Alkaloids and Alkaloids Containing Plants;
1970 Willey-Interscience, N. Y. 350 pp.
17. Reinecke, M. G. and Kray, L. R.; Journal of Organic Chemistry. 29; Pag.
1964 1736.
18. Sharma, B. B. S. and Ramasarma, T. "A new ubiquitous compound structurally related to lipid-quinones". Biochem. Biophys. Res. Commun. 28(6); Pag. 886-91.
1967
19. Standly, P. C., Williams, L. O. and Gibson, D. N. Fieldiana: Botany.
1974 Flora of Guatemala. Published by Field Museum of Natural History. 2(3,4); Pag. 227-228
20. Taha, M. M. "Carotenoids of the two species of Tecoma". Biochem. J. 58;
1954 Pag. 413-5

SAMPLE

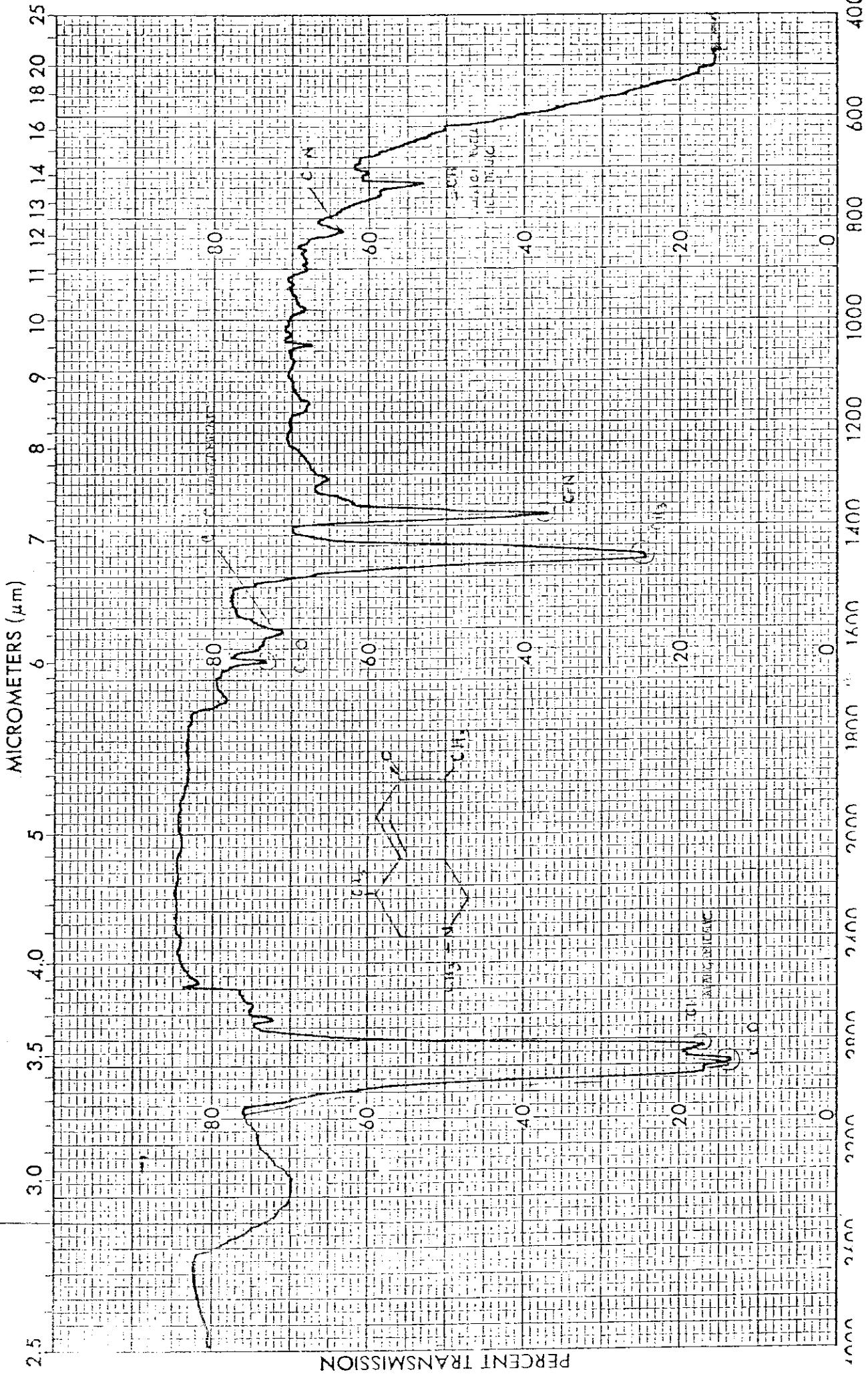
SPECTRUM NO.

CONCENTRATION	ACCY. <input type="checkbox"/>	SURVEY <input checked="" type="checkbox"/>	SPECTRUM NO. <u>2</u>
THICKNESS	HI ENERGY <input type="checkbox"/>	CAL. <input type="checkbox"/>	SAMPLE <u>ALCALOIDE</u>
PHASE <u>PELICOLA</u>	RESOLUTION <input type="checkbox"/>		<u>TECOSTANINA</u>
REMARKS	OPERATOR <u>Petty Falacios</u> DATE <u>6/12/85</u>		ORIGIN <u>TECOMA STANS.</u>



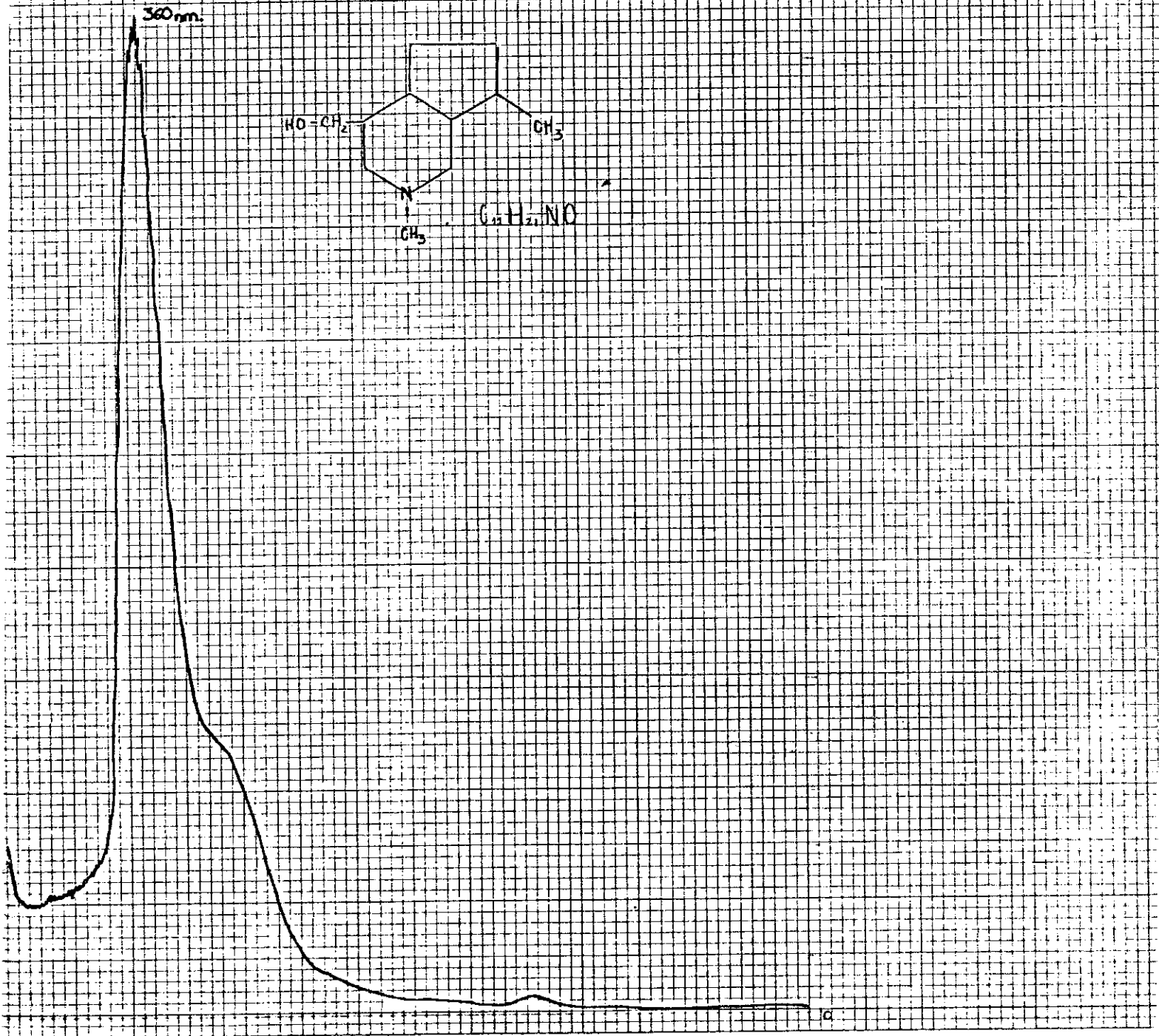
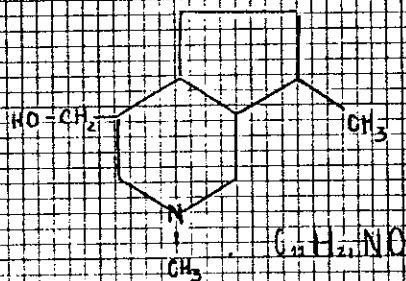


CONCENTRATION _____	ACCY. <input type="checkbox"/>	SURVEY <input checked="" type="checkbox"/>	SPECTRUM NO. <u>1.</u>
THICKNESS _____	HI ENERGY <input type="checkbox"/>	CAL. <input type="checkbox"/>	SAMPLE <u>ALCALOIDE TECOMINA</u>
PHASE <u>FILM</u>	RESOLUTION <input type="checkbox"/>		ORIGIN <u>Tecoma stans</u>
REMARKS _____	OPERATOR <u>P. PALACIOS</u> DATE <u>6/12/85</u>		

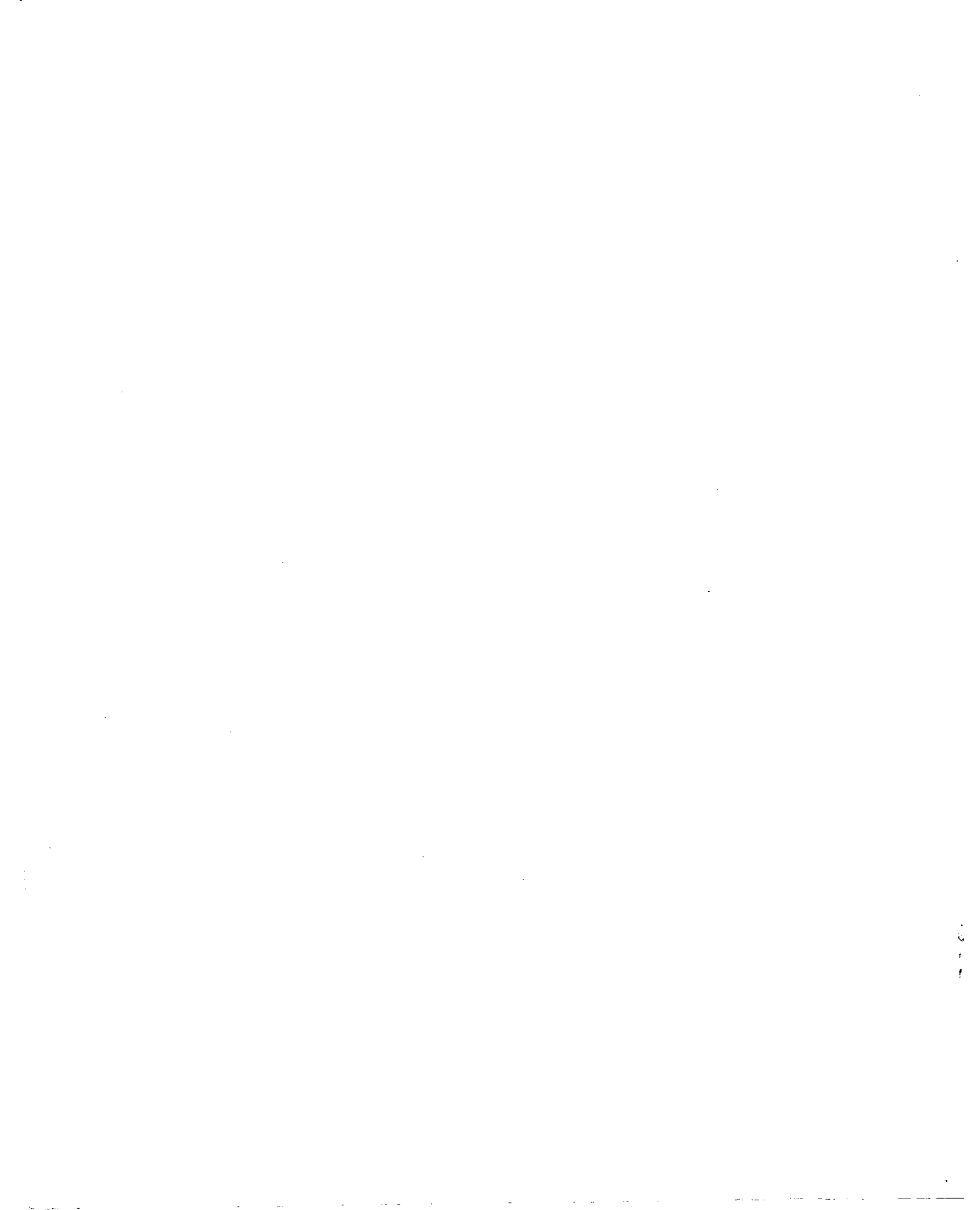


TESTOSTANINA

360 nm.

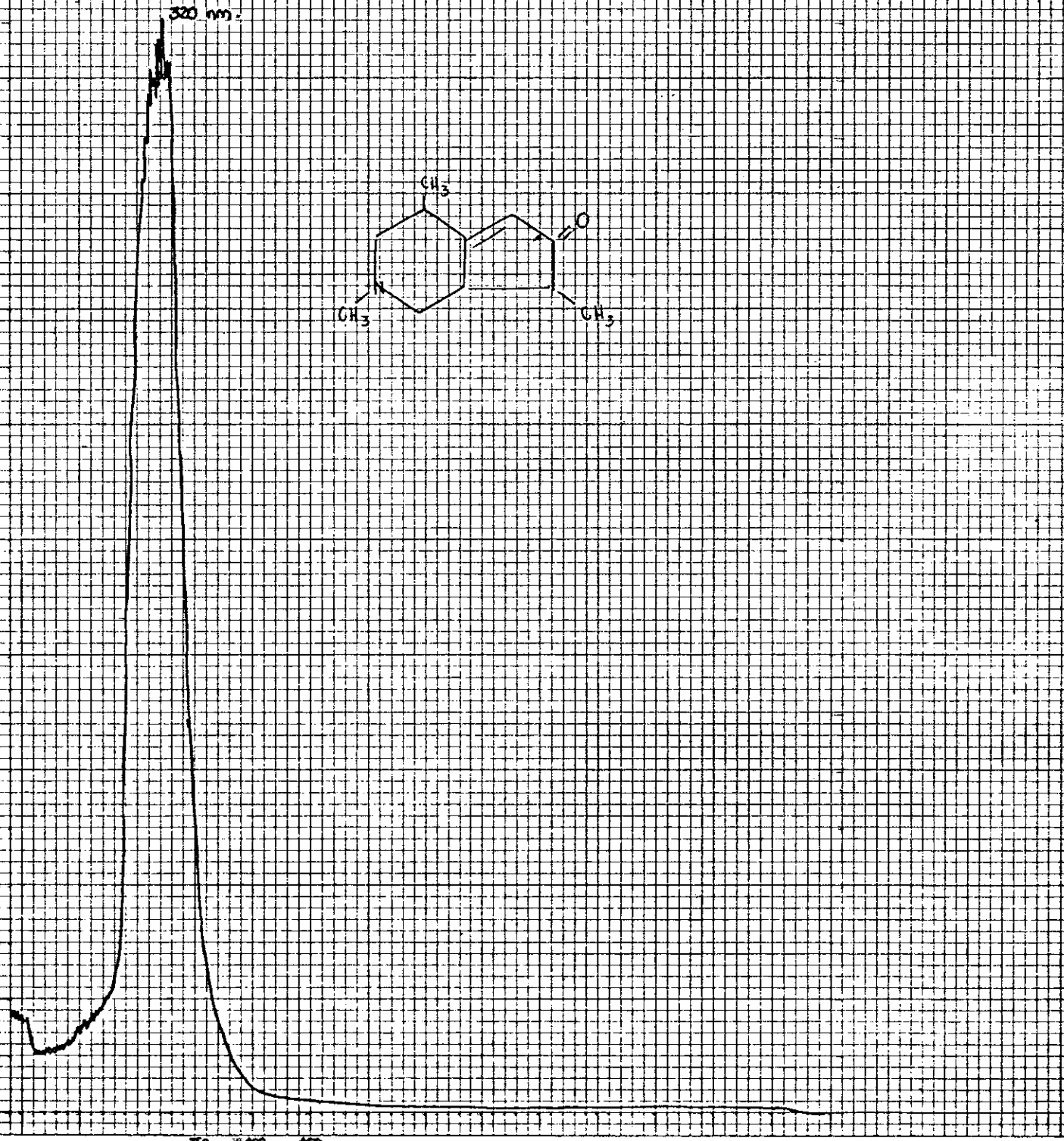
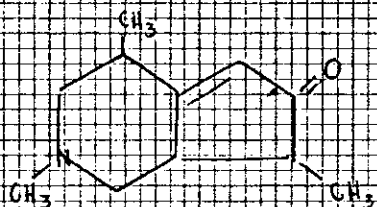


360



TEOMINA

320 nm.



2326 K

UV