

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN DEL
EFECTO DIURÉTICO DEL EXTRACTO DE *Laurus nobilis* “Laurel” EN
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

**Tesis presentada por los Bachilleres en
Farmacia y Bioquímica:**

CHUQUITARQUI QUISPE, Lisbeth Zulema

VALDIVIA PINTO, Franklin Alfredo

**Para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico**

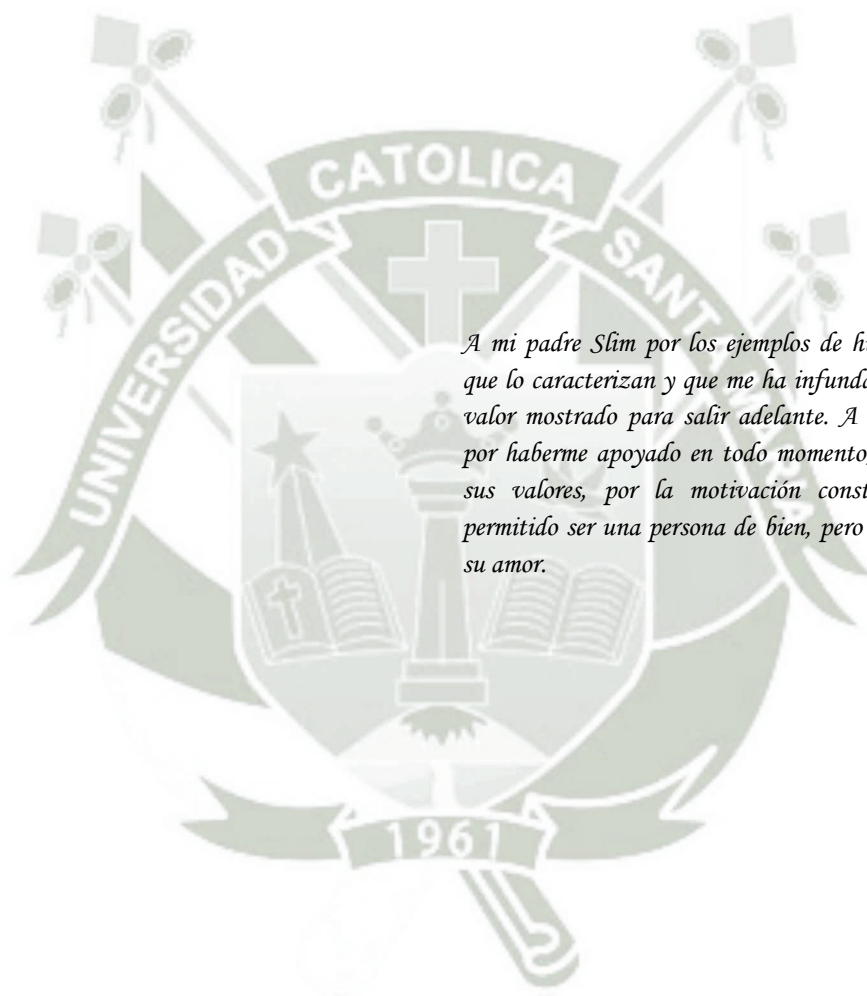
Asesor:

Dr. PAZ ALIAGA, Benjamín

AREQUIPA – PERÚ

2013

Dedico esta investigación a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.



A mi padre Slím por los ejemplos de humildad y bondad que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante. A mi madre Carmen por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero mas que nada por su amor.

A cada uno de mis hermanos que de una u otra forma me apoyaron para seguir adelante, gracias. Y para terminar a mi compañera y amiga de tesis Lizbeth porque sin el equipo que formamos, no hubiéramos logrado esta meta.

NDICE

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. ASPECTOS GENERALES:.....	1
1.1. <i>Laurus nobilis</i> L. “Laurel”:.....	1
1.2. CLASIFICACIÓN TAXON	2
1.3. VARIEDADES:	2
1.4. MORFOLOGÍA:	2
1.5. BIOLOGÍA:.....	3
1.6. REQUERIMIENTOS ENDOCLIMÁTICOS:	4
1.6.1. Temperaturas:.....	4
1.6.2. Precipitación y Luz:	4
1.6.3. Suelo:	4
1.6.4. Riego:.....	4
1.7. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN:.....	4
1.8. PROPIEDADES:.....	5
1.8.1. Propiedades Medicinales:	5
2. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO URINARIO	6
2.1. FISIOLÓGÍA DEL APARATO URINARIO:	6
2.1.1. Función:	6
2.1.2. Estructura:	7
2.2. LOS RIÑONES:	7
2.2.1. Estructura del Riñón:	7
2.2.2. Fisiología del Riñón:	8

2.2.2.1.	Mecanismo General de Transporte Epitelial Renal:.....	8
2.2.2.2.	Filtración Glomerular:.....	9
2.2.2.3.	Reabsorción Tubular:.....	10
2.2.2.4.	Secreción Tubular:.....	11
2.2.3.	Fisiopatología del Riñón:.....	12
2.2.3.1.	Nefropatía:.....	12
2.2.3.2.	Edema:.....	13
2.3.	LOS URÉTERES:.....	13
2.4.	LA VEJIGA:.....	13
2.5.	LA URETRA:.....	14
3.	LA ORINA:.....	15
3.1.	GENERALIDADES:.....	15
3.1.1.	Cantidad:.....	15
3.1.2.	Color:.....	15
3.1.3.	Olor:.....	16
3.1.4.	Densidad:.....	16
3.1.5.	Reacción de la Orina:.....	16
3.1.6.	Composición Química:.....	16
3.2.	FORMACIÓN DE LA ORINA:.....	17
3.3.	FILTRACIÓN DE LA ORINA:.....	17
3.4.	ELIMINACIÓN DE LA ORINA:.....	18
4.	METABOLISMO MINERAL:.....	18
4.1.	FISIOLOGÍA:.....	19
4.1.1.	Agua y Electrolitos:.....	19

4.1.2.	Concentración Osmolar:.....	19
4.1.3.	Compartimientos Líquidos del Organismo:	20
4.1.3.1.	Volúmenes:	20
4.1.3.2.	Composición:.....	20
4.1.3.3.	Distribución de los Líquidos del Organismo:	21
4.1.3.4.	Balace de Agua y Electrolitos:.....	22
4.1.3.5.	Equilibrio Ácido – Base:	22
4.2.	FISIOPATOLOGÍA:	25
5.	DIURÉTICOS:	26
5.1.	CLASIFICACIÓN:	26
5.2.	HIDROCLOROTIAZIDA:.....	28
6.	CROMATOÁAFÍA DE CAPA FINA.....	31
6.1.	VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA:.....	32
6.2.	ADSORBENTES:	33
6.2.1.	Sílica Gel:.....	33
6.2.2.	Alúmina:.....	34
6.3.	PREPARACIÓN DE PLACAS:	34
6.4.	APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS:.....	36
6.5.	ELECCIÓN DEL ELUYENTE:.....	37
6.6.	DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFÍA:	38
6.7.	LOCALIZACIÓN DE SUSTANCIAS:	39
6.7.1.	Métodos Químicos:	40
6.7.2.	Métodos Físicos:	40
6.8.	CONSTANTE R_f :.....	41

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL.....	43
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO:	43
1.1.1. Hojas de <i>Laurus nobilis</i> L. “Laurel”:	43
1.1.2. Animales de Experimentación:	43
1.2. MATERIAL DE LABORATORIO:	43
1.2.1. Material de Vidrio:.....	43
1.2.2. Equipos:	44
1.2.3. Otros Materiales:.....	44
1.2.4. Material Complementario:	44
1.3. REACTIVOS:	45
2. MÉTODOS:.....	45
2.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL:.....	45
2.1.1. Recolección:.....	45
2.1.2. Selección:.....	46
2.1.3. Análisis Organoléptico:.....	46
2.1.4. Estabilización y Dsecación:.....	46
2.1.5. Pulverización y Almacenamiento:	46
2.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RESIDUAL:.....	47
2.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS:.....	48
2.4. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO A PARTIR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS:.....	49
2.5. ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN:	50

2.5.1.	Etapa de Adaptación y Selección de Animales de Experimentación:.....	50
2.5.2.	Pruebas Piloto:	50
2.5.2.1.	Prueba Piloto I (Elección del Extracto):	50
2.5.2.2.	Prueba Piloto II (Elección de la Dosis del Extracto):	51
2.5.3.	Etapa Final de la Experimentación:	52
2.5.3.1.	Determinación de la Densidad:.....	54
2.5.3.2.	Determinación del Volumen Minuto de Orina (VMO):	54
2.5.3.3.	Método para la Determinación de Electrolitos Sodio y Potasio en Orina:	54
2.6.	ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR:	57
2.6.1.	Monitoreo Cromatográfico:	57
2.6.1.1.	Corrida General:	58
2.6.1.2.	Identificación de Terpenos:	59
2.6.1.3.	Identificación de Saponinas:.....	60
2.6.1.4.	Identificación de Taninos:	62
2.6.1.5.	Identificación de Flavonoides:.....	63
2.6.1.6.	Identificación de Alcaloides:	64
2.7.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS:.....	65
2.7.1.	Parámetros de Distribución:.....	65
2.7.1.1.	Media Aritmética (\bar{X}):.....	65
2.7.2.	Parámetros de Dispersión:	66
2.7.2.1.	Desviación Estándar:	66
2.7.3.	Análisis de Varianza (ANOVA):	66
2.7.4.	Test de Tukey:.....	67

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL:.....	68
1.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RESIDUAL:.....	69
1.3. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO A PARTIR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS:.....	69
1.4. ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN:	70
1.4.1. Pruebas Piloto:	70
1.4.1.1. Prueba Piloto I (Elección del Extracto):	70
1.4.1.2. Prueba Piloto II (Elección de la Dosis del Extracto):	74
1.4.2. Etapa Final de la Experimentación:	78
1.5. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR:	86
CONCLUSIONES	94
RECOMENDACIONES	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	101

RESUMEN

Se realizó un estudio experimental en ratas machos de la especie *Rattus rattus*, variedad *Wistar novergicus*, con el objetivo de evaluar el posible efecto diurético, obteniendo extractos de diferentes polaridades de *Laurus nobilis L.* “Laurel”, e identificar los principales grupos de metabolitos secundarios que pudieran ser los posibles responsables de dicho efecto diurético.

Se usaron hojas frescas de *Laurus nobilis L.* “Laurel” y se les realizó un análisis organoléptico, posteriormente fueron desecadas y trituradas para la extracción de sus principios activos, usando solventes de distintas polaridades, luego se determinó el porcentaje de rendimiento de extracto seco. Encontrándose un rendimiento de 17.8 % de extracto seco para el etanol, 5.8 % para el acetato de etilo y 3.1 % para el hexano.

Se realizó una primera prueba piloto para la cual se administró a las ratas por vía oral, los diferentes extractos secos (etanol, acetato de etilo y hexano) a una dosis de 0.0587 g/kg de peso suspendidas en agua. Se midió la excreción de volumen urinario de las ratas y el que presentó mayor diuresis fué el extracto etanólico seco. En la segunda prueba piloto se probaron 3 niveles de dosis: 0.0294, 0.0587 y 0.1154 g/kg de peso corporal, siendo la dosis de 0.0587 g/kg de peso la que provocó mayor diuresis.

Los resultados fueron comparados con los obtenidos por la Hidroclorotiazida en la dosis de 0.002 g/kg de peso (diurético de referencia) y con el agua (control) y se las suspendió en volúmenes de 5 ml para su administración por vía oral. La excreción urinaria se midió por hora hasta la sexta hora y de la décimo octava a la vigésimo cuarta hora y seguidamente se procedió a analizar la concentración de sodio y potasio presente en las muestras, además de determinar la densidad de cada muestra. Se midió el volumen urinario de las 24 horas con la finalidad de determinar el VMO (volumen minuto de orina) de cada tratamiento. Mediante un análisis estadístico respectivo, se pudo comprobar la similitud entre la acción diurética del extracto y la Hidroclorotiazida en relación del volumen urinario, excreción de los electrolitos sodio y potasio, y también el VMO (volumen minuto de orina), por lo que el extracto del *Laurus nobilis L.*

“Laurel” sí posee efecto diurético acompañada de natriuresis y kaliuresis significativa. Mientras que los valores de densidad se encuentran dentro del rango de valores normales.

También se realizó un estudio fitoquímico preliminar, mediante la técnica de cromatografía de capa fina, en el que se identificaron terpenos, taninos, saponinas, flavonoides y alcaloides.



ABSTRACT

We conducted an experimental study in male rats of the species *Rattus rattus*, *Wistar novergicus* strain, with the objective of evaluating the potential diuretic effect, obtaining extracts of different polarities of *Laurus nobilis L.* "Laurel", and identify the major groups of secondary metabolites that may be responsible for such potential diuretic effect.

We used fresh leaves of *Laurus nobilis L.* "Laurel" and underwent sensory analysis, were subsequently dried and crushed to extract their active ingredients, using solvents of different polarities, then determined the percentage of dry matter yield. Finding a yield of 17.8 % of dry extract ethanol, 5.8 % for ethyl acetate and hexane to 3.1 %.

An initial pilot test which rats were given orally, the various extracts dried (ethanol, ethyl acetate and hexane) at a dose of 0.0587 g/kg weight suspended in water. We measured urinary volume excretion in rats and showed higher ethanol extract diuresis was dry. In the second pilot tested three dose levels: 0.0294, 0.0587 and 0.1154 g / kg of body weight, the dose of 0.0587 g / kg which caused greater diuresis.

The results were compared with those obtained by the dose hydrochlorothiazide weight 0.002g/kg (reference diuretic) and with water (control) and suspended in the volume of 5 ml for oral administration. Urinary excretion was measured hourly until the sixth hour and the eighteenth to the twenty – fourth hour and then proceeded to analyze the concentration of sodium and potassium present in the samples, and to determine the density of each sample. Urinary volume was measured 24 hours in order to determine the VMO (urine minute volume) for each treatment. Through a statistical analysis concerned, we noted the similarity between the abstract and diuretic hydrochlorothiazide on urine volume, electrolyte excretion of sodium and potassium, and also the VMO (minute volume of urine), so that the extract of *Laurus nobilis L.* "Laurel" does have diuretic effect accompanied by significant natriuresis and kaliuresis. While density values are within the range of normal values.

We also performed a preliminary phytochemical study using the technique of thin layer chromatography, which were identified terpenes, tannins, saponins, flavonoids and alkaloids.



INTRODUCCIÓN

Desde épocas pasadas el hombre ha utilizado plantas para solucionar problemas de salud, a través de generaciones, estos conocimientos aún se conservan. En el reino de las plantas hay abundancia de virtudes curativas, propias para las necesidades del hombre. Tan perfecta es la naturaleza, que nos provee de todo lo que necesitamos. Las plantas son consideradas como alternativas adecuadas en los medios de curación. Las prácticas caseras son un componente de la medicina tradicional y es en el hogar donde se originan los diferentes procedimientos que van dando forma a las preparaciones que luego han ido perfeccionándose hasta llegar a las preparaciones galénicas industrializadas actuales.

Laurus nobilis L. “Laurel” planta sagrada símbolo de gloria, fama, poder y profecías. Coronas de laurel ó los bien llamados lauros premiaban a los mejores en diversas competiciones desde tiempos antiguos como en Grecia y Roma. También conocido por ser un aromático condimento en el arte culinario y por poseer propiedades medicinales: digestivo, expectorante, antiséptico, carminativo, y la medicina tradicional le atribuye efecto diurético, entre otros.

En los últimos años, se sabe que la vida moderna, las dietas incorrectas, la alimentación descuidada, la vida sedentaria, escasez de líquidos ingeridos durante la alimentación ocasionan algunas patologías como: hipertensión arterial, edemas, sobrepeso acompañado de retención de líquidos; estas patologías alteran el equilibrio normal del organismo reduciendo la eliminación de líquidos, de este modo se llega al estancamiento de los líquidos y a la acumulación de toxinas,

Debido a que *Laurus nobilis L.* “Laurel” es utilizado en medicina tradicional como diurético, con la presente investigación pretendemos demostrar si muestra una actividad diurética.

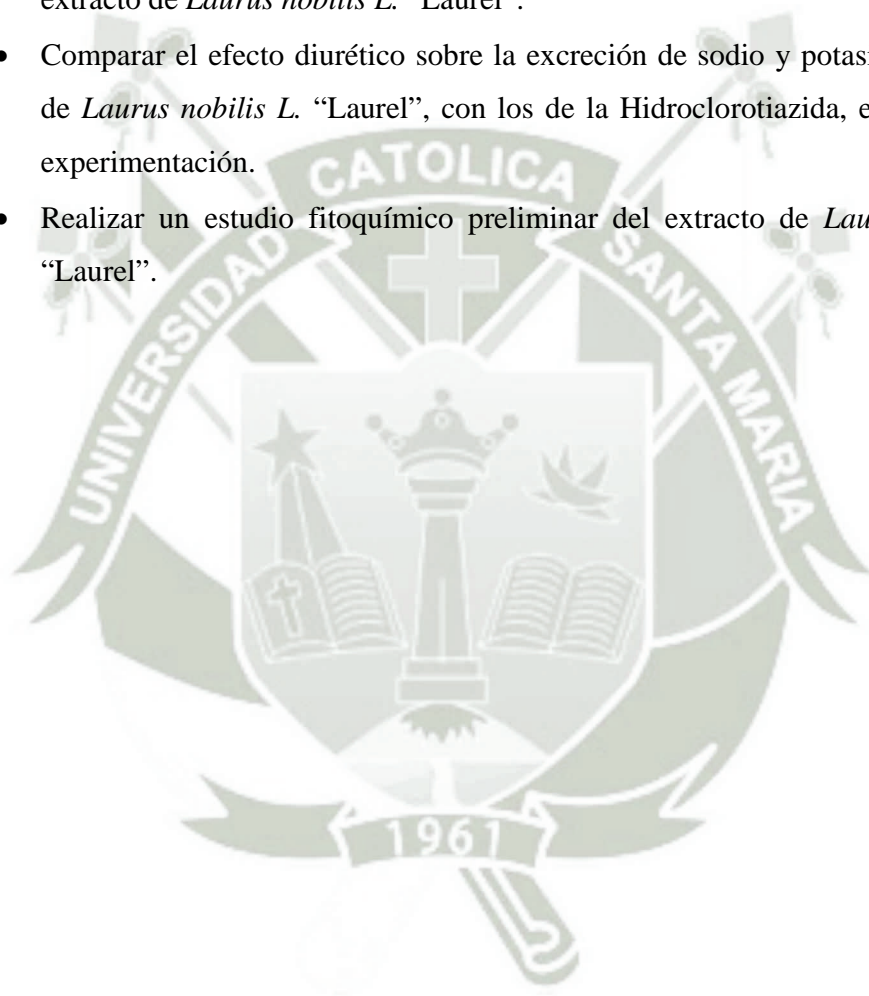
HIPÓTESIS

Dado que la medicina tradicional le atribuye a las hojas de *Laurus nobilis L.* “Laurel” efectos benéficos en la excreción urinaria; es posible que la aplicación de sus extractos tengan efecto diurético en animales de experimentación.



OBJETIVOS

- Preparar un extracto no polar, uno medianamente polar y por último un extracto polar para *Laurus nobilis L.* “Laurel”.
- Determinar el efecto diurético y sobre la excreción de sodio y potasio del extracto de *Laurus nobilis L.* “Laurel”.
- Comparar el efecto diurético sobre la excreción de sodio y potasio del extracto de *Laurus nobilis L.* “Laurel”, con los de la Hidroclorotiazida, en animales de experimentación.
- Realizar un estudio fitoquímico preliminar del extracto de *Laurus nobilis L.* “Laurel”.



CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1. ASPECTOS GENERALES:

1.1. *Laurus nobilis* L. “Laurel”:

Laurus es el nombre latino del “Laurel”, *nobilis* significa notable; siendo el “Laurel” un símbolo de triunfo en las culturas mediterráneas.¹⁶

Es difícil discernir su área espontánea por haberse difundido mucho su cultivo desde la antigüedad. Su presencia se limita a los países mediterráneos de Europa, llegando hasta Bretaña por el norte y hasta Galicia por el oeste. Por el sur llega hasta las montañas del Atlas. Se presenta en el norte y oeste de la Península Ibérica, en la vertiente Cantábrica y en varias sierras del norte de Portugal. También, de forma puntual, en Mallorca, Salamanca y en Andalucía donde está citado en todas sus provincias, aunque en la mayoría de las localidades se halla asilvestrado ó subespontáneo.¹⁵



FIGURA N° 1.1: *Laurus nobilis* L. “Laurel”

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

Laurus nobilis L. “Laurel” se clasifica de la siguiente manera: ^{15, 26}

REINO:	Vegetal
DIVISIÓN:	<i>Angiospermae (Magnoliophyta)</i>
CLASE:	<i>Dicotyledoneae (Magnoliopsida)</i>
SUB – CLASE:	<i>Magnoliidae</i>
ORDEN:	<i>Lurales</i>
FAMILIA:	<i>Lauraceae</i>
SUB – FAMILIA:	<i>Lauroideae</i>
GÉNERO:	<i>Laurus</i>
ESPECIE:	<i>L. nobilis</i>

1.3. VARIEDADES:

Entre las principales variedades se mencionan: ^{26, 39}

- *Angustifolia.*
- *Cameuifolia.*
- *Caucásica.*
- *Flesseriana.*
- *Japónica.*
- *Latifolia.*
- *Mangolifolia.*
- *Rotundifolia.*
- *Zabeliana.*

1.4. MORFOLOGÍA:

Árbol dioico de 5 – 10 m de estatura; copa densa; tronco derecho; corteza lisa de color grisácea. Ramas rectas, de corteza pardo – verdosa; ramillas glabras y lustrosas. Hojas simples, alternas, persistentes, coriáceas, lustrosas, de color

verde oscuro por el haz y algo más pálidas por el envés; margen entero ó a veces ondulado; peciolo corto. ¹⁵

El fruto es drupáceo, ovoide, de 1 – 1.5 cm. De longitud, tornándose de color negro en la madurez a principales de otoño. ^{15, 39}

Flores unisexuales, dispuestas en umbelas axilares, solitarias ó por pares, pedunculadas, de 4 – 6 flores cada una; periantio de 4 piezas subiguales, blanco verdoso ó amarillentas. Flores masculinas con 8 – 12 estambres y gineceo rudimentario; anteras dehiscentes mediante dos valvas y casi todos los estambres provistos de 2 nectaries en la base del filamento. Flores femeninas con 4 estaminodios (filamentos estériles) y un ovario de estilo corto, grueso y estigma trígono. ^{15, 39}

1.5. BIOLOGÍA:

Florece a mediados de febrero hasta inicios de abril. Las semillas están maduras al final del verano (febrero y marzo). *Laurus nobilis* L. “Laurel” presenta una tendencia hacia la dioecia, pues en una sola rama suelen abortar el mismo sexo en todas las flores lo que provoca que muchos frutos no sean viables. ¹⁶

La semilla limpia y seca se puede conservar durante 162 años en buenas condiciones (cierre hermético y temperaturas entre 2 – 3 °C). Las semillas germinan en la naturaleza muy lentamente por lo que antes de sembrar se deben someter a tratamientos de escarificación (remojo de agua templada durante 24 horas) y posteriormente se les dará un tratamiento de estratificación en arena húmeda durante 263 meses a 4 °C. *Laurus nobilis* L. “Laurel” también se multiplica vegetativamente por medio de esquejes de raíz ó por estaquilla. ¹⁵

1.6. REQUERIMIENTOS ENDOCLIMÁTICOS:

1.6.1. Temperaturas:

El *Laurus nobilis L.* “Laurel” necesita de temperaturas desde los 0 hasta los 40 °C; es decir las heladas lo estropean.³⁹

En regiones muy frías, *Laurus nobilis L.* “Laurel” debe cultivarse en macetas para poder protegerse en el invierno al abrigo de las heladas fuertes, y en regiones templadas puede plantarse como arbusto ó usarse en cercos.³⁹

1.6.2. Precipitación y Luz:

Es mejor evitar el pleno sol de verano que puede “quemar” sus hojas. Ideal es la semisombra, es decir, sol unas horas del día y sombra otras, es una planta apta para sitios sombríos.^{16, 39}

1.6.3. Suelo:

Laurus nobilis L. “Laurel” es una planta poco exigente en suelos, preferentemente sueltos, húmedos y con buen drenaje.¹⁵

1.6.4. Riego:

Necesita de riegos abundantes cada 2 – 3 semanas para favorecer un buen desarrollo vegetativo sin llegar al exceso (encharcamiento), pero también resiste la sequía.³⁹

1.7. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN:

Para su recolección lo más adecuado es recolectar las hojas justo después de la floración de la planta, si bien pueden obtenerse en cualquier época del año. También se recolectan los frutos una vez han alcanzado su grado de madurez. Para su conservación, tanto las hojas como los frutos deben secarse en

condiciones protegidas de la luz del sol. Una vez secos conviene guardarlos en recipientes de cierre hermético y en un lugar oscuro y seco.⁷

Muy importante; cuidado de no confundir a *Laurus nobilis L.* “Laurel” con *Prunus laurocerasus* “Laurel – cerezo” ó “Laurel real” al que se parece en cierta forma. Esta última planta es tóxica por ingestión para las personas.²¹

1.8. PROPIEDADES:

1.8.1. Propiedades Medicinales:

Laurus nobilis L. “Laurel” estimula las contracciones en el músculo intestinal, aumentado la motilidad. Por lo tanto también ayuda a depurar el organismo.

Mejora ó previene situaciones de pirosis ó acidez, así como los espasmos intestinales, muy adecuado en caso de afecciones tales como la bronquitis, faringitis, etc.

Contiene ácidos grasos insaturados, entre ellos el oleico y linoleico. Ambos ácidos grasos poseen acciones beneficiosas ya que su consumo contribuye a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, si bien la acción más destacable de *Laurus nobilis L.* “Laurel” es a nivel del sistema digestivo. Posee una ligera acción anti inflamatoria, contribuye a regular la menstruación en la mujer.^{15, 39}

La medicina tradicional utiliza a *Laurus nobilis L.* “Laurel” en infusiones, empleando 3 a 4 hojas por taza dejando en reposo por un periodo de 3 a 5 minutos, con la finalidad de aumentar la excreción urinaria.

Las personas que consumen dosis altas (infusiones demasiado concentradas de hojas de *Laurus nobilis L.* “Laurel”) pueden tener náuseas, vómitos e irritación de la mucosa gástrica. Su uso no se aconseja en caso de

gastritis y úlcera, así como en ciertas enfermedades que afectan al intestino y en personas que tienen el estómago delicado.⁷

Laurus nobilis L. es el único de los laureles no venenoso.³ Su madera es aromática. Como medicinal se le conocen varias aplicaciones. Las hojas en infusión se usan para las irritaciones de garganta, como anti catarral, anti tusígeno, antirreumático, afecciones cutáneas e hipo colessteremiente. Ha sido considerado árbol sagrado por numerosas culturas. Es el símbolo de los triunfos militares, artísticos y universitarios.³⁸

Las hojas de *Laurus nobilis L.* “Laurel” contienen un aceite esencial cuyos principales componentes son el cineol y el eugenol, que le confieren propiedades carminativas (reducen los gases ó alivian la flatulencia) y hepatoprotectoras. También se encuentran diversos ácidos orgánicos, ácidos grasos insaturados, sustancias de acción anti oxidante y bactericida y minerales tales como manganeso, calcio, potasio y magnesio.³⁹

Laurus nobilis L. “Laurel” es un condimento típico en guisos de legumbres y en caldos de cocción de pescados y mariscos, en adobos, escabeches, etc. Se debe usar con moderación porque unifica los sabores cubriendo el gusto propio de los alimentos.²⁶

2. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO URINARIO

2.1. FISIOLÓGÍA DEL APARATO URINARIO:

2.1.1. Función:

El aparato urinario es el encargado de eliminar del organismo las sustancias nocivas que se forman en las células y de contribuir a mantener la reacción alcalina de la sangre.¹

2.1.2. Estructura:

Está formado esencialmente por dos riñones que vuelcan cada uno su contenido en un receptáculo llamado vejiga, por medio de un tubo llamado uréter. La vejiga, a su vez evacúa su contenido al exterior por medio de un conducto llamado uretra.¹

2.2. LOS RIÑONES:

2.2.1. Estructura del Riñón:

Los riñones son dos órganos que tienen la forma de un frejol, colocados en el abdomen a ambos lados de la columna vertebral. Se hallan aproximadamente a la altura de la última vértebra dorsal y de las dos primeras lumbares. Las últimas dos costillas cubren su mitad superior. Tiene unos 10 a 12 cm de largo, unos 5 ó 6 cm de ancho y unos 2.5 a 3.5 cm de espesor. Pesan unos 150 g cada uno. Su color es rojo castaño. Están separados de la piel del dorso por varios músculos, y de los órganos del abdomen por el peritoneo parietal. Hay una capa de grasa que los rodea y los fija, permitiendo, sin embargo, que se deslicen hacia abajo en cada inspiración. El riñón derecho es un poco más bajo que el izquierdo. Sobre su polo superior se hallan las cápsulas suprarrenales. Su borde interno es cóncavo y recibe el nombre de hilio, pues llegan y salen por ese lugar la arteria renal y la vena renal. Se halla también allí la llamada pelvis renal, que tiene forma de embudo y en la cual desembocan los llamados cálices, que reciben cada uno la orina de una de las pirámides renales.³⁵

El riñón está constituido por unidades denominadas nefrones; cada nefrón consta de glomérulo, capsula de Bowman, túbulo contorneado proximal, asa de henle y túbulo contorneado distal. Los túbulos distales desembocan en los túbulos colectores, los cuales al unirse forman los conductos de bellini que desembocan en las papilas renales.³⁵ Existen 2 tipos de nefrones:

- a) Corticales, localizados en los 2/3 extremos de la corteza renal (constituyen el 85% del total).³⁵
- b) Yuxtamedulares son importantes en la creación de la hiperosmolaridad de la médula renal. En cuanto a la circulación sanguínea, en los nefrones corticales los túbulos renales están irrigados por una red capilar que proviene de la ramificación de la arteriola eferente, mientras que en los glomérulos yuxtamedulares, la arteriola eferente, da origen a la vasa recta que cursan paralelos a las asas de henle (intercambiadores de contracorriente). La sangre, en ambos casos, es recogida por las vénulas que por confluencia sucesiva dan origen a la vena renal.³⁵

2.2.2. Fisiología del Riñón:

Los riñones cumplen las siguientes funciones en nuestro organismo: mantienen y regulan el volumen de los líquidos extracelulares y las concentraciones de Na^+ , K^+ y Cl^- , mantienen la composición de los líquidos corporales, mantienen el equilibrio ácido base, eliminan metabolitos y algunas drogas, metabolizan algunos fármacos como la insulina, producen eritropoyetina, renina y prostaglandinas. Es decir que el riñón desempeña un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno, función que la cumple gracias a los 3 procesos (filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular) que interviene en la formación de orina. Como esos 3 procesos implican pasaje de sustancias a través de membranas, antes de referirnos a ellos haremos una breve revisión de los mecanismos de transporte:⁵²

2.2.2.1. Mecanismo General de Transporte Epitelial Renal:

Los solutos pueden atravesar las membranas de las células epiteliales renales por los siguientes mecanismos:⁵²

- 1) Por flujo abundante de agua a través de una membrana (por poros acuosos entre células adyacentes).⁵²
- 2) Por difusión simple.⁵²
- 3) Los solutos con liposolubilidad limitada pasan la membrana haciendo uso de proteínas de membrana que conforman poros a través de los cuales difunde el soluto de manera pasiva (difusión mediada por canal).⁵²
- 4) Por unión del soluto a una proteína de membrana, la que por un cambio de conformación transfiere la sustancia gracias a una gradiente electroquímica (difusión mediada por acarreador ó facilitada – uniporte).⁵²
- 5) Por transporte activo primario (contra una gradiente electroquímica), el mismo que es mediado por ATP, (transporte mediado por ATP).⁵²
- 6) El anterior tipo de transporte a menudo crea una gradiente electroquímica para un soluto determinado y la energía potencial de esa gradiente de soluto se libera para impulsar el transporte contra gradiente de otro soluto; este proceso requiere simporte (cotransporte de soluto en la misma dirección).⁵²
- 7) Antiporte (cotransporte de soluto en direcciones opuestas).⁵²

2.2.2.2. Filtración Glomerular:

Los glomérulos filtran agua y sustancias cristaloides del plasma (no proteínas). La filtración glomerular depende de varios factores, tales como: presión hidrostática dentro del capilar glomerular, presión osmótica de la sangre, presión de la cápsula de Bowman, número de glomérulos funcionantes y velocidad del flujo plasmático glomerular inicial. Se ha determinado, que bajo condiciones normales, de los 700 ml de plasma sanguíneo que pasa por los riñones en un minuto se filtran 125 ml, lo que equivale a 180 litros en 24 horas.²

2.2.2.3. Reabsorción Tubular:

El ultrafiltrado glomerular, cuya composición es igual a la del plasma menos las proteínas, se modifica profundamente en su pasaje por los túbulos renales debido a la reabsorción de una serie de sustancias; algunas se reabsorben por difusión simple como el agua y úrea, mientras que otras son reabsorbidas por procesos de transporte activo como el sodio, glucosa, potasio, fosfato, aminoácidos, creatinina, ácido úrico, etc.²

- 1) En el túbulo proximal, se reabsorbe glucosa y potasio en su totalidad; sodio en un 65 %, seguido pasivamente por cantidades proporcionales de agua a fin de mantener el líquido tubular isosmótico 300 mOsm/L, cloro, fosfato y bicarbonato en cantidades variables.²
- 2) En el asa de henle, a medida que el líquido progresa por la rama descendente se va haciendo hipotónico, debido a la absorción de agua pura (aproximadamente el 10 % del agua filtrada) alcanzando una osmolaridad de 1200 mOsm/L en el extremo del asa. La rama ascendente es impermeable al agua siendo el segmento grueso en el que se produce importante reabsorción de sodio y cloro, por medio del simporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ que posee, esto determina que el líquido tubular se vaya diluyendo hasta hacerse hiposmótico con relación al intersticio adyacente, lo cual genera una gradiente de concentración entre la corteza renal isosmótica y la médula y papila hiperosmótica.²
- 3) En el túbulo distal y túbulo colector, La reabsorción de agua está influenciada por la hormona antidiurética (ADH). En el túbulo distal se reabsorbe agua (20 % de agua filtrada), sodio, cloro y bicarbonato; en la primera porción la reabsorción de sodio y cloro es mediada por el simporte, Na^+/Cl^- que contiene. En el túbulo colector se reabsorbe agua (4 %) sodio y úrea. En la segunda porción del túbulo distal y en el túbulo colector la reabsorción activa de sodio está regulada por la aldosterona (formación de

canales de sodio a dicho nivel del nefrón). La úrea es reabsorbida pasivamente desde el túbulo colector (porción de médula interna), queda atrapada en el intersticio medular, contribuyendo a elevar su osmolaridad y de ese modo participar en la reabsorción de agua desde la rama descendente del asa de henle y del túbulo colector.²

2.2.2.4. Secreción Tubular:

Es el proceso de transporte activo de sustancias desde la sangre a la luz de los túbulos renales, siendo de importancia para la eliminación de algunos metabolitos y drogas (penicilina en especial para la regulación del equilibrio ácido – básico del organismo). El riñón interviene en la regulación del equilibrio ácido – básico del organismo a través de tres mecanismos: bicarbonatos fosfato y formación de amoniaco, en los cuales existe un proceso previo común que se realiza en las células tubulares y que consiste en la formación de ácido carbónico a partir de CO_2 y agua, mediante la intervención de la enzima anhidrasa carbónica. El ácido carbónico formado se disocia de inmediato para dar lugar a cationes hidrógeno y aniones bicarbonato; luego el ión hidrógeno es secretado hacia la luz tubular, donde se intercambia con el sodio, que penetra al interior de las células tubulares. Como ejemplo describiremos el mecanismo bicarbonato en los túbulos proximal y distal.²

En el túbulo proximal, el bicarbonato de sodio filtrado se encuentra disociado como cationes de sodio y aniones bicarbonato. El sodio se intercambia con los iones hidrógeno, de tal forma que el sodio se une al anión bicarbonato de la célula para originar bicarbonato de sodio, el cual pasa a la sangre para mantenerla reserva alcalina; mientras que el ión hidrógeno se combina con el anión bicarbonato del líquido tubular para formar ácido carbónico que es rápidamente desdoblado en CO_2 y agua. El CO_2 pasa por difusión a la célula tubular, mientras que el agua en parte es reabsorbida y en parte es excretada. En el túbulo distal, el sodio se intercambia no solo con iones hidrógeno sino

también con iones potasio, e incluso hay competencia entre estos por intercambiarse con el sodio. Este intercambio que está bajo el control de la aldosterona, es directamente proporcional a la cantidad de sodio disponible para el proceso; es decir, que mientras mayor sea la cantidad de sodio que llega al túbulo distal, mayor será el intercambio con potasio e iones hidrógeno a este nivel.²

2.2.3. Fisiopatología del Riñón:

2.2.3.1. Nefropatía:

Se denomina nefropatía a cualquier afección de los riñones, ya sea de naturaleza inflamatoria (nefritis), degenerativa (nefrosis), tóxica, tumoral, calcúlosa (nefrolitiasis), de posición anómala (nefroptosis), traumática, etc.⁴⁶

Nefritis: es una enfermedad de los riñones provocada por lesiones de naturaleza inflamatoria; según la extensión del proceso inflamatorio se distinguen: las nefritis difusas (cuando el proceso inflamatorio comprende a todos los glomérulos renales con sus asas capilares), y las nefritis parciales ó en foco (cuando las lesiones inflamatorias no se localizan en todo el tejido renal, sino únicamente en algunas zonas circunscritas). Los tres síntomas fundamentales que caracterizan a la nefritis son: edema, aumento de la presión arterial y hematuria.⁴⁶

Nefrosis: es una enfermedad renal bilateral distinta de la nefritis, en el aspecto clínico se diferencia de esta última por la presencia de un solo síntoma (edema), sus lesiones son degenerativas y afectan el túbulo renal.^{46, 59}

Nefrolitiasis: es una litiasis ó calcúlosis del riñón, a partir del cual los cálculos pueden emigrar sucesivamente al uréter (uretolitiasis), a la vejiga (cistolitiasis), y a la próstata (prostatolitiasis).⁴⁶

Nefroptosis (ptosis renal ó riñón móvil): es un estado patológico que se caracteriza por la excesiva movilidad renal, en virtud de la cual el individuo en posición erecta sufre, a consecuencia de la fuerza de la gravedad, el descenso y el desplazamiento hacia debajo de su riñón, se trata en suma de un descenso renal que puede ser mono ó bilateral, según interese a uno ó ambos riñones.⁴⁶

2.2.3.2. Edema:

Es un estado patológico de hinchazón de los tejidos por el aumento anormal y notable del líquido intersticial que rellena normalmente los espacios intersticiales (intercelulares) de la estructura íntima del tejido.⁴⁶

2.3. LOS URÉTERES:

Los uréteres son dos conductos de unos 25 a 30 cm de largo, bastante delgados, aunque de calibre irregular, que llevan la orina desde la pelvis renal a la vejiga, en cuya base desembocan formando los llamados meatos uretrales, cuya disposición en válvula permite a la orina pasar gota a gota del uréter a la vejiga, pero no viceversa. Su interior está revestido de un epitelio y su pared contiene músculo liso.¹

2.4. LA VEJIGA:

La vejiga es un depósito membranoso situado en la parte inferior del abdomen y superior de la pelvis, destinada a contener la orina que llega de los riñones a través de los uréteres. Cuando está vacía, sus paredes superior e inferior se ponen en contacto, tomando una forma ovoidea cuando está llena. Su capacidad es de unos 300 a 350 g, aunque puede variar de una persona a otra y en ciertas afecciones. Su interior está revestido de una mucosa con un epitelio

poliestratificado pavimentoso, impermeable a la orina. Su pared contiene un músculo liso, que contrayéndose y con la ayuda de la contracción de los músculos abdominales, produce la evacuación de la vejiga a través de la uretra a esto se llama micción.

La parte de la vejiga que comunica con la uretra está provista de un músculo circular ó esfínter, que impide normalmente la salida involuntaria de la orina. Además de estas fibras lisas hay otras estriadas que ayudan a retener voluntariamente la orina.¹

2.5. LA URETRA:

La uretra es el conducto que permite la salida al exterior de la orina contenida en la vejiga. Difiere considerablemente en ambos sexos. En la mujer es un simple canal de 3 a 4 cm. de largo, algo más estrecho en ambas extremidades que en el resto de su trayecto. Es casi vertical y se halla por delante de la vagina, abriéndose en la vulva por delante del orificio vaginal.¹

En el hombre la uretra mide de 18 a 20 cm. de longitud, y es de calibre irregular, presentando partes ensanchadas y otras estrechadas. Además no es recta sino que presenta ciertos ángulos. Tiene muchos segmentos: uretra prostática (parte que pasa por la próstata), uretra membranosa y uretra esponjosa, es decir, la rodeada por el cuerpo esponjoso, la que a su vez puede subdividirse en varios segmentos.¹

Desde el punto de vista de sus enfermedades la uretra puede dividirse en dos segmentos: la uretra anterior y la uretra posterior, separados por un esfínter de músculo estriado, situado a unos 3.5 cm de la vejiga.¹

Las hemorragias ó secreciones que se producen en la primera, salen al exterior y las que se producen en la segunda, pueden volcarse en la vejiga. La inflamación de cada uno de estos sectores produce también síntomas distintos.

En la uretra desembocan diversas glándulas en las que pueden acantonarse una infección de la uretra. ¹

3. LA ORINA:

3.1. GENERALIDADES:

La orina es un líquido acuoso transparente y amarillento, de olor característico, secretado por los riñones y eliminado al exterior por el aparato urinario. El trabajo limpiador de los riñones es la orina. Se ha podido decir con razón que "La orina es una solución salada de úrea", por ser la úrea y la sal las sustancias que en mayor cantidad están disueltas en ella. ^{23, 35}

3.1.1. Cantidad:

La orina se produce habitualmente en una cantidad que oscila entre 1250 y 1500 ml diarios. Este volumen puede variar, aumentando cuando se ingieren muchos líquidos, si hace frío, por emociones, entre otras. Puede disminuir cuando se beben pocos líquidos ó cuando se pierde mucho líquido por otras vías: transpiración abundante, diarrea, vómitos, etc. Ciertas enfermedades pueden aumentar la cantidad de orina: diabetes sacarina, diabetes insípida, incapacidad del riñón para producir una orina concentrada, etc. Puede disminuir la orina en los momentos en que se retienen líquidos en el organismo en la nefrosis, las glomerulonefritis agudas, ciertas nefritis crónicas y también las enfermedades infecciosas cuando no se da al paciente suficiente cantidad de líquidos. ^{23, 35}

3.1.2. Color:

Habitualmente la orina tiene un color amarillo ámbar. Cuando su cantidad es abundante tiende a ser de color más claro. En cambio, se hace más oscura cuando es escasa, por hallarse en mayor concentración las sustancias eliminadas. Además del cambio que pueden provocar en el color de la orina numerosos medicamentos, se puede señalar el tinte castaño, a veces muy oscuro

que le dan los pigmentos de la bilis cuando hay ictericia. La sangre le da un color rojo oscuro.²³

3.1.3. Olor:

La orina recién eliminada tiene un olor particular no fétido. Cuando pasa cierto tiempo, toma un olor fuerte, que más tarde se hace amoniacal. Los que tienen mucha acetona (por acidosis) pueden tener orina con el olor propio de dicha sustancia. Cuando la orina es fétida ó amoniacal en el momento de su emisión, es probable que haya una antigua infección urinaria.²³

3.1.4. Densidad:

Normalmente la densidad de la orina varía entre 1.015 y 1.025. Generalmente la función renal es bastante buena cuando es capaz de segregar una orina concentrada. Por supuesto, casi siempre las orinas de poca densidad son abundantes, y las de elevada densidad, escasas. Una excepción notable es la diabetes sacarina, en la que hay poliuria (orina abundante), con densidad elevada.²³

3.1.5. Reacción de la Orina:

La reacción habitual de la orina humana es ácida. Si por alimentación excesivamente rica en residuos alcalinos, ó por tomar medicamentos alcalinos, la orina se hace alcalina ó neutra, ésta se pone turbia por hallarse precipitados los fosfatos que contiene.²³

3.1.6. Composición Química:

Puede variar mucho según el tipo de alimentación y la cantidad de orina. El término medio habitual es el siguiente.²³

En cada litro de orina hay:²³

Úrea	24.0 g
Cloruro de sodio (sal común)	10.0 g
Sulfatos	3.0 g
Fosfatos	2.3 g
Creatinina	0.9 g
Sales de amonio	0.7 g
Ácido hipúrico	0.6 g
Ácido úrico	0.5 g
Otros compuestos	4.0 g

Los principales elementos anormales que puede hallar un examen químico de orina son proteínas y glucosa.²³

3.2. FORMACIÓN DE LA ORINA:

La orina es una solución de úrea, sales y otras sustancias de desecho, solubles en agua, producida en el riñón a partir de la sangre que transporta la arteria renal. La sangre pasa por cada uno de los glomérulos, quedando retenidos en el mismo las sustancias de mayor volumen, mientras las sustancias proteicas como el agua, las sales, la úrea y otras pasan desde las paredes de los capilares a la cápsula de bowman. Por lo tanto, el glomérulo realiza la función de filtrar, mientras que la cápsula y los túbulos recogerán la orina formada y la transportan a las vías urinarias para su posterior eliminación.^{1, 35}

3.3. FILTRACIÓN DE LA ORINA:

La filtración es un proceso que permite el paso de líquido desde el glomérulo hacia la cápsula de bowman por la diferencia de presión sanguínea que hay entre ambas zonas.^{1, 35}

El líquido que ingresa al glomérulo tiene una composición química

similar al plasma, solo que no tiene proteínas, ó éstas se encuentran en porcentajes más bajos.^{1, 35}

A través del índice de filtrado glomerular, es posible inferir que cada 24 horas se filtran, en ambos riñones, 180 litros aproximadamente.^{1, 35}

Los factores que influyen en la filtración glomerular son: flujo sanguíneo y efecto de las arteriolas aferente y eferente.^{1, 35}

3.4. ELIMINACIÓN DE LA ORINA:

Una vez formada la orina en los glomérulos, discurre por los túbulos hasta llegar a la pelvis renal, desde donde pasa al uréter y llega a la vejiga, lugar donde es almacenada. Cuando el volumen supera los 250 – 500 cm³, sentimos la necesidad de orinar, debido a las contracciones y relajaciones del esfínter, que despierta el reflejo de la micción.^{1, 35}

La necesidad de orinar puede reprimirse voluntariamente durante cierto tiempo. La frecuencia de las micciones varía de un individuo a otro debido a que intervienen factores personales como son el hábito, el estado psíquico de alegría ó tensión, y el consumo en mayor ó menor medida de bebidas alcohólicas.^{1, 35}

La cantidad de orina emitida en 24 horas en el hombre es de aproximadamente 1500 cm³. El aumento se denomina poliuria y la disminución oliguria.^{1, 35}

4. METABOLISMO MINERAL:

Las sustancias minerales e inorgánicas comprenden el agua y las sales ó electrolitos (sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo y yodo), estos son constituyentes indispensables del mismo para mantener la vida y desempeñar funciones específicas, como el mantenimiento de la presión osmótica, equilibrio ácido – base y regulación de distintas funciones orgánicas (yodo, calcio).^{1, 35}

4.1. FISIOLOGÍA:

4.1.1. Agua y Electrolitos:

Agua del organismo: el agua es el constituyente más abundante del organismo y el medio en el que se desarrollan los procesos vitales. Constituye el 50 a 70 % del peso corporal, promedio 60 % es decir que una persona de 70 kg contiene alrededor de 40 litros de agua, unos 600 g/kg de peso.³⁵

Electrolitos: se refiere específicamente a las sales que en solución acuosa se encuentran disociadas en iones; en el organismo, los principales cationes son: sodio, potasio, calcio, magnesio y los principales aniones son: cloruro, bicarbonato, fosfato; de todas las sales la más importante es el cloruro de sodio. Según el principio de la electroneutralidad, la suma total de cationes electropositivos y la de aniones electronegativos deben ser iguales. La concentración de electrolitos se expresa en mEq/L.^{1,35}

4.1.2. Concentración Osmolar:

Los movimientos del agua y solutos a través de las membranas del organismo, lo que rige su distribución, depende de las fuerzas osmóticas. Las concentraciones se expresan en mOsm/L, es decir 1 mOsm corresponde a la milésima parte del peso iónico ó molecular (sustancias no ionizables) sin tener en cuenta su valencia ó número de oxidación. 1 mOsm de sodio, potasio, cloruro, monovalentes, equivale a 1 mEq de los mismos, a 2 mEq de los iones divalentes: calcio, magnesio y a 1 mOsm de glucosa.^{35,52}

Se denominan soluciones isoosmóticas ó isotónicas cuando tiene la misma cantidad de mOsm/L; en fisiología corresponde a las soluciones de igual presión osmótica que los líquidos del organismo (plasma sanguíneo, líquido intersticial y líquido intracelular), que es aproximadamente de 300 mOsm/L.^{35,52}

4.1.3. Compartimientos Líquidos del Organismo:

4.1.3.1. Volúmenes:

Los líquidos del organismo sea el agua con sus solutos, están distribuidos en tres compartimientos.^{35, 59}

Plasma sanguíneo ó compartimiento vascular: que representa el 5 % del peso corporal, limitado por la pared vascular, principal endotelio capilar.^{35, 59}

Líquido intersticial ó compartimiento intersticial: corresponde al 15 % de peso, separado del anterior por el endotelio capilar. El plasma y el líquido intersticial, forman el líquido extracelular, que constituye el medio interno en el que viven las células del organismo.^{35, 59}

Líquido intracelular ó compartimiento celular: representa el 40 % de peso, limitado y separado del anterior por la membrana celular ó plasmática.^{35, 59}

4.1.3.2. Composición:

La composición química de los tres compartimientos del organismo es diferente.^{35, 59}

La composición de electrólitos de plasma sanguíneo y líquido intersticial, en su conjunto, el líquido extracelular, es muy semejante; predomina el catión sodio que está en equilibrio esencialmente con los aniones Cl^- y HCO_3^- . El ión sodio es el más importante e insustituible, mientras que el ión cloruro puede ser remplazado por el ión de bicarbonato de manera que a una disminución del anión Cl^- , sigue un aumento del ión HCO_3^- , siguiendo el principio de electroneutralidad con respecto al catión sodio.^{35, 59}

La diferencia fundamental entre el plasma sanguíneo y el líquido intersticial es la presencia de proteínas en concentración muy superior en el primero, de unos 16 mEq/L aniónicos. Por lo tanto en el plasma, el catión sodio

esta en equilibrio especialmente con los aniones cloruros, bicarbonato y proteinato.^{35, 59}

La composición del líquido intracelular es muy diferente a la del extracelular, en el primero predomina el catión potasio, que se halla en equilibrio principalmente con los aniones: fosfato, bicarbonato, y con las proteínas. Posee en cambio poco sodio, correspondiente a alrededor de un décimo de sodio extracelular y prácticamente nada de cloruro. La separación entre el sodio extracelular y el potasio intracelular es función de un trabajo metabólico, el transporte activo, realizado por la célula mediante la bomba de sodio hacia afuera y la bomba de potasio hacia adentro que se oponen a que el sodio penetre en la célula y el potasio salga.^{35, 59}

4.1.3.3. Distribución de los Líquidos del Organismo:

La distribución del agua en el organismo está determinada especialmente por fuerzas osmóticas como son la presión coloidosmótica y la presión hidrostática.³⁵

Desde el punto de vista de la fisiopatología y farmacología del agua y electrólitos, es más importante el estudio de los factores que determinan la distribución de los líquidos extra e intracelular. Entonces, cabe señalar que el agua pasa libremente por la membrana celular y su movimiento es determinado pasivamente por la concentración de los electrolitos en ambos lados, buscando siempre equilibrio osmótico.³⁵

Los iones sodio y cloro del líquido extracelular rigen principalmente el equilibrio osmótico en ese orden, siendo el sodio el que gobierna la cantidad y distribución del agua del organismo.³⁵

El riñón es el órgano fundamental para la regulación del equilibrio osmótico del organismo por cuanto mantiene la concentración de sodio

extracelular y la cantidad de agua de acuerdo con las necesidades orgánicas.³⁵

4.1.3.4. Balance de Agua y Electrolitos:

Normalmente ingresan aproximadamente 2500 ml de agua y se elimina la misma cantidad por día. A una ingesta mayor de agua, el balance se mantiene por excreción renal. A una ingesta menor ó nula, continúan las pérdidas de agua: aproximadamente 1 litro de agua por vaporización (piel y pulmones) y medio litro de orina (volumen obligatorio), disminuyendo así el peso corporal en pequeños porcentajes. Cuando la pérdida alcanza alrededor del 15 % del peso corporal, se produce la muerte.^{1, 35}

El requerimiento mínimo del agua para un adulto es de 1500 ml diarios, pero en caso de fiebre, ambientes cálidos, en que las pérdidas inevitables son mayores, los requerimientos también lo son.^{1, 35}

En el organismo existe un total de 100 g de ión sodio (4200 mEq), que se excreta especialmente por el riñón en 95 % y el resto por la piel y el tubo digestivo. El organismo tiende a economizar más eficientemente en NaCl que el agua. Normalmente se ingiere de 3 a 6 g de sodio (130 a 260 mEq) ó bien 7.5 a 15 g de NaCl.^{1, 35}

La retención ó pérdida de sodio origina la retención ó pérdida de agua en el organismo respectivamente.^{1, 35}

4.1.3.5. Equilibrio Ácido – Base:

Los trastornos del metabolismo del agua y electrolitos se acompañan frecuentemente de perturbaciones del equilibrio ácido – base. Los sistemas amortiguadores ó buffer son soluciones que admiten el agregado de cantidades no considerables de ácidos ó bases sin que se altere en forma asociable a su pH.³⁵

El pH normal del plasma varía entre 7.35 y 7.45 (promedio 7.4) y constituye una de las constantes fisiológicas más estables y fijas del organismo.³⁵

Los factores fundamentales de su regulación se clasifican en sanguíneos, respiratorios y renales.³⁵

Regulación Sanguínea: se ejerce por diversos sistemas amortiguadores ó buffer, siendo el más importante el constituido por el ácido carbónico y los bicarbonatos (esencialmente el bicarbonato de sodio). La pérdida de ácido (H_2CO_3) ó de base ($NaHCO_3$), aumenta el pH con producción de alcalosis ó acidosis, que puede compensarse hasta cierto punto con la regulación respiratoria.³⁵

Regulación Respiratoria: el factor respiratorio de regulación del equilibrio ácido – base es de importancia fundamental, es muy rápida. Se refiere a la sensibilidad del centro respiratorio debido a las variaciones de pH del contenido de dióxido de carbono en la sangre; así, en la acidosis se produce una hiperventilación pulmonar que expulsa dióxido de carbono y desciende el nivel de ácido carbónico en el plasma sanguíneo mientras que en la alcalosis se produce hipo ventilación con respiración superficial, la que retiene dióxido de carbono y aumenta el nivel del ácido carbónico plasmático.³⁵

Regulación Renal: también es fundamental pero no procede en forma tan rápida como el factor respiratorio. El papel del riñón en dicha regulación se realiza por la secreción del ión hidrógeno y a través de los mecanismos bicarbonato – fosfato y la formación de amoniaco. Debido a ellos:³⁵

- El riñón excreta más ó menos iones hidrógeno de acuerdo con las necesidades y existencias en el organismo (acidosis ó alcalosis), formando orinas ácidas ó alcalinas, según el caso.³⁵

- Al formar amoniaco en los caso de acidosis, el catión amoniaco remplaza el sodio preservando la pérdida del mismo.³⁵
- En los casos de alcalosis, el riñón elimina sodio unido al bicarbonato (NaHCO_3) en lugar de cloruro, preservando así la pérdida de este ión del organismo.³⁵

Alcalosis y acidosis; si la alteración consiste en cambios primarios del factor bicarbonato de la reserva alcalina, es decir disminución ó aumento de la misma, se dice que existe acidosis ó alcalosis metabólica respectivamente.³⁵

Si la alteración se refiere a cambios primarios del factor ácido carbónico, es decir aumento ó disminución del mismo, se trata de acidosis ó alcalosis respiratoria respectivamente. Se compensan con la eliminación ó retención de dióxido de carbono, acción del riñón, retención ó excreción del bicarbonato de sodio, formación de amoniaco por el riñón, etc. Dependiendo del tipo de cambio.³⁵

Acción mineralocorticoide en el metabolismo inorgánico; una de las acciones más importantes de las hormonas adrenocorticales, sobre todo de los llamados mineralocorticoides, se ejerce sobre los túbulos renales, modificando la reabsorción de sodio, potasio, agua:³⁵

- Sodio: La administración de mineralocorticoides, detiene la pérdida de sodio por el riñón, al retenerse sodio y como consecuencia cloruro y agua, los volúmenes de plasma, sangre, líquido intersticial aumentan. A dosis altas ó dosis convencionales (si hay predisposición al edema) puede desarrollarse edema, así mismo las dosis altas son capaces de provocar hipertensión arterial especialmente por hipervolemia debido a la hipernatremia producida.^{35, 52}
- Potasio: La concentración sanguínea del potasio desciende por aumento

de su excreción urinaria. En esta forma la relación Na/K en el plasma sanguíneo aumenta. Este balance negativo puede llevar a la hipokalemia con sus consecuencias (debilidad muscular y depresión cardíaca).^{35, 52}

- Equilibrio Ácido – Base: La administración de hormonas adrenocorticales básicamente aumenta la excreción renal del ión hidrógeno, corrigiendo la acidosis en la insuficiencia suprarrenal; originando alcalosis hipokalémica en los casos de hipokalemia, por la administración elevada de los mismos.^{35, 52}
- Diferencias de Acción de los Preparados: La acción sobre el metabolismo electrolítico la tienen todos los corticosteroides la poseen en grado sumo como es el caso de la desoxicorticosterona (la aldosterona es mucho más potente, aproximadamente 40 veces) pero todavía no ha entrado en la práctica terapéutica.^{35, 52}
- Modo de Acción: La acción fundamental de los corticosteroides es estimular la reabsorción activa de sodio en los segmentos distales del nefrón al mismo tiempo que se promueve por un proceso de intercambio de secreción pasiva de potasio e hidrógeno al mismo nivel, en esta forma se retiene el sodio y se pierde el potasio en el riñón. La acción de los mineralocorticoides se ejerce fundamentalmente en el túbulo colector y también en el túbulo distal. Estos procesos de intercambio sodio – potasio se realizan en las glándulas sudoríparas, salivales e intestinales, en que existe frecuentemente una disminución de la eliminación de sodio.^{35, 52}

4.2. FISIOPATOLOGÍA:

Los síndromes fisiopatológicos correspondientes al metabolismo de agua y sodio son por exceso y por defecto y corresponden respectivamente al edema y a la deshidratación.^{1, 46}

Se denomina edema a la acumulación normal de líquidos en los espacios intersticiales, es decir aumento de volumen del compartimiento intersticial, parte principal del líquido extracelular.^{1, 46}

Se denomina deshidratación a la disminución del agua del organismo; esta pérdida hídrica se acompaña siempre de una pérdida de electrolitos, pero la forma en que se desarrolla dicha deshidratación es diferente si la pérdida inicial y preponderante es de agua ó de sodio.^{1, 46}

Se distinguen así tres tipos de deshidratación, a saber: carencia ó depleción pura de agua, carencia ó depleción de sodio y mixta.^{1, 46}

5. DIURÉTICOS:

Generalmente, el primer medicamento de elección en el tratamiento de la hipertensión arterial (HTA) es un diurético. Aumenta la eliminación de orina y sal del organismo, lo que sirve para bajar la HTA, tanto por el líquido perdido como porque así disminuye la resistencia al flujo sanguíneo de los vasos del organismo. (Sin embargo, las tiazidas pueden aumentar el nivel de colesterol sanguíneo).

Con los diuréticos, se nota que uno orina mucho más frecuentemente y más rápido tras la ingesta de líquidos. Aparte de ello, los efectos colaterales de los diuréticos son pocos, destacando la pérdida de potasio ó hipopotasemia, que obliga a seguir los niveles de potasio en sangre mediante análisis y a tomar suplementos de potasio, ya que no suele bastar con la ingesta de frutas ricas en potasio (naranja, plátano) para corregir los déficits de potasio causados por diuréticos. Si se toma poca sal, el diurético será más eficaz y la pérdida de potasio será menor.⁵⁶

5.1. CLASIFICACIÓN:

A. Según su sitio de acción:

1. Grupo I: a nivel del túbulo contorneado proximal
Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Diuréticos osmóticos

Xantinas

2. Grupo II: a nivel del asa de Henle (diuréticos de asa)

Furosemida

Bumetanida

Ácido etacrínico

Torasemida

3. Grupo III: a nivel del túbulo contorneado distal

Tiazidas y diuréticos relacionados

4. Grupo IV: a nivel del túbulo distal y colector (diuréticos ahorradores de potasio)

Espironolactona

Amilorida

Triamtereno

B. Según su mecanismo de acción:

1. Inhibidores de la reabsorción de sodio (saluréticos ó natriuréticos)

Diuréticos tiazídicos

Diuréticos de alta eficacia (de “techo alto” ó “de asa”)

Diuréticos ahorradores de potasio

2. Diuréticos osmóticos

3. Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Acetazolamida

Etoxizolamida

Diclorfenamida

Metazolamida

4. Diuréticos que incrementan el flujo sanguíneo renal (Teofilina, cafeína).

C. Según su potencia farmacológica:

1. De alta potencia (de techo alto ó de asa)

Furosemida

Bumetanida

Ácido etacrínico

2. De potencia moderada

Tiazidas y diuréticos análogos

3. De baja potencia:

Diuréticos osmóticos (manitol)

Inhibidores de la anhidrasa carbónica (acetazolamida)

Diuréticos acidificantes (cloruro de amonio)

Xantinas (teofilina, teobromina, cafeína)

D. Según su efecto sobre la kalemia:

1. Diuréticos ahorradores de potasio (antikaluréticos ó hiperkalemiantes)

Antagonistas de la aldosterona (espironolactona y derivados)

Pirazinas (amilorida, triamtereno)

2. Diuréticos hipokalemiantes

Diuréticos de asa

Tiazidas y compuestos del grupo de las tiazidas

E. Otros diuréticos: sales acidificantes: cloruro de amonio, de calcio y nitrato de amonio.

5.2. HIDROCLOROTIAZIDA:

Este grupo de drogas produce una diuresis de intensidad moderada (35 % de la furosemida) y hacen excretar el 8 % del sodio filtrado por el glomérulo; el efecto diurético de la hidroclorotiazida, se inicia a la hora y dura de 4 a 6 horas y con la dortalidona se inicia a las 3 a 4 horas y dura 48 horas. Las tiazidas y análogos aumentan la excreción urinaria de sodio, cloro y potasio; la excreción de este último se debe a que la mayor cantidad de sodio que llega al túbulo distal donde se intercambia con potasio; además, debido a su acción proximal aumentan discretamente la excreción de fosfato y bicarbonato; cuando se les administra en forma prolongada disminuye la excreción de calcio (por aumentar

su reabsorción tubular). Estas drogas disminuyen en el plasma los niveles de sodio, potasio y cloro, especialmente de este último, por lo que pueden originar alcalosis hipoclorémica.⁵⁶

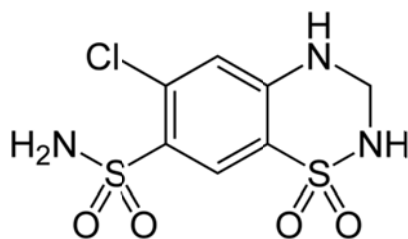


FIGURA N° 1.2: Estructura Química de la Hidroclorotiazida

En cuanto al mecanismo y sitio de acción, las tiazidas y análogos actúan inhibiendo el transporte de NaCl en los túbulos contorneados distales (1^{ra} porción). La bomba de sodio de la membrana vaso lateral crea una gradiente electroquímica para el sodio, siendo la energía proveniente de dicha gradiente, aprovechada por el simporte de Na/Cl de la membrana luminal para hacer ingresar Cl⁻ a la célula en contra de su gradiente electroquímica. Luego sale el Cl⁻ en forma pasiva por canales de Cl⁻ de la membrana basolateral. Este grupo de diuréticos actúa inhibiendo el simporte de Na/Cl, posiblemente al competir por el sitio de unión para el cloro. Además las tiazidas poseen leve acción inhibitoria de la anhidrasa carbónica en el túbulo proximal.⁵⁶

Otros Efectos: Estas drogas además poseen los siguientes efectos: disminuyen la presión arterial por producir relajación en la musculatura lisa vascular (arteriola), incrementan la uricemia debido a que disminuyen la secreción y estimulan la reabsorción de ácido úrico, disminuyen la poliuria en pacientes con diabetes insípida, elevan la glicemia y disminuyen la tolerancia a la glucosa (por inhibición de la secreción de insulina y estimulación de la glucogenólisis hepática y muscular).⁵⁶

Farmacocinética: Estos diuréticos se absorben por todas las vías y precisamente una de sus ventajas la constituye su rápida absorción intestinal, lo que determina que sus efectos se evidencien entre los 30 y 60 minutos de su administración oral. Una vez en sangre, se distribuyen por todos los órganos, acumulándose principalmente en el riñón. Estos diuréticos se excretan fundamentalmente por el riñón, donde sufren secreción y reabsorción tubular y en una pequeña fracción se excretan por bilis.⁵⁶

Reacciones Adversas:

- Tóxicas; muchos de los efectos tóxicos derivan de su acción diurética y consisten en hipovolemia, hiponatremia, hipokalemia y alcalosis hipoclorémica; la alteración más importante es la hipokalemia y suele manifestarse por apatía, debilidad muscular y trastornos cardíacos, otras manifestaciones son náuseas, malestar epigástrico y diarreas; pueden agravar la insuficiencia renal y/o hepática.⁵⁶
- Colaterales; pueden producir hiperglicemia moderada, especialmente en pacientes diabéticos, así mismo, pueden desencadenar un ataque de artritis aguda en pacientes gotosos.⁵⁶
- Por hipersensibilidad; dermatitis con fotosensibilidad, púrpura, hepatitis colestásica, depresión de la médula ósea y vasculitis necrosante.⁵⁶

Indicaciones Terapéuticas: Las más importantes son: insuficiencia cardíaca descompensada, edema debido a enfermedades hepáticas crónicas, hipertensión arterial leve ó moderada, en el tratamiento de la diabetes insípida, nefrogénica e hipofisaria.⁶⁰

Contraindicaciones: Aparte de la hipokalemia están contraindicadas en la insuficiencia renal moderada ó severa.⁶⁰

6. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio ó aluminio un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La cromatografía en capa fina, que comenzó a usarse hacia 1950, es muy simple, barata, sensible y eficiente.^{11, 57}

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.^{12, 34}

Polaridad de los compuestos orgánicos en orden creciente:

Hidrocarburos < Olefinas < Flúor < Cloro < Nitro < Aldehído

Aldehído < Ester < Alcohol < Cetonas < Aminas < Ácidos < Amidas

El disolvente asciende entonces por capilaridad a lo largo de la placa, arrastrando a los compuestos a diferentes velocidades, según el grado de adsorción de éstos produciéndose así su separación. Transcurridos unos minutos, cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo de la placa, se saca ésta de la cubeta, se deja secar y se examina. Los diversos compuestos se localizan directamente si son coloreados, ó con la ayuda de un indicador ó luz ultravioleta, si son incoloros. Los compuestos que avanzan a lo largo de la placa se ven atraídos por fuerzas electrostáticas sobre la superficie del adsorbente, interaccionando el disolvente con ambos. Esta interacción competitiva establece las velocidades relativas con que ascienden por la capa de adsorbente, el frente

de disolvente y un determinado compuesto. Cuanto mayor es la polaridad de los compuestos, más intensamente se ven éstos atraídos por el adsorbente. Se puede establecer el orden aproximado de polaridad:³⁴

Ácidos Carboxílicos < Aminas < Alcoholes y Tioles < Aldehídos, Cetonas y Ésteres < Halogenuros de Alquilo y Arilo < Hidrocarburos no Saturados < Hidrocarburos Saturados.³⁴



FIGURA N° 1.3: Corrida de Placas Cromatográficas

6.1. VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA:

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa.) ya que el material que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.^{11, 34}

6.2. ADSORBENTES:

Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido esté mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente (yeso). Algunos de los adsorbentes más utilizados son: ⁴⁵

- Celulosa
- Almidón
- Azúcares
- Gel de sílice (silicagel)
- Óxido de aluminio (alúmina)
- Carbón activo (carbón en polvo)
- Kieselguhr

Los tres primeros se utilizan para extraer componentes polifuncionales de plantas y animales. ⁴⁵

6.2.1. Sílica Gel:

El gel de sílice ó ácido silícico es uno de los más utilizados, es débilmente ácido, su pH oscila entre 4 – 5. Con lo cual no se deberá utilizar con sustancias que se corrompan con los ácidos. Los geles de sílice normales suelen contener impurezas de hierro y/o aluminio, este factor también se debe tener en cuentas respecto al uso de componentes. El tamaño del grano suele ser de 10 a 40 micras (μ) y el tamaño de poro varia de 20 a 150 Å. ¹¹

Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente. También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta, juntos ó por separados (amarillo y/o verde), en diversos tipos de gel de sílice.¹¹

Se trata de un adsorbente polar, pero puede ser tratado con hidrocarburos para neutralizar los grupos OH , de forma que se haga apto para separar componentes lipófilos (esteroides, ácidos grasos, ceras, vitaminas liposolubles, etc.). A este proceso se le denomina cromatografía de fase reversa (silanizado).¹¹

6.2.2. Alúmina:

La alúmina u óxido de aluminio es un adsorbente ligeramente básico debido a que en el proceso de extracción de la alúmina a partir de la bauxita quedan algunas moléculas de hidróxido de aluminio adheridas a la alúmina, dándole a ésta un carácter básico. No consigue un desarrollo tan alto de la sustancia depositada como el gel de sílice.¹¹

La alúmina puede ser tratada químicamente para conseguir alúminas ácidas, básicas y neutras. Puede contener aglomerantes y/o indicadores ultravioletas. Es un adsorbente de carácter polar, de tal forma que retendrá con mayor avidez a los componentes polares.¹¹

6.3. PREPARACIÓN DE PLACAS:

El adsorbente se deslíe en agua destilada. Para mezclar la papilla homogéneamente es preferible agitar de modo mecánico. La proporción de adsorbente y agua depende del tipo de adsorbente. Dos partes de agua y una de adsorbente pueden tomarse como norma general, no obstante, habrán de consultarse las instrucciones del fabricante.^{17, 34}

Originariamente se utilizaban, como soporte del adsorbente, láminas de vidrio, pero en la actualidad también se utilizan láminas de otros compuestos

orgánicos más flexibles. Dependiendo del tipo de separación que se desee (cualitativa ó preparativa) se utilizará un tamaño de placa u otro. En general para realizar una separación preparativa de un gramo de muestra es necesario una placa de vidrio 20 x 20 cm, 35 g de adsorbente y 80 ml. de agua destitada.^{17, 34}

Las propiedades de la fase estacionaria pueden alterarse mediante la adición de compuestos tales como disoluciones tamponadoras para mantener el pH deseado. En la preparación de las placas también se pueden adicionar indicadores fluorescentes ó aglomerantes.^{17, 34}

Cabe destacar la adición de nitrato de plata (AgNO_3), a este proceso se le denomina argentación, y se utiliza para separar componentes insaturados.^{17, 34}

El espesor de la placa es otro factor a tener en cuenta al preparar la placa, en general suele ser de:^{17, 34}

0.1 – 0.2 mm. Para separaciones analíticas.

0.5 – 2 mm. Para separaciones preparativas.

La placa debe quedar libre de grumos y rugosidades, que afectarían al desarrollo del proceso cromatográfico. Para ello existen en el mercado extensores que se utilizan para crear de forma mecánica placas homogéneas del espesor deseado. Si no se dispone de extensor, el proceso a seguir es el siguiente:^{17, 34}

- Mezclar en un Erlenmeyer el agua y el adsorbente.
- Agitar enérgicamente.
- Extender la papilla sobre el soporte de vidrio.
- Hacer oscilar la papilla de un lado a otro.

- Golpear con el dedo la parte inferior del soporte.

Las placas, normalmente, se dejan reposar un corto espacio de tiempo después de cubrirlas; luego se colocan en bandejas metálicas. En este momento puede activarse el agente adsorbente, bien dejando las placas reposar toda la noche a temperatura ambiente, bien calentándolas durante 30 – 60 minutos a 105 – 110 °C (las placas de celulosa no deben calentarse más de 10 minutos a 105 °C) para expulsar así el aire. Es conveniente dejar secar las placas inicialmente al aire, para evitar los agrietamientos que se producirían por efecto del cambio de temperatura.^{17, 34}

6.4. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Los productos a examinar se disolverán, cuando sea posible, en un disolvente orgánico no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación. Sin embargo a menudo se necesitan disolventes polares; la mezcla cloroformo: metanol (1:1) es efectiva. Frecuentemente se emplean disoluciones al 1 %, de manera que al aplicar 2 μ l resulta en la carga 20 μ g de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 μ g de material; por esto con esta carga puede llegarse a observar un 5 % de impurezas.¹¹

Existen una gran variedad de micropipetas y microjeringuillas para realizar el proceso de siembra de la muestra a analizar. También pueden usarse tubos capilares. El proceso de siembra se realiza tocando con la punta del capilar (micropipeta, jeringuilla, etc.) sobre la placa preparada. Dejando una distancia al borde inferior de un centímetro aproximadamente. El punto de aplicación de la muestra se denomina toque.¹¹

Una vez colocado el toque se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar.¹¹

6.5. ELECCIÓN DEL ELUYENTE:

La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo.¹¹

Principales eluyentes en orden creciente de polaridad:¹¹

- Éter de Petróleo.
- Éter Dietílico.
- Ciclohexano.
- Acetato de Etilo.
- Tetracloruro de Carbono (*)
- Piridina.
- Benceno (*)
- Etanol.
- Cloroformo (*)
- Metanol.
- Diclorometano.
- Agua.
- Ácido Acético.

(*) Compuestos cancerígenos.

En la elección del eluyente influyen varios factores:⁵⁷

- Precio.
- Pureza.
- No utilizar mezclas de eluyentes (reproducibilidad).
- No utilizar compuestos muy volátiles.
- Evitar que contengan trazas de metales (catalizadores).

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares.⁵⁷

- Toque de la muestra sin aplicar ningún eluyente.
- Aplicando un eluyente poco polar.
- Aplicando un eluyente más polar.

Al aplicar en primer lugar eluyentes poco polares, podemos seguir utilizando la misma placa para aplicar otros eluyentes más polares, hasta dar con el más apropiado.⁵⁷

Otra técnica para realizar la elección del eluyente consiste en sembrar varias muestras distanciadas suficientemente, y aplicar con un tubo capilar distintos eluyentes sobre el centro de cada muestra. Esto permite desarrollar cada eluyente radialmente por capilaridad, de forma que se aprecie el eluyente con el cual la separación se realiza de una manera más eficaz.⁵⁷

6.6. DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFÍA:

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realiza en una cubeta. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la

cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse.^{8,9}

Generalmente el eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmósfera. El tiempo de desarrollo, por lo general, no llega a los 30 minutos. El tiempo de una cromatografía cualitativa suele ser de un par de minutos, mientras que el tiempo de una cromatografía preparativa puede llegar a un par de horas.^{8,9}

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado, ó hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. Esto se hace para estandarizar los valores de R_f . Frecuentemente esta distancia es de 10 cm; parece ser la más conveniente para medir valores de R_f . Después del desarrollo, las placas pueden secarse rápidamente con una corriente de aire caliente.^{8,9}

La mejor posición de desarrollo para un componente es el punto medio entre el origen y el frente del eluyente, ya que permite separar las impurezas que se desplazan con mayor y menor velocidad. El frente del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa.^{8,9}

Si la placa se estropea por acción del aire ó de la luz, se secará en una cámara que contenga un gas inerte ó aislado de la luz.^{8,9}

6.7. LOCALIZACIÓN DE SUSTANCIAS:

Si los compuestos separados no son coloreados es necesario revelar la posición de dichos compuestos, para ello existen dos tipos de métodos:¹¹

- Métodos químicos.
- Métodos físicos.

6.7.1. Métodos Químicos:

Consisten en realizar una reacción química entre un reactivo revelador y los componentes separados, para ello se pulveriza la placa con los reactivos reveladores con la ayuda de un pulverizador de vidrio y una pera de goma, ó mediante un dispositivo que proporcione aire comprimido.¹¹

Es preferible pulverizar con las placas en posición horizontal. Si el reactivo revelador es peligroso ó muy corrosivo, la pulverización deberá realizarse en una vitrina de gases bien ventilada.¹¹

Generalmente se utiliza como reactivo revelador yodo, el cual forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo – marrón), pero las manchas desaparecen con el tiempo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas.¹¹

Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras.¹¹

El tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado.¹¹

Además de estos reveladores generales, existen otros específicos:¹¹

- 2.4 – dinitrofenilhidracina (para aldehídos y cetonas).
- Verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos).
- Paradimetil aminobenzaldehído (para aminas).
- Ninhidrina (para aminoácidos).

6.7.2. Métodos Físicos:

El más común consiste en añadir al adsorbente un indicador fluorescente.

De tal forma que al colocar la placa bajo una lámpara ultravioleta, y dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes, ó en otros casos aparece toda la placa fluorescente excepto donde hay componentes.^{9, 11}

Algunos compuestos poseen cierta fluorescencia (aunque no es normal) que pueden ser detectados directamente en una lámpara de ultravioleta.^{9, 11}

6.8. CONSTANTE R_f :

La constante R_f (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como:¹¹

$$R_f = \frac{\text{Distancia Recorrida desde el origen por el Compuesto}}{\text{Distancia Recorrida desde el origen por el frente del Eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_f entre 0.65 y 0.7.¹¹

Para averiguar si dos compuestos son iguales, se colocan ambos sobre la misma placa y se desarrolla con varios eluyentes. Una vez desarrollados se calculan los R_f y si son distintos, puede deducirse con toda seguridad que no se trataba del mismo compuesto. Por el contrario si los R_f son iguales los compuestos pueden ser iguales ó no serlo.¹¹

Si se sospecha que dos compuestos son muy parecidos se eluyen sobre la misma placa con el mismo eluyente u otros de menor polaridad, hasta apreciar una separación mínima. En este caso no se pueden usar reveladores químicos, ya que alterarían los compuestos, sino indicador ultravioleta.¹¹



CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

1.1.1. Hojas de *Laurus nobilis* L. “Laurel”:

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron las hojas secas de *Laurus nobilis* L. “Laurel”, recolectados del distrito de Tiabaya – Arequipa.

1.1.2. Animales de Experimentación:

Estos animales se utilizaron para determinar el efecto diurético de *Laurus nobilis* L. “Laurel”, para efectuar la presente investigación se escogieron un total de 42 ratas machos de la especie *Rattus rattus*, variedad *Wistar novergicus*; con un peso promedio que varía de 232 – 305 g, adultos jóvenes (aparentemente sanos sin diferencia) alrededor de 5 meses de vida obtenidas del bioterio de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

Durante el lapso que duró el experimento, todos los animales fueron sometidos a las mismas condiciones dietéticas y ambientales.

1.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

1.2.1. Material de Vidrio:

- Balones de 200 ml y 250 ml
- Vasos de precipitado de 100 ml y 250 ml.
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Probetas de 100 ml.
- Tubos de Ensayo.
- Embudos.

- Bagueta de vidrio.
- Capilares.
- Termómetro.
- Frascos de vidrio

1.2.2. Equipos:

- Balanza Analítica OHAUS PIONEER TM.
- Balanza de Precisión de plato con transformador SARTORIUS
- Cámara para Cromatografía de Capa Fina
- Lámpara de Luz Ultravioleta.
- Equipo Evaporador Rotativo BUECHI II.
- Equipo de extracción de Soxhlet
- Analizador de electrolitos EasyLyte Plus Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer.
- Estufa Esterilizadora MEMMERT U1S.

1.2.3. Otros Materiales:

- Jaulas acondicionadas para el metabolismo urinario de ratas (jaulas individuales con base de malla de alambre y sistema de embudo incorporado de aluminio para la recolección de orina).
- Cromatofolios de Sílica Gel 60 F₂₅₄
- Gasa
- Vasos
- Jeringas de 5 ml y 10 ml
- Papel craft
- Micropipetas automáticas.

1.2.4. Material Complementario:

- Espátulas
- Sonda gástrica metálica

- Mortero.
- Picetas.
- Gradillas.
- Papel filtro.
- Soporte universal.
- Tablas.
- Cuchillos.
- Ollas.
- Cocina eléctrica.

1.3. REACTIVOS:

- Etanol Absoluto p.a. DIPROQUIM.
- Tolueno p.a. JT BAKER.
- Acetato de Etilo p.a. JT BAKER.
- Metanol p.a. PURIQUIM REAGEN/INDUQUIMICA.
- Hexano p.a. JT BAKER.
- Reacción de Liebermann Burchard.
- Reactivo de Drangendorff.
- Ácido acético p.a. JT BAKER.
- Ácido Sulfúrico cc. p.a. MERCK.
- Cloruro férrico NEQUINSA.
- Cloruro de aluminio RIEDEL DE HAEN.
- Vainillina NEQUINSA.

2. MÉTODOS:

2.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL:

2.1.1. Recolección:

Se obtuvieron las hojas de *Laurus nobilis* L. “Laurel” del distrito de

Tiabaya – Arequipa en el mes de Junio del 2012, teniendo en cuenta: que todas las hojas pertenezcan a la misma especie vegetal, su aspecto, color y tamaño; desechando las hojas que fueron afectados por factores externos (animales, insectos, hongos, etc.); los que pudieran degradar los principios activos de la especie.

2.1.2. Selección:

La selección consistió en separar las hojas en buen estado y desechar aquellas hojas que estuvieran dañadas, partidas, marchitas, podridas, malolientes, seguidamente fueron lavadas para arrastrar impurezas como el polvo y ectoparásitos.

2.1.3. Análisis Organoléptico:

Para este análisis se determinaron los siguientes caracteres organolépticos: color, olor, sabor, textura. Este análisis se llevó a cabo en las hojas frescas de *Laurus nobilis L.* “Laurel”.

2.1.4. Estabilización y Dsecación:

Una vez seleccionadas las hojas frescas de *Laurus nobilis L.* “Laurel”, fueron lavadas con agua destilada; con la finalidad de eliminar las impurezas, microparásitos, hongos, etc. Se estabilizó las hojas en la estufa a 80 °C por 4 minutos. Luego se cortaron las hojas en partes pequeñas y se procedió a desecar el material vegetal en la estufa a 60 °C por 2 horas con el propósito de eliminar el mayor porcentaje de agua del material vegetal, fueron sometidas a un ambiente cerrado, protegidas de la luz y los rayos solares, bien aireado para así asegurar una buena conservación de la planta.

2.1.5. Pulverización y Almacenamiento:

Luego de desecar convenientemente el material vegetal se procedió a

pulverizar con un mortero hasta un polvo uniforme, con el propósito de incrementar la superficie de contacto para el momento de las extracciones con los solventes y facilitando de esta manera las extracciones de los principios activos, para luego ser recolectado en papel craft debidamente rotulado y guardado en un lugar cerrado, a una temperatura adecuada, libre de humedad y lejos de la luz solar para su correcto almacenamiento y conservación.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RESIDUAL:

Método: Gravimétrico

Fundamento:

Se basa en la diferencia de peso que existe entre un peso inicial conocido y el peso final de una muestra, después de la desecación a la estufa a una temperatura de 60 – 70 °C hasta peso constante.

Procedimiento:

Se pesó 5 g de muestra por triplicado y se colocaron en tres cápsulas previamente secadas y pesadas, las mismas que fueron introducidas a la estufa a una temperatura de 60 – 70 °C hasta peso constante para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

%H = Porcentaje de humedad

2.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS:

Método: Extracción con Soxhlet.

Fundamento:

Consiste en un sistema cerrado que permite el flujo de solvente en ciclos, los equipos de Soxhlet constan de tres partes: un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición; la segunda parte es un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro; finalmente se tiene un refrigerante ó condensador el cual recibe los vapores del solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre el material vegetal, cuando el soporte que mantiene el material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa espontáneamente un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continua en ebullición, cada llenada de solvente en el soporte de muestra es un ciclo y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra.³⁰

Procedimiento:

Se procedió a pesar y empaquetar 15 g de material vegetal desecada y pulverizada en una hoja de papel filtro, el cual recibió el nombre de cartucho y fue colocado en el extractor que forma parte del equipo de Soxhlet, seguidamente en el balón del equipo extractor se colocó 150 ml del solvente indicado, usando solventes de distintas polaridades (etanol, acetato de etilo, hexano), y se procedió a armar el equipo, colocando el balón en una olla con agua para que sirviera como B.M. a una temperatura de 80 °C, por un tiempo de 5 horas hasta que el solvente haya agotado toda la muestra del cartucho, finalmente se procedió a desarmar el equipo enfriándolo previamente y se obtuvo el extracto indicado.

2.4. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO A PARTIR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS:

Método: Evaporación a sequedad

Fundamento:

Se basa en la obtención del extracto seco a partir de la separación del solvente y del principio activo aplicándose una temperatura adecuada y sometiendo el extracto a B.M, hasta la evaporación total del solvente, quedando suspendido en el fondo del recipiente el principio activo que se desea obtener.^{30, 54}

Procedimiento:

Se tomó el extracto obtenido de la extracción por Soxhlet, se colocó a un balón para su evaporación mediante el equipo rotavapor, seguidamente se procedió a su evaporación por sequedad en un vaso de vidrio previamente tarado, para luego ser llevado a baño maria a una temperatura de 80°C para la evaporación de solvente hasta la aparición del residuo con peso constante, al término del cual se procedió a determinar el porcentaje de rendimiento de extracto seco.

Cálculos:

$$\%ES = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

%ES = Porcentaje de extracto seco

2.5. ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN:

2.5.1. Etapa de Adaptación y Selección de Animales de Experimentación:

Las ratas fueron previamente sometidas a un proceso de adaptación en la que consistió en estandarizar las condiciones ambientales, alimenticias y evitar factores externos que sean impedimento de una óptima investigación, las ratas a utilizar fueron seleccionadas con un peso entre 232 – 305 g, de 5 meses de vida y de sexo macho (aparentemente sanas), para la alimentación de las ratas se utilizó trigo, maíz y agua los cuales fueron repartidos en porciones iguales y suficientes, para que el animal pueda alimentarse a voluntad. Se sometió a un ayuno de 12 horas a las ratas, previo a cada etapa de experimentación.

2.5.2. Pruebas Piloto:

2.5.2.1. Prueba Piloto I (Elección del Extracto):

La finalidad de esta prueba piloto es elegir el extracto que presenta mayor diuresis. Para esta prueba piloto se utilizaron 12 ratas previamente adaptadas a las mismas condiciones ambientales y sometidas a un ayuno de 12 horas previas a la experimentación, seguidamente se repartieron en 4 grupos de 3 ratas y se las colocó en jaulas metabólicas adaptadas para observar su metabolismo urinario. Usándose una sonda gástrica metálica se administró por vía oral, los distintos extractos preparados para cada grupo de ratas a una dosis de 0.0587 g/kg de peso (calculada según vademécum tradicional⁴¹) suspendidos los extractos en 5 ml de agua para su administración.

Grupo I: Extracto Seco Etanólico.

Grupo II: Extracto Seco de Acetato de Etilo.

Grupo III: Extracto Seco de Hexano

Grupo IV: Agua Destilada

Se procedió a recolectar la orina de cada rata en vasos y se midió el volumen final de orina de las 24 horas. (Se realizó la etapa de experimentación por 5 días consecutivos). Tomándose en cuenta el volumen final de cada día (24 horas), se calculó el promedio y desviación estándar del volumen urinario de los 5 días experimentación para cada grupo, y también se realizó un análisis de varianza ANOVA y Test de Tukey con un nivel de confianza del 95 %, con la finalidad de determinar el extracto que produjo mayor diuresis.

También se midió el volumen urinario de la cero hora a la octava hora y de la décimo séptima a la vigésimo cuarta hora para observar el comportamiento de la diuresis en estos intervalos de tiempo.

Esta primera fase de las pruebas piloto nos permitirá determinar el Extracto que mejor convenga, a fin de demostrar su efecto diurético.

2.5.2.2. Prueba Piloto II (Elección de la Dosis del Extracto):

Una vez determinado el extracto que produjo mayor diuresis, se usará dicho extracto para realizar la segunda prueba piloto, que tiene por finalidad determinar la dosis de dicho extracto que produce mayor diuresis, para lo se calculó la primera dosis a usar de acuerdo al vademécum tradicional (0.0587 g/kg de peso) la segunda dosis fue el doble de la dosis calculada (0.1174 g/kg de peso) y la tercera dosis fue la mitad de la dosis calculada inicialmente (0.0294 g/kg de peso).

Se utilizaron 12 animales de experimentación previamente adaptados a las mismas condiciones ambientales, y se les sometió a ayuno por un periodo de 12 horas. Seguidamente se repartieron las ratas en 4 grupos de 3 ratas y se las colocó en las jaulas metabólicas

acondicionadas para el metabolismo urinario. Se administró el extracto elegido en la primera prueba piloto, a diferentes dosis, cada dosis suspendida en 5 ml de agua.

Grupo I: Extracto Etanólico seco a la dosis de (0.0587 g/kg).

Grupo II: Extracto Etanólico seco a la dosis de (0.1174 g/kg).

Grupo III: Extracto Etanólico seco a la dosis de (0.0294 g/kg).

Grupo IV: Agua Destilada 5 ml.

Se procedió a recolectar la orina de cada rata en vasos y se midió el volumen final de orina de las 24 horas. (Se realizó la etapa de experimentación por 5 días consecutivos).

Tomándose en cuenta el volumen final de cada día (24 horas), se calculó el promedio y desviación estándar de volumen urinario de los 5 días para cada grupo, y también se realizó un análisis de varianza ANOVA y Test de Tukey con un nivel de confianza del 95 %, con la finalidad de determinar la dosis a la cual se produce mayor diuresis.

También se midió el volumen urinario de la cero hora a la octava hora y de la décimo séptima a la vigésimo cuarta hora para observar el comportamiento de la diuresis en estos intervalos de tiempo.

2.5.3. Etapa Final de la Experimentación:

Se determinó el efecto diurético de las hojas de *Laurus nobilis L.* “Laurel” y la excreción de electrolitos en la orina de ratas aparentemente sanas.

Una vez obtenidos los datos de las pruebas piloto, las cuales nos permitieron elegir el extracto adecuado y la dosis. Para esta etapa se utilizaron 18 ratas adultos jóvenes machos con 5 meses de vida y con pesos promedio entre

230 – 305 g (aparentemente sanos) repartidos en 3 grupos de 6 ratas cada uno, los cuales se estandarizaron las condiciones ambientales y de alimentación, mediante una dieta balanceada con maíz, trigo y agua; fueron alimentadas a voluntad en dos porciones por la mañana y por la tarde.

Los animales de experimentación fueron sometidos previamente a cada experiencia a un ayuno de 12 horas, al cabo de las cuales se pesó cada rata a fin de determinar la dosis a administrarse.

Luego se procedió a colocar las ratas en sus respectivas jaulas metabólicas acondicionadas para observar su metabolismo urinario, y se les administró lo siguiente:

Grupo I: Grupo Extracto seco a la dosis de 0.0587 g/kg de peso

De acuerdo a los pesos se calculó la dosis necesaria de extracto para cada rata de este grupo, y en seguida se les administró vía oral mediante la jeringa gástrica en un volumen total de 5 ml.

Grupo II: Grupo Hidroclorotiazida a la dosis de 0.002 g/kg de peso

Se les administró una solución de hidroclorotiazida, calculada para cada peso correspondiente a los animales de experimentación de este grupo y en seguida se les administró vía oral mediante la jeringa gástrica en un volumen total de 5 ml.

Grupo III: Grupo Blanco

A este grupo se les administró únicamente vía oral mediante la jeringa gástrica agua destilada en un volumen de 5 ml.

Después de su respectiva administración se procedió a recolectar la orina en vasos y medir el volumen urinario, con una jeringa descartable para cada animal de experimentación. Se midió el volumen urinario de la cero hora a la

sexta hora y de la décimo octava a la vigésimo cuarta hora para observar el comportamiento de la diuresis en estos intervalos de tiempo. Se tomó muestras de orina en cada hora para posteriormente analizar los electrolitos de sodio y potasio.

2.5.3.1. Determinación de la Densidad:

$$DENSIDAD = \frac{(Peso\ del\ Vaso\ con\ orina) - (Peso\ del\ Vaso\ sin\ orina)}{(Volúmen)}$$

2.5.3.2. Determinación del Volumen Minuto de Orina (VMO):

$$VMO = \frac{Volúmen\ Total\ (ml)\ 24\ horas}{60\ min \times 24\ horas}$$

2.5.3.3. Método para la Determinación de Electrolitos Sodio y Potasio en Orina:

Fundamento:

El método usado es el potenciométrico, que se fundamenta en la medición de un potencial en una celda electroquímica, es el único método electroquímico en el que se mide directamente un potencial de equilibrio termodinámico y en el cual esencialmente no fluye corriente neta. El instrumental necesario para las medidas potenciométricas comprende un electrodo de referencia, un electrodo indicador y un dispositivo de medida de potencial. Un electrodo de ión selectivo es un

sensor que convierte la actividad de un ión específico disuelto en una solución, en un potencial eléctrico que puede ser medido por un voltímetro, los electrodos de ión selectivo que producen una señal de voltaje como una respuesta a un ión disuelto en una solución, el potencial producido es dependiente de las concentraciones de las especies iónicas presentes en la solución.

Procedimiento:

Se midió los electrolitos de sodio y potasio a través del analizador de electrolitos *Easy Lyte Plus Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer*, un sistema automático, en el cual se colocó la muestra en tubos capilares para su medición. Para realizar esta medición se usó previamente, un diluyente de orina *Easy Lyte BPO 344^o*, a la proporción de 1/10 el cual se usó 100 µl de orina y 900 µl de diluyente tomado con micropipetas, luego se programó el equipo seleccionado en la modalidad de análisis de orina y se procedió a medir cada una de las muestras.

Descripción del Analizador de Electrolitos:

El analizador de electrolitos *Easy Lyte Plus Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer*, es un equipo de análisis, controlado por un microprocesador completamente automático para medir sodio, potasio y cloro en suero, plasma, sangre y orina. La duración del análisis de la muestra es de aproximadamente 60 segundos y requieren solo 100 µl de suero, plasma, sangre u orina. Su menú de fácil acceso le permite una gran variedad de opciones con solo presionar “Yes” ó “No” y los resultados son presentados en la pantalla y a la vez impresos en papel. ⁶¹

Partes Externas del Analizador de Electrolitos:

Teclado: constituido por las teclas Si y No, lo que nos permite estar en

contacto con el analizador y que a su vez nos permite realizar todas las funciones del analizador, incluyendo: medida de la muestra, entrada de datos, programación, etc.

Pantalla: es el medio por el cual el analizador se comunica con el operario mediante una pantalla de cuarzo líquido, esta pantalla alfa – numérica de dos líneas permite hasta 18 caracteres por línea y presenta las actividades del analizado, resultados de muestra y otras informaciones programadas.⁶¹

Partes Internas del Analizador de Electrolitos:

Cámara de Medición: consiste en un dispositivo movable de cierre, ubicado en el lado izquierdo, que sostiene a los electrodos, el soporte derecho de los electrodos con el conector del sensor de muestra y la base de la cámara de medición.

Bomba peristáltica: esta se encarga de transportar todos los líquidos dentro del analizador.

Válvula de Soluciones: controlan el movimiento de líquidos dentro del analizador, y controla que los líquidos no se derramen.

Impresor térmico: usa papel sensible a la temperatura, para emitir información en 18 columnas. El analizador imprime valores de medición, de calibración, voltaje de electrodos, así como información de limpieza y mantenimiento, la unidad esta convenientemente configurada para permitir el almacenamiento de un segundo rollo de papel en la misma bandeja.⁶¹

2.6. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR:

2.6.1. Monitoreo Cromatográfico:

Método: Cromatografía de Capa Fina

Fundamento:

La cromatografía de capa fina ó película fina es una técnica cromatográfica utilizada, entre otros posibles usos, para separarlos componentes puros que forman parte de una mezcla. Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel ó gel de sílica). Esta diferencia se traduce en un mayor ó menor desplazamiento ó movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación.^{10, 46}

Procedimiento:

Se procedió a cortar las placas de sílica gel con dimensiones de 10 cm por 3 cm, se marcó con lápiz 1cm de línea sobre la parte inferior y 1cm debajo de la parte superior y delimitándose espacios de 1 cm intercalados para realizar las siembras correspondientes a cada extracto. Luego se procedió a realizar los sembrados correspondientes del extracto en cada placa utilizando capilares para dicha operación, finalmente se colocó las placas ya sembradas en vasos precipitados conteniendo los diferentes solventes para realizar la corrida cromatográfica, estando estos herméticamente cerrados y protegidos de la luz envueltos con papel aluminio para una correcta identificación de componentes, en algunos casos se utilizaron reveladores químicos, y uso de lámpara de luz UV. Finalmente se determinó los valores de Rf para cada componente identificado.

Cálculos:

$$R_f = \frac{\text{Distancia Recorrida por el Compuesto}}{\text{Distancia Recorrida por el Disolvente}}$$

2.6.1.1. Corrida General:

- a) **Preparación de la Fase Móvil:** acetato de etilo, metanol, agua (80:10:10)

Se agregó 8 ml de acetato de etilo en un vaso precipitado, con 1 ml de Metanol y 1 ml de agua respectivamente.

- b) **Preparación de la Fase Estacionaria:**

Se cortó la placa de sílica gel en una lámina de 3 cm por 10 cm (ancho: largo) y se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y lateral al sembrado.

- c) **Preparación de la Muestra:**

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel con cuidado y correcta limpieza.

- d) **Desarrollo:**

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

e) Detección:

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con vainillina (1 % en etanol comercial), ácido sulfúrico concentrado (1 % en etanol comercial), y se calentó en la estufa a 80 °C por 10 minutos, luego se observó la placa en luz UV a 366 nm. Todas estas identificaciones observadas nos permitieron realizar una identificación más aproximada de los posibles componentes presentes en el extracto etanólico.

f) Determinación de Rf:

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de las diferentes sustancias reveladas en las placas cromatográficas.

Taninos (Manchas de color Verde)

Terpenos (Manchas de color Azul)

Saponinas (Manchas de color Rojizas)

2.6.1.2. Identificación de Terpenos:**a) Preparación de la Fase Móvil:** tolueno, acetato de etilo (70:30)

Se agregó 7 ml de tolueno en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 3 ml de acetato de etilo.

b) Preparación de la Fase Estacionaria:

Se cortó la placa de sílica gel en una lámina de 3 cm por 10 cm (ancho: largo) y se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y lateral al sembrado.

c) Preparación de la Muestra:

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel con cuidado y correcta limpieza.

d) Desarrollo:

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

e) Detección:

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con el reactivo de Liebermann Buchard, se calentó en la estufa a 80 °C por 10 minutos, luego se observó las revelaciones.

f) Determinación de Rf:

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de terpenos revelados en las placas cromatográficas.

Terpenos (Manchas de color Azul verdosas).

2.6.1.3. Identificación de Saponinas:**g) Preparación de la Fase Móvil: metanol, agua (90:10).**

Se agregó 9 ml de metanol en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 1 ml de agua.

h) Preparación de la Fase Estacionaria:

Se cortó la placa de sílica gel en una lámina de 3 cm por 10 cm (ancho: largo) y se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y lateral al sembrado.

i) Preparación de la Muestra:

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel con cuidado y correcta limpieza.

j) Desarrollo:

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

k) Detección:

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con el reactivo de Liebermann Buchard, se calentó en la estufa a 80 °C por 10 minutos, luego se observó las revelaciones.

l) Determinación de Rf:

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de saponinas revelados en las placas cromatográficas.

Saponinas (Manchas de color Rosa a Rojo Oscuro)

2.6.1.4. Identificación de Taninos:

a) Preparación de la Fase Móvil: metanol, agua (90:10)

Se agregó 9 ml de metanol en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 1 ml de agua.

b) Preparación de la Fase Estacionaria:

Se cortó la placa de sílica gel en una lámina de 3 cm por 10 cm (ancho: largo) y se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y lateral al sembrado.

c) Preparación de la Muestra:

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel con cuidado y correcta limpieza.

d) Desarrollo:

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

e) Detección:

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con cloruro férrico 1 % en agua (0.25 ml de cloruro férrico en 25 ml de agua), se secó al medio ambiente y se procedió a observar las placas.

f) Determinación de Rf:

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de

terpenos revelados en las placas cromatográficas.

Taninos (Manchas de color Verde)

2.6.1.5. Identificación de Flavonoides:

a) Preparación de la Fase Móvil: acetato de etilo, metanol (90:10)

Se agregó 9 ml de acetato de etilo en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 1 ml metanol.

b) Preparación de la Fase Estacionaria:

Se cortó la placa de sílica gel en una lámina de 3 cm por 10 cm (ancho: largo) y se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y lateral al sembrado.

c) Preparación de la Muestra:

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel con cuidado y correcta limpieza.

d) Desarrollo:

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

e) Detección:

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con cloruro de aluminio 1 % en etanol comercial (0.25 ml de acetato de etilo en 25 ml de Etanol), se secó al medio ambiente y se procedió a observar la placa

en luz UV a 366 nm.

f) Determinación de Rf:

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de terpenos revelados en las placas cromatográficas.

Flavonoides (Manchas de color Azul turquesa).

2.6.1.6. Identificación de Alcaloides:

a) Preparación de la Fase Móvil: acetato de etilo, metanol, hidróxido de amonio (70:29:1)

Se agregó 7 ml de acetato de etilo en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 2.9 ml de metanol y 0.1 ml de hidróxido de amonio.

b) Preparación de la Fase Estacionaria:

Se cortó la placa de sílica gel en una lámina de 3 cm por 10 cm (ancho: largo) y se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y lateral al sembrado.

c) Preparación de la Muestra:

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel con cuidado y correcta limpieza.

d) Desarrollo:

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

e) Detección:

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente y se reveló con Reactivo Dragendorff, se secó al medio ambiente y se observó las manchas reveladas.

f) Determinación de Rf:

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de terpenos revelados en las placas cromatográficas.

Alcaloides (Manchas de color Rojo ó Naranjas)

2.7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS:**2.7.1. Parámetros de Distribución:****2.7.1.1. Media Aritmética (\bar{X}):**

La media aritmética también conocida como promedio se obtiene sumando todos los valores individuales de los elementos divididos por la cantidad de éstos.

$$\bar{X} = \frac{\alpha_i + \dots + \alpha_n}{n}$$

Donde:

\bar{X} = Media aritmética ó promedio

α_i = Correspondiente a cada valor

n = Número de Elementos

2.7.2. Parámetros de Dispersión:

2.7.2.1. Desviación Estándar:

Índice numérico de la dispersión de un conjunto de datos (o población). Mientras mayor es la desviación estándar, mayor es la dispersión de la población. La desviación estándar es un promedio de las desviaciones individuales de cada observación con respecto a la media de una distribución. Así, la desviación estándar mide el grado de dispersión ó variabilidad. En primer lugar, midiendo la diferencia entre cada valor del conjunto de datos y la media del conjunto de datos. Luego, sumando todas estas diferencias individuales para dar el total de todas las diferencias. Por último, dividiendo el resultado por el número total de observaciones para llegar a un promedio de las distancias entre cada observación individual y la media. Este promedio de las distancias es la desviación estándar y de esta manera representa dispersión.

2.7.3. Análisis de Varianza (ANOVA):

El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro ó más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores de otro ó más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones. Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar que factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los grupos que se desean comparar.

2.7.4. Test de Tukey:

Se aplica una vez obtenidos los resultados del análisis de varianza ANOVA, requiere que haya diferencia significativa en ANOVA. Es una prueba de comparación múltiple de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA, no será necesario realizar el Test de Tukey. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuales medias son significativamente diferentes de otras. Muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los pares en comparación indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0 % de confianza. Se identifican los grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0 % de error al decir que uno ó más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.1.PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL:

El trabajo de investigación se inició recolectando las hojas de la especie *Laurus nobilis* L. “Laurel”, provenientes del distrito de Tiabaya – Arequipa, se seleccionaron las hojas en buen estado a los cuales se les realizó un análisis organoléptico, como se indica en la **TABLA N° 3.1**. Luego se procedió a desecar las hojas para obtener una muestra deshidratada con la finalidad de conservar el material vegetal, ya que este será material indispensable para el desarrollo de todo el trabajo de investigación, seguidamente se pulverizó el material vegetal desecado, hasta un polvo fino, el cual fue almacenado en papel craft en sombra, para proteger de la luz y humedad y así conservar sus principios activos, para su posterior uso.

TABLA N° 3.1

Análisis Organoléptico de las Hojas de *Laurus nobilis* L. “Laurel”

CARACTERES ORGANOLÉPTICOS	HOJAS FRESCAS
ASPECTO	Brillante
COLOR	Verde Oscuro
OLOR	Sui generis
SABOR	Dulce amargo

* Fuente: Propia

1.2.DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RESIDUAL:

El porcentaje de humedad de la planta previamente desecada fue hallada por el método gravimétrico, el cual se basa en la diferencia de pesada de la muestra, ver resultados en la **TABLA N° 3.2**

TABLA N° 3.2

Determinación de la Humedad Residual

Muestras de Planta	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	% de Humedad	Prom. % de Humedad
Muestra 1	5.001	0.270	5.40	
Muestra 2	4.955	0.281	5.67	5.41
Muestra 3	5.096	0.263	5.16	

* Fuente: Propia

Como se puede observar la planta desecada, presenta un porcentaje de humedad residual del 5.41 %, límite permitido para la conservación de complejos activos y realización de los respectivos extractos, con el consiguiente análisis de cada uno de ellos.

1.3.DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO A PARTIR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS:

La muestra vegetal seca, conservada y almacenada se procedió a usar para la extracción de sus principios activos, realizándose la extracción por el equipo de Soxhlet, usando solventes de distintas polaridades (etanol, acetato de

etilo, hexano). Se usó el equipo de Rotavapor con el extracto etanólico para la obtención del extracto seco, seguidamente para todos los extractos empleamos el método de evaporación por sequedad hasta agotar la mayor cantidad de solvente y se determinó el porcentaje de rendimiento de extracto seco, resultando el extracto etanólico con mayor porcentaje de rendimiento, ver resultados en la **TABLA N° 3.3**

TABLA N° 3.3

Porcentaje de Rendimiento de Extracto Seco Obtenidos de los Diferentes Extractos de *Laurus nobilis L.* “Laurel”

SOLVENTES USADOS EN LA EXTRACCIÓN	PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE EXTRACTO SECO
Etanol	17.8%
Acetato de Etilo	5.8%
Hexano	3.1%

* Fuente: Propia

1.4.ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN:

1.4.1. Pruebas Piloto: Se realizó dos pruebas piloto.

1.4.1.1.Prueba Piloto I (Elección del Extracto):

La primera prueba piloto se realizó con la finalidad de elegir el extracto que presenta mayor efecto diurético, en el cual se hizo un ensayo

con un total de 12 ratas, divididas en 4 grupos de 3 ratas cada uno, a los tres primeros grupos se les administró los diferentes extractos: etanol, acetato de etilo y hexano respectivamente, a una dosis de 0.0587 g/kg de peso, suspendidos en 5 ml de agua (dosis calculada de acuerdo al vademécum tradicional⁴¹), y al cuarto y último grupo se le administró 5 ml de agua que nos sirvió como control negativo.

A los animales de experimentación se les colocó en jaulas acondicionadas para observar su metabolismo urinario, y se procedió a medir el volumen urinario del día (24 horas) para cada una de las ratas, realizándose la medición de volumen urinario por un periodo de 5 días consecutivos. Obtenidos los resultados, se calculó el promedio y la desviación estándar de los 5 días, para cada grupo de experimentación, observar los resultados en la **TABLA N° 3.4**. También se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA), además del Test de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, observar **GRÁFICA N° 3.1**, lo que nos indica y permite concluir, que el solvente que presentó mayor diuresis fue el extracto etanólico, por lo tanto el etanol será el solvente a utilizar para nuestra etapa de experimentación final.

Al mismo tiempo se realizó la medición del volumen de orina para cada hora, tomándose en cuenta de la cero hora a la octava hora y de la décimo séptima a la vigésimo cuarta hora, con la finalidad de ajustar los intervalos de medición de volumen urinario para la etapa final de experimentación. Obtenidos los resultados se observa que el punto máximo de diuresis en el caso de los tres extractos, se presenta a la primera hora, y a partir de la sexta hora en todos los casos, bajan notablemente los niveles de volumen urinario y se mantienen constantes.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que el efecto del extracto tiene una duración hasta la sexta hora aproximadamente, lo que se puede comprobar en la **GRÁFICA N° 3.2**.

TABLA N° 3.4

Prueba Piloto I: Elección del Extracto

	ETANOL (ml)	ACETATO DE ETILO (ml)	HEXANO (ml)	AGUA (ml)
1^{er} DÍA	7.80	6.70	5.75	4.00
	9.30	7.10	5.30	3.25
	9.20	5.05	4.30	3.85
2^{do} DÍA	10.40	6.75	5.90	4.20
	9.05	7.15	5.20	2.90
	9.10	5.65	5.20	3.65
3^{er} DÍA	10.40	6.30	7.70	4.10
	10.10	7.00	7.20	2.75
	10.60	7.30	5.35	3.45
4^{to} DÍA	11.50	7.80	5.60	3.70
	10.50	8.30	6.10	3.80
	9.20	6.50	5.85	3.60
5^{to} DÍA	12.50	7.30	6.85	3.85
	9.80	7.40	5.95	4.25
	9.20	8.40	5.85	4.10
PROMEDIO	9.91	6.98	5.87	3.70
DESV ST	1.14	0.89	0.85	0.45

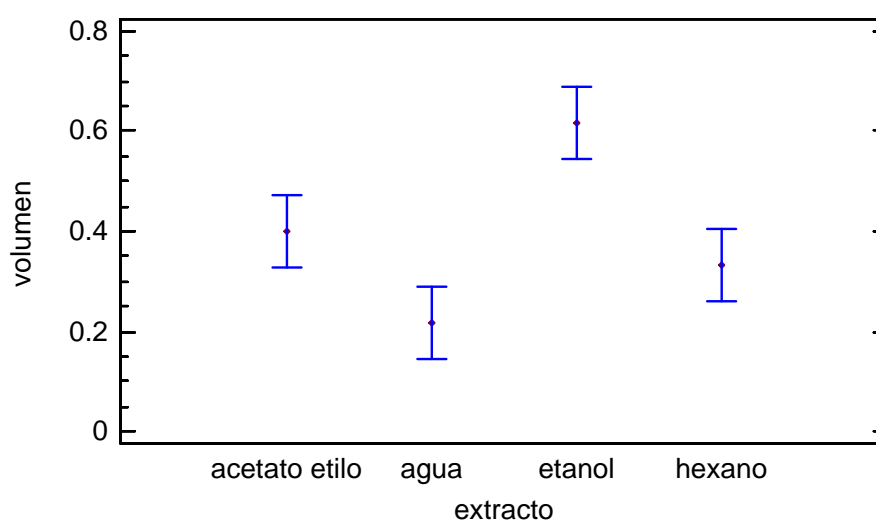
* Fuente: Propia

GRÁFICA N° 3.1

Contraste de Medias de Excreción de Volumen Urinario Frente a los Diferentes

Tipos de Extractos Administrados

Medias y 95.0% de Tukey HSD



Método: Tukey con un Nivel de Confianza del 95 %

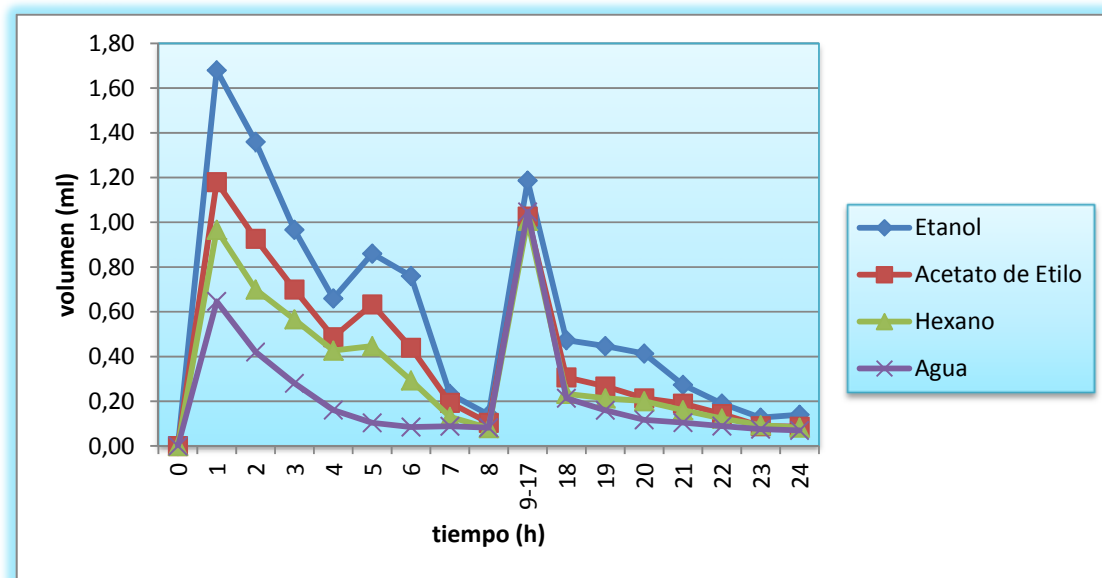
<i>Extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Agua	17	0.215294	0.0382889	X
Hexano	17	0.332353	0.0382889	XX
Acetato de Etilo	17	0.398235	0.0382889	X
Etanol	17	0.617059	0.0382889	X

* Fuente: Propia

GRÁFICA N° 3.2

Medición de la Excreción de Volumen Urinario por Hora, para cada uno de los

Extractos



* Fuente: Propia

1.4.1.2. Prueba Piloto II (Elección de la Dosis del Extracto):

La segunda Prueba Piloto, se realizó con la finalidad de determinar la dosis más adecuada de extracto etanólico seco, que presenta mayor efecto diurético, en el cual se hizo un ensayo con un total de 12 ratas, divididas en 4 grupos de 3 ratas cada uno.

Se calculó para el primer grupo una dosis a partir del vademécum tradicional⁴¹ de 0.0587 g/kg de peso, para el segundo grupo la dosis fue la mitad de esta 0.0294 g/kg de peso, para el tercer grupo la dosis fue el

doble de la primera dosis 0.1174 g/kg de peso, y al cuarto y último grupo se le administró 5 ml de agua que nos sirvió como control negativo. Se les administró a las ratas, cada una de las dosis suspendidas en un volumen de 5 ml. Inmediatamente se las colocó en jaulas metabólicas adaptadas para observar su metabolismo urinario.

Se midió el volumen urinario del día (24 horas) para cada una de las ratas, realizándose la medición de volumen urinario por un periodo de 5 días consecutivos.

Obtenidos los resultados, se calculó el promedio y la desviación estándar de los 5 días, para cada grupo de experimentación, ver los resultados en la **TABLA N° 3.5**. También se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) además del Test de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, observar en la **GRÁFICA N° 3.3**, lo que nos permite concluir que la dosis de 0.0587 g/kg de peso fue la dosis que presentó mayor efecto diurético, por lo tanto esta dosis será utilizada para nuestra etapa final de experimentación.

Al mismo tiempo se realizó la medición del volumen urinario en cada hora, tomándose en cuenta los mismos parámetros de tiempo empleados para la primera prueba piloto. Con la finalidad de ajustar los intervalos de medición de volumen urinario para la etapa final de experimentación. Obtenidos los resultados se puede concluir que de la primera a la sexta hora existe un incremento y variación de volumen urinario y de la sexta hora en adelante se mantiene un volumen urinario constante. Observe los resultados en la **GRÁFICA N° 3.4**.

TABLA N° 3.5

Prueba Piloto II: Elección de la Dosis del Extracto

	DOSIS 0.0587	DOSIS 0.0294	DOSIS 0.1174	AGUA
	g/Kg	g/Kg	g/Kg	(ml)
1^{er} DÍA	9.20	4.00	3.50	3.75
	9.60	3.90	3.20	4.65
	10.60	3.85	2.80	3.50
2^{do} DÍA	8.60	4.70	3.45	3.10
	8.50	4.35	2.70	4.95
	11.80	3.95	2.70	3.85
3^{er} DÍA	8.80	5.85	3.40	4.45
	9.70	5.25	3.40	3.55
	8.70	4.80	3.65	4.40
4^{to} DÍA	9.80	5.40	3.55	4.30
	7.60	4.95	4.15	4.10
	11.50	5.95	3.50	4.20
5^{to} DÍA	8.55	4.50	2.85	4.20
	10.00	3.45	4.15	2.80
	9.30	4.15	3.80	4.10
PROMEDIO	9.48	4.60	3.39	3.99
DESV ST	1.15	0.76	0.47	0.58

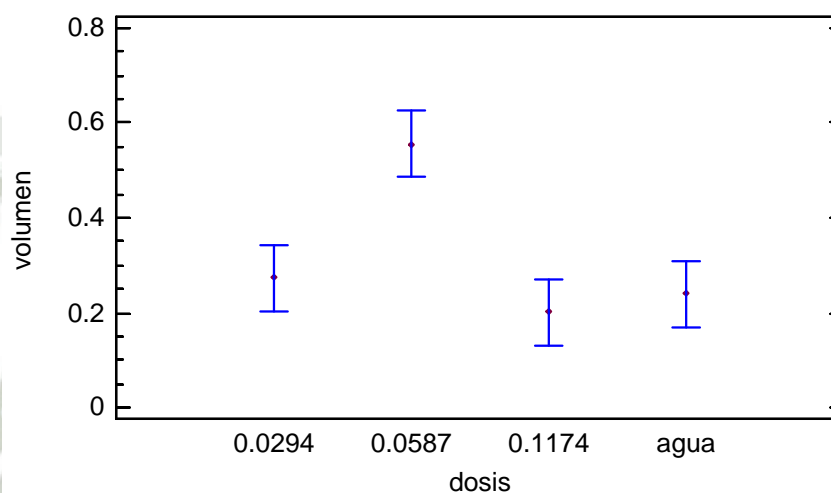
* Fuente: Propia

GRÁFICA N° 3.3

Contraste de Medias de Extracción de Volumen Urinario Frente a las Diferentes Dosis

de Extracto Administradas

Medias y 95.0% de Tukey HSD



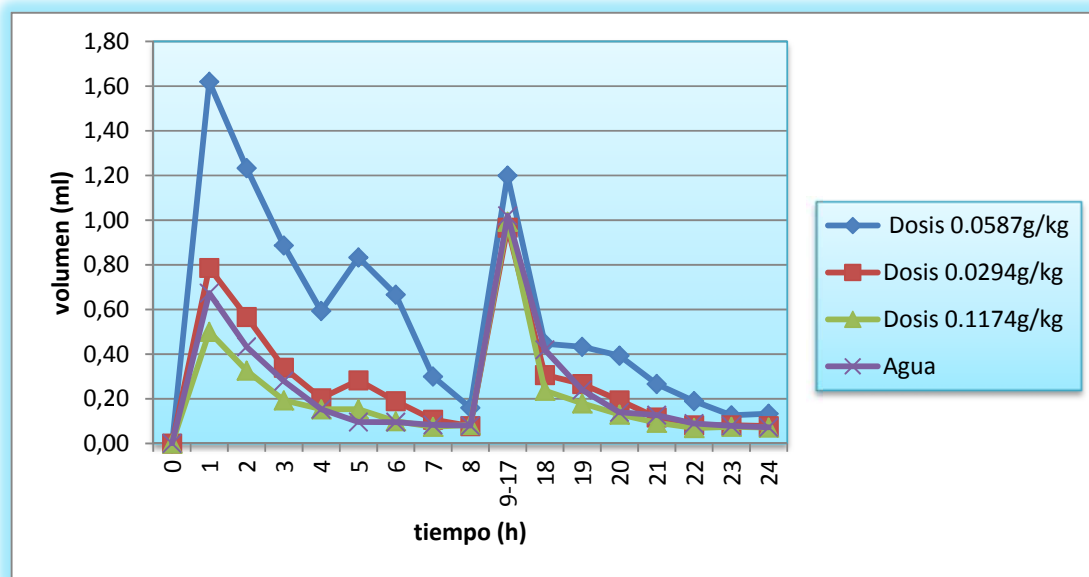
Método: Tukey con un Nivel de Confianza del 95 %

<i>Dosis</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0.1174	17	0.205882	0.0475906	X
agua	17	0.267059	0.0475906	X
0.0294	17	0.272941	0.0475906	X
0.0587	17	0.604118	0.0475906	X

* Fuente: Propia

GRÁFICA N° 3.4

Medición de la Excreción de Volumen Urinario por Hora, para cada una de las
Dosis



* Fuente: Propia

1.4.2. Etapa Final de la Experimentación:

Con los resultados obtenidos de nuestras pruebas piloto, llegamos a la conclusión que el extracto a usar será el extracto etanólico seco, y la dosis para la administración del extracto seco será 0.0587 g/kg de peso. También se ajustaron los intervalos de medición de volumen urinario, los cuales serán: de la cero hora a la sexta hora y de la décimo octava a la vigésimo cuarta hora, ya que la mayor excreción de volumen urinario en los intervalos de las pruebas piloto, solo se presentaron de la primera hasta la sexta hora y no hasta la octava hora, es por eso que se ajustó el rango de medición para esta etapa de experimentación final.

En esta etapa, se utilizaron 18 ratas divididas en 3 grupos de 6 ratas cada una, donde se administró a cada grupo de ratas diferentes tratamientos suspendidos en un volumen de 5 ml de agua destilada:

PRIMER GRUPO (Tratamiento: Hidroclorotiazida a dosis de 0.002 g/kg)

SEGUNDO GRUPO (Tratamiento: Extracto Etanólico a dosis de 0.0587 g/kg)

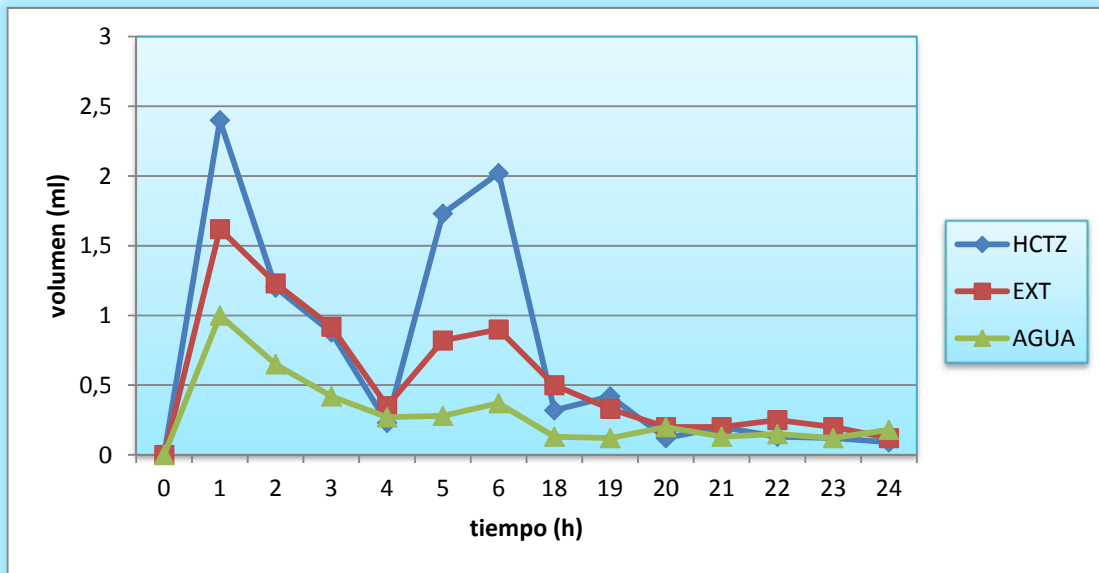
TERCER GRUPO (Tratamiento: Agua)

Después de la administración de los distintos tratamientos se colocó a cada una de las ratas en jaulas previamente adaptadas para observar el metabolismo urinario, y se realizó la medición de volumen urinario expresada en ml. Se obtuvieron los resultados, los cuales se observan en la **GRÁFICA N° 3.5**, observándose que tanto la Hidroclorotiazida (HCTZ) como el extracto presentan un similar comportamiento en cuanto a su excreción urinaria, presentando su pico máximo de efecto en la primera hora para ambos tratamientos y una duración de efecto aproximadamente hasta la sexta hora.

Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) y además de la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, lo que nos permitió hacer un contraste y ver si existe ó no diferencia significativa estadística entre los distintos tratamientos, se concluye que no existe diferencia significativa entre la Hidroclorotiazida (HCTZ) y el extracto etanólico en relación al volumen urinario excretado, pero sí existe diferencia significativa entre estos y el agua, por lo tanto el extracto etanólico de *Laurus nobilis L.* “Laurel” sí posee efecto diurético. Ver resultados en la **GRÁFICA N° 3.6**.

GRÁFICA N° 3.5

Excreción de Volumen Urinario por Hora, para cada Tratamiento



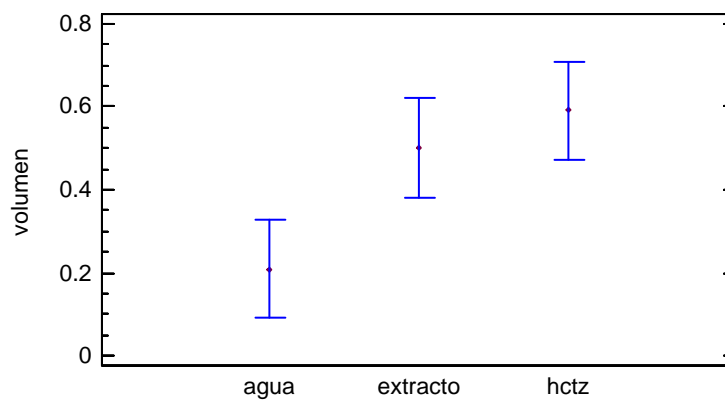
* Fuente: Propia

GRÁFICA N° 3.6

Contraste de Medias de la Excreción de Volumen Urinario

Para cada Tratamiento

Medias y 95.0% de Tukey HSD



Método: Tukey con un Nivel de Confianza del 95 %

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Agua	14	0.21	0.0670574	X
Extracto	14	0.500714	0.0670574	X
HCTZ	14	0.590714	0.0670574	X

* Fuente: Propia

También se realizó la medición de la excreción de electrolitos de sodio y potasio, así mismo se determinó el VMO (Volumen Minuto de Orina) y las densidades de cada una de las muestras.

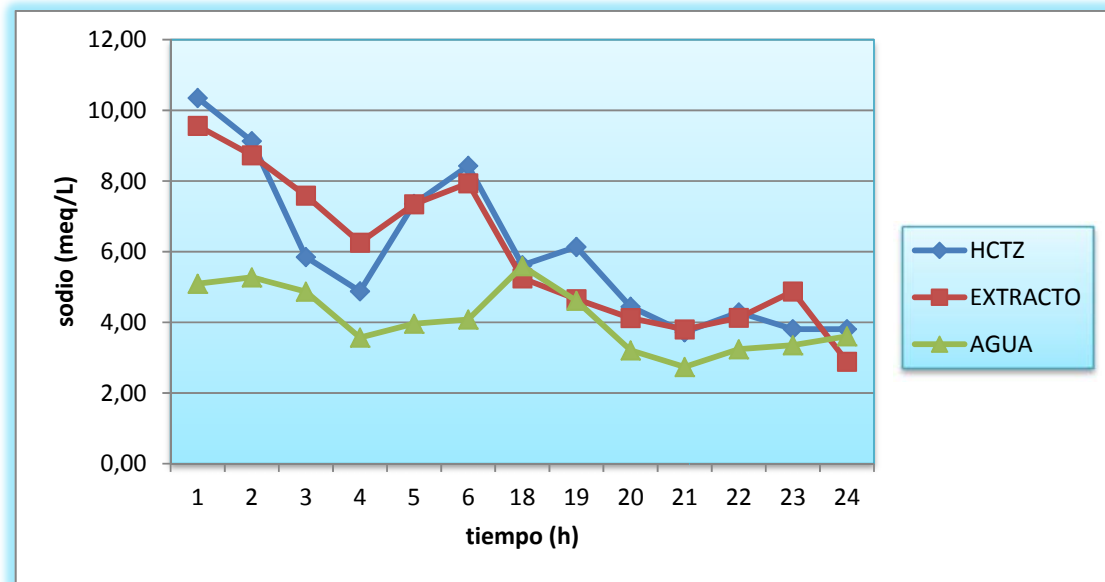
En la **GRÁFICA N° 3.7**, podemos observar la excreción de electrolitos de sodio por hora, para cada uno de los tratamientos, en las que tanto para la hidroclorotiazida (HCTZ) como para el extracto etanólico, se produce la mayor excreción de sodio en la primera hora, lo que nos permite concluir que el máximo efecto diurético se produce en la primera hora.

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos se realizó el análisis estadístico de varianza (ANOVA) y el Test de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

Observando en la **GRÁFICA N° 3.8** que no existe diferencia significativa estadística entre la hidroclorotiazida (HCTZ) y nuestro extracto etanólico, pero si hay diferencia significativa estadística entre estos y el grupo agua, por lo tanto se puede determinar que el extracto etanólico y la hidroclorotiazida (HCTZ), actúan como diuréticos natriuréticos.

GRÁFICA N° 3.7

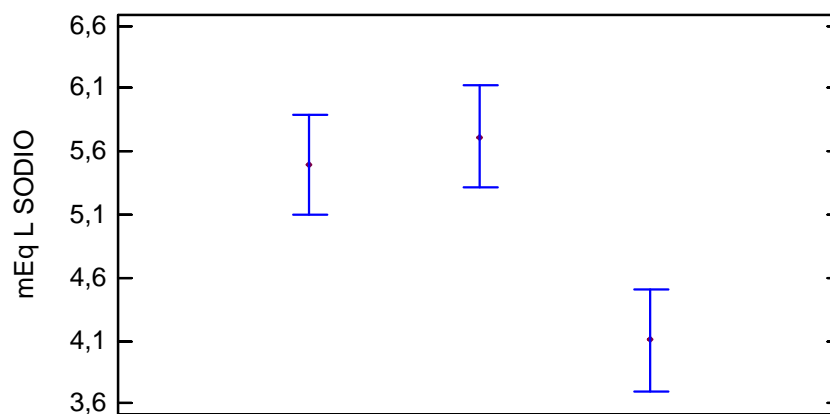
Excreción de los Electrolitos de Sodio en Orina para los Distintos Tratamientos



GRÁFICA N° 3.8

**Contraste de Medias de la Excreción de los Electrolitos
Sodio en Orina para cada Tratamiento**

Medias y 95,0% de Tukey HSD



Método: Tukey con un Nivel de Confianza del 95 %

<i>Grupo Sodio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Agua	78	4.102	0.2408	X
HCTZ	78	5.5	0.2368	X
Extracto	78	5.717	0.2408	X

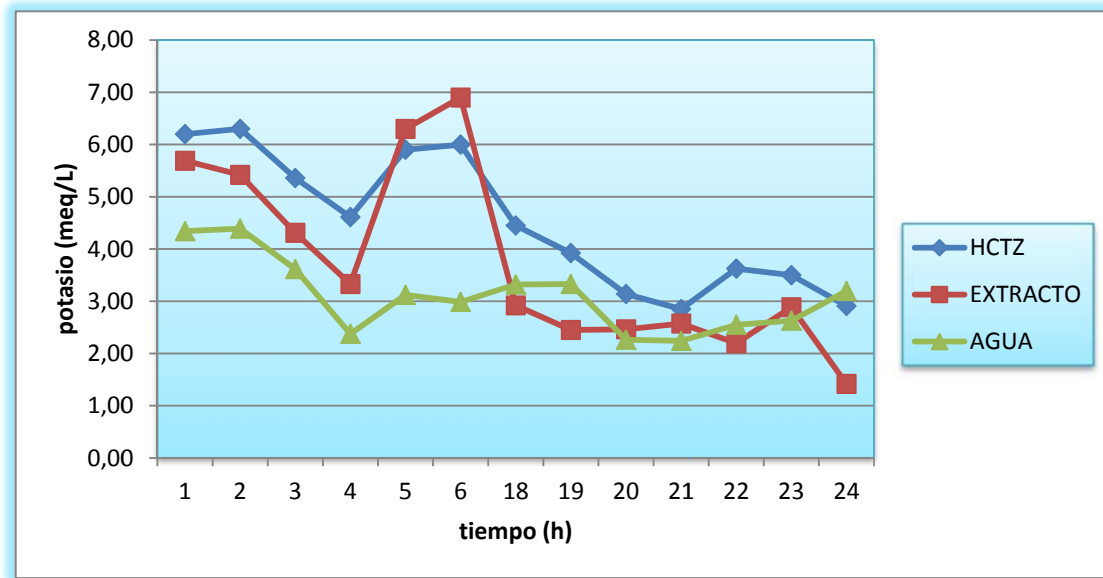
* Fuente: Propia

En la **GRÁFICA N° 3.9** se observa la excreción por hora de los electrolitos de potasio para cada uno de los tratamientos, resultando que la mayor excreción de potasio para el caso de la hidroclorotiazida (HCTZ) se presenta en la segunda hora, mientras que para el extracto la mayor excreción de potasio se presenta en la sexta hora, sin embargo al observar las curvas se muestra que existe un comportamiento similar para la Hidroclorotiazida (HCTZ) y el extracto etanólico, siendo estos notablemente mayores las seis primeras horas en comparación con el grupo agua, y en las seis últimas horas, las tres curvas se muestran similares y con valores constantes.

En la **GRÁFICA N° 3.10** se realizó el análisis estadístico de varianza (ANOVA), y el contraste respectivo por el Test de Tukey, la que nos indica que no existe diferencia significativa estadística entre la Hidroclorotiazida (HCTZ) y el extracto etanólico, pero si hay diferencia significativa estadística entre estos y el grupo agua, por lo tanto el extracto también es kaliurético.

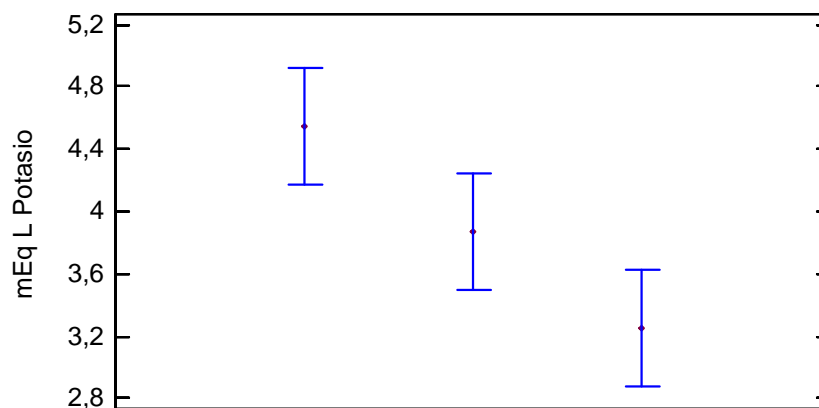
GRÁFICA N° 3.9

**Excreción de los Electrolitos de Potasio en Orina para cada
Tratamiento**



GRÁFICA N° 3.10

**Contraste de Medias de la Excreción de los Electrolitos
Potasio para cada Tratamiento**
Medias y 95,0% de Tukey HSD



Método: Tukey con un Nivel de Confianza del 95 %

<i>Grupo Potasio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Agua	78	3.251	0.2266	X
Extracto	78	3.869	0.2266	XX
HCTZ	78	4.549	0.2228	XX

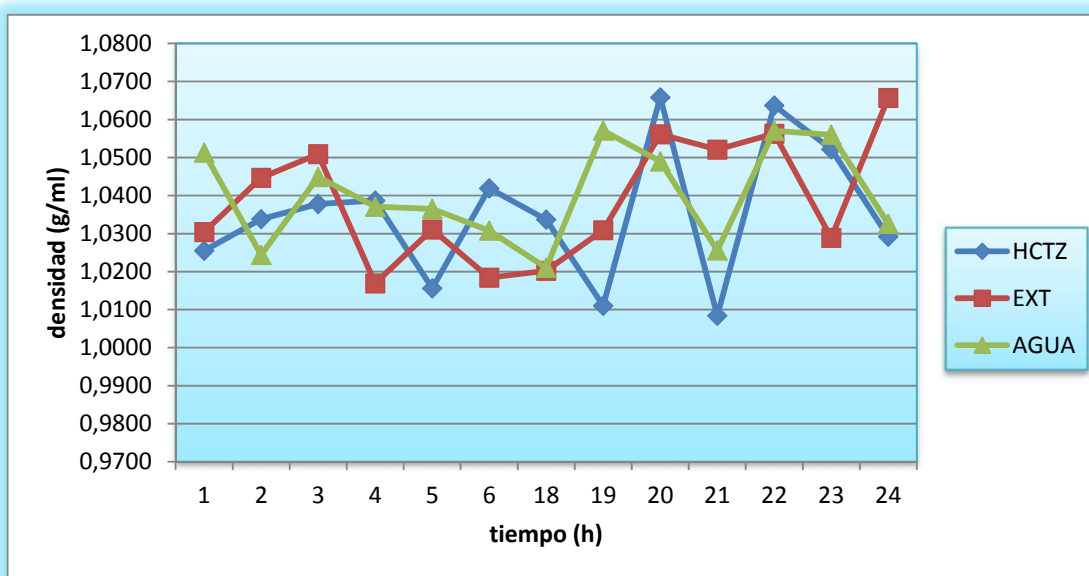
* Fuente: Propia

Se determinó la densidad en cada hora como se muestra en la **GRÁFICA N° 3.11**, en la que se puede observar un comportamiento similar para los tres tratamientos, incrementándose los valores de densidad, a medida que transcurre el tiempo, lo que nos permite deducir que al transcurrir el tiempo se van eliminando diferentes componentes en la orina que hace que incremente su densidad, esto puede ser debido a la alimentación de los animales de experimentación.

Sin embargo los valores de densidad en orina se encuentran dentro del rango de valores normales, tomando como referencia los valores de densidad de las ratas que se les administró solo agua, por lo tanto al determinar la densidad de orina de los animales se puede concluir que el extracto no provoque alguna fisiopatología renal en los animales de experimentación, ya que no existe una alteración en la densidad, sin embargo esto puede ser objeto de un estudio posterior.

GRÁFICA N° 3.11

Valores de Densidad para cada Tratamiento



* Fuente: Propia

1.1.ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR:

1.1.1. Monitoreo Cromatográfico:

Se realizó un estudio fitoquímico preliminar, usando como técnica la cromatografía de capa fina, con la finalidad de identificar algunos de los principales metabolitos secundarios que serían los posibles responsables del efecto diurético, para lo cual primero se realizó una corrida general, en la que se puede observar en la placa de la **FIGURA N° 3.1**, revelaciones de manchas de color, verdes a simple vista y manchas anaranjadas rojizas observadas al UV a

366 nm. También se calculó los valores de R_f entre 0.63 y 0.75, por lo tanto posiblemente las sustancias identificadas pertenezcan a taninos y saponinas.

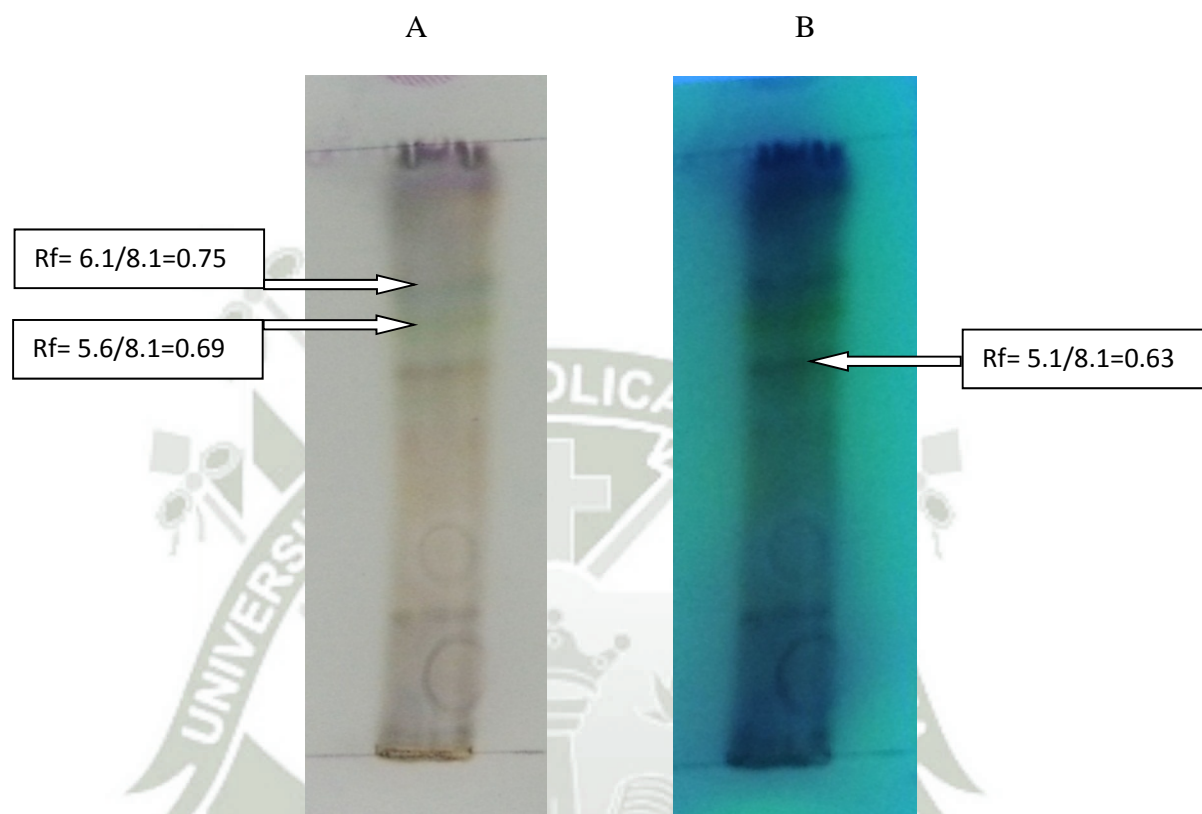


FIGURA N° 3.1: Corrida General mediante el Patrón Cromatográfico en CCF de *Laurus nobilis* L. “Laurel” a) simple vista, b) mancha fluorescente a la luz UV a 366 nm

Fase Móvil: Acetato de Etilo – Metanol – Agua (80:10:10)

Revelador: Vainillina – Ácido Sulfúrico

R_f : 0.63, 0.69 y 0.75

Fuente: Elaboración Propia

En la **FIGURA N° 3.2** podemos observar que la placa revelada, muestra manchas de color azul violeta, y también se determinó su R_f de las manchas identificadas, encontrándose un valor de 0.87, por lo tanto se concluye que son revelaciones características de Terpenos.

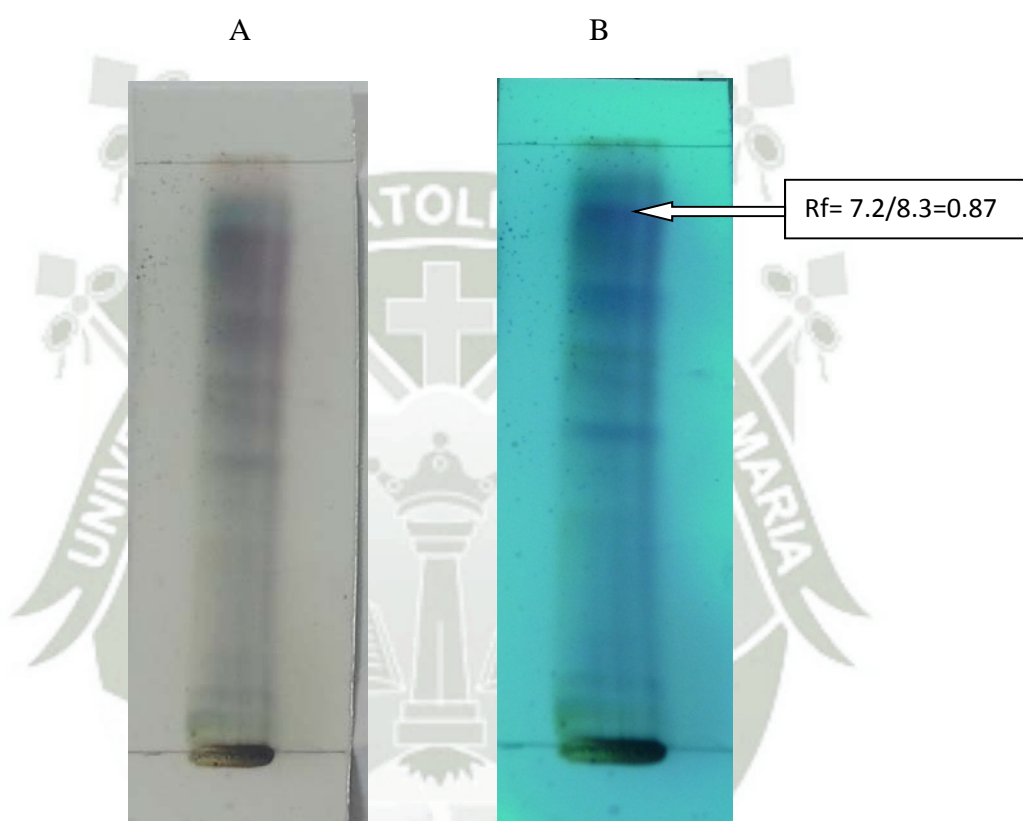


FIGURA N° 3.2: Identificación de Terpenos mediante el Patrón Cromatográfico en CCF de *Laurus nobilis L.* “Laurel” a) simple vista, b) mancha fluorescente a la luz UV a 366 nm

Fase Móvil: Tolueno – Acetato de Etilo (70:30)

Revelador: Reactivo de Liebermann Burchard

R_f : 0.87

Fuente: Elaboración Propia

En la **FIGURA N° 3.3** podemos observar que la placa revelada, muestra manchas de color anaranjadas rojizas, y también se determinó el R_f de dichas manchas identificadas, encontrándose un valor de 0.94, por lo tanto se concluye que son revelaciones características de Saponinas.

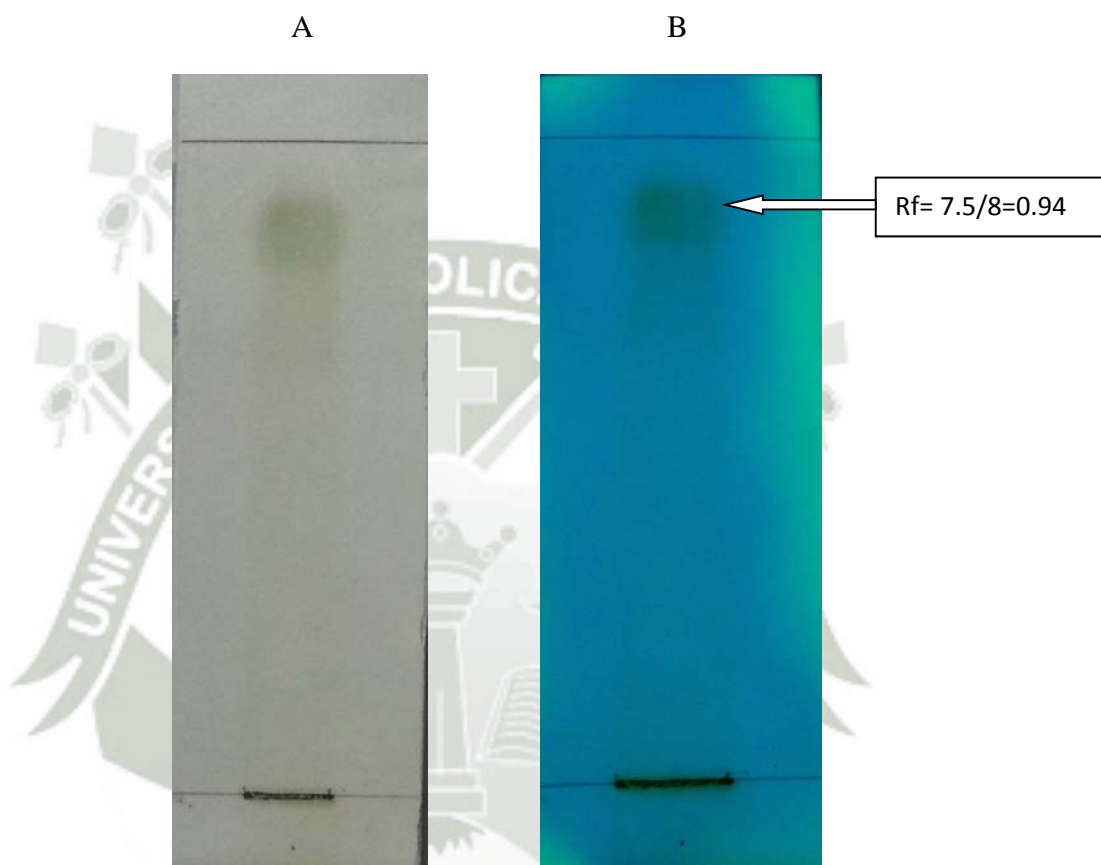


FIGURA N° 3.3: Identificación de Saponinas mediante el Patrón Cromatográfico en CCF de *Laurus nobilis* L. “Laurel”. a) simple vista, b) mancha fluorescente a la luz UV a 366 nm

Fase Móvil: Metanol – Agua (90:10)

Revelador: Reactivo de Liebermann Burchard

R_f : 0.94

Fuente: Elaboración Propia

En la **FIGURA N° 3.4** podemos observar que la placa revelada, muestra manchas de color verdes, y también se determinó los R_f de las manchas identificadas, encontrándose valores entre 0.82, por lo tanto se concluye que son revelaciones de Taninos.

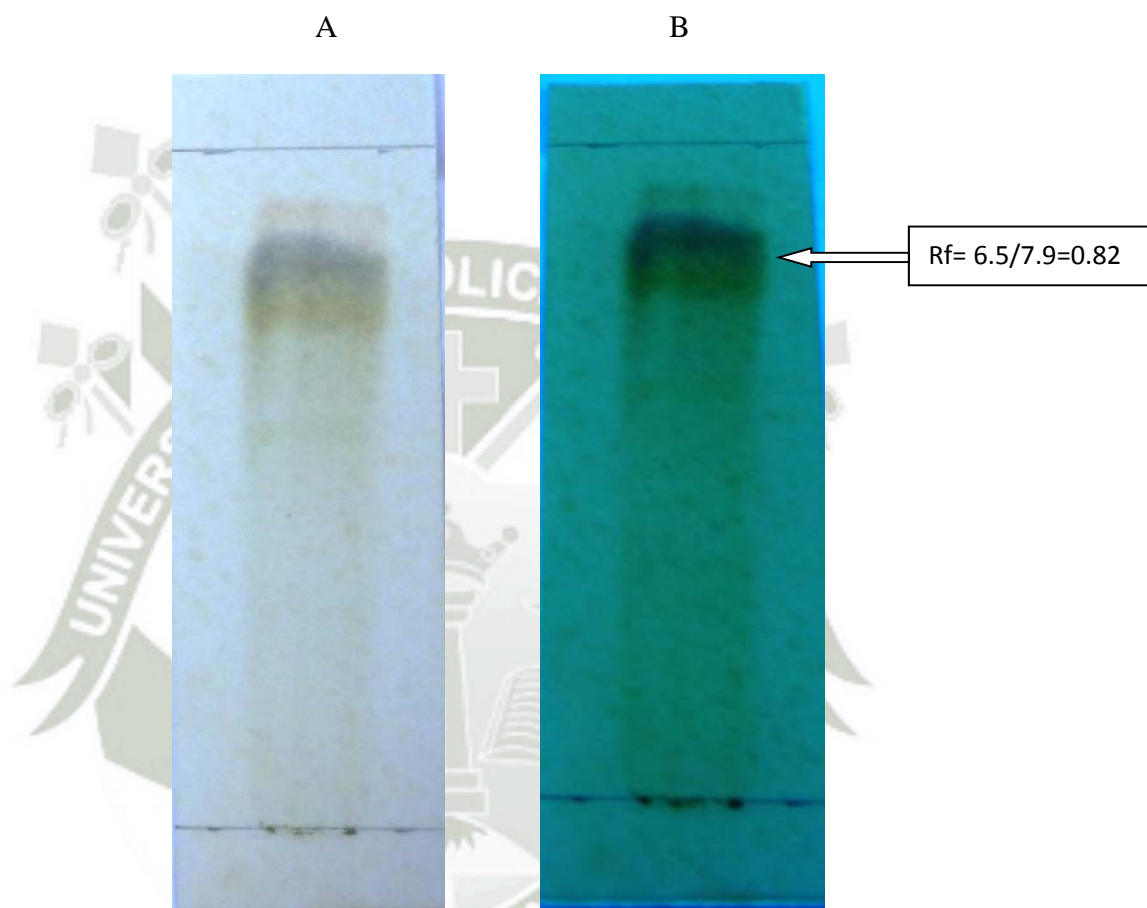


FIGURA N° 3.4: Identificación de Taninos mediante el Patrón Cromatográfico en CCF de *Laurus nobilis L.* “Laurel”. a) simple vista, b) mancha fluorescente a la luz UV a 366 nm

Fase Móvil: Metanol – Agua (90:10)

Revelador: Cloruro Férrico 1 %

R_f : 0.82

Fuente: Elaboración Propia

En la **FIGURA N° 3.5** podemos observar que la placa revelada, muestra manchas de color turquesa, y también se determinó los R_f de las manchas identificadas, encontrándose valores entre 0.87, por lo tanto se concluye que son revelaciones de Flavonoides.

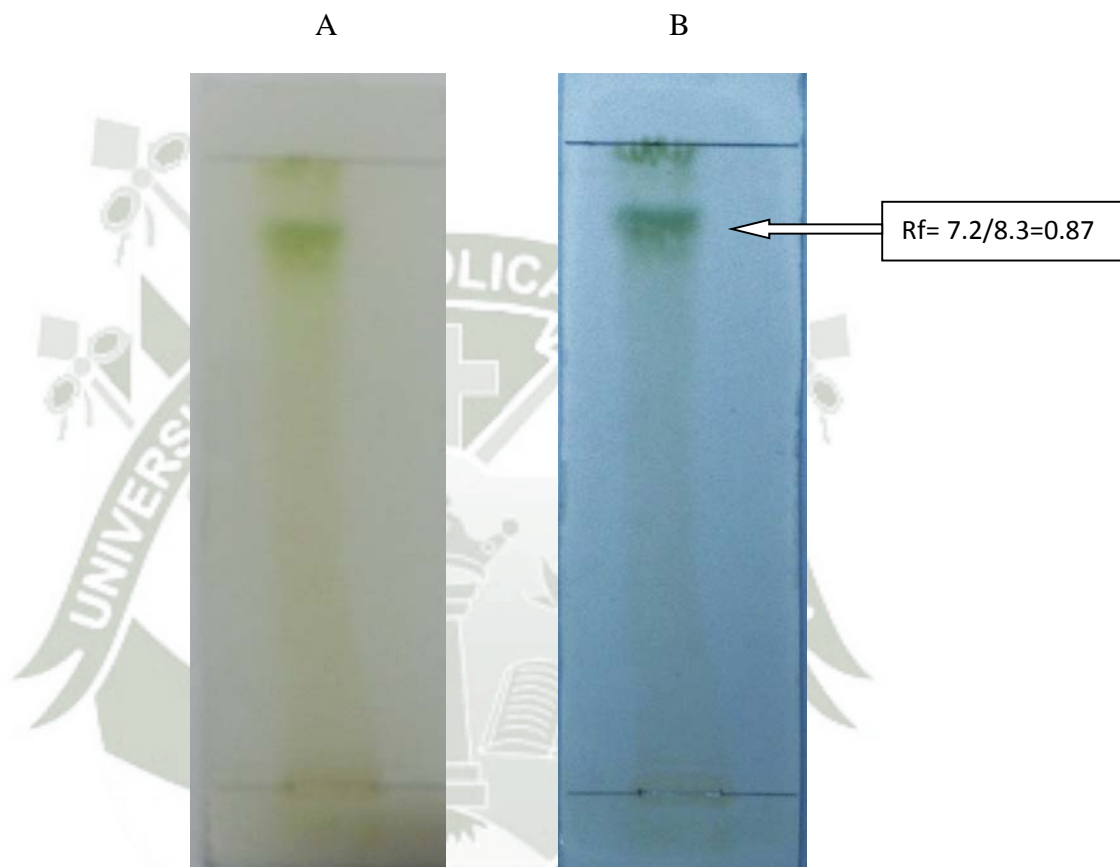


FIGURA N° 3.5: Identificación de Flavonoides mediante el Patrón Cromatográfico en CCF de *Laurus nobilis L.* “Laurel”. a) simple vista, b) mancha fluorescente a la luz UV a 366 nm

Fase Móvil: Acetato de Etilo – Metanol (90:10)

Revelador: Cloruro de Aluminio 1 %

R_f : 0.87

Fuente: Elaboración Propia

En la **FIGURA N° 3.6** podemos observar que la placa revelada, muestra una mancha de color rojo ladrillo oscuro, y también se determinó el R_f de la mancha identificada, encontrándose un valor de 0.85, por lo tanto se concluye que es una revelación característica de Alcaloides.

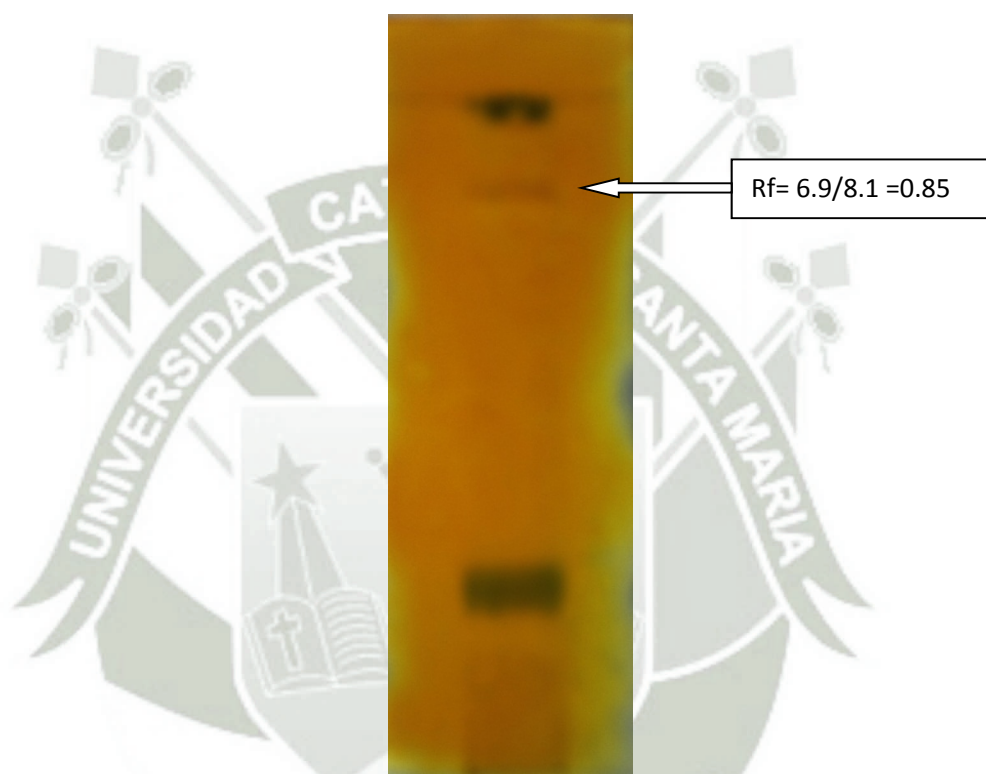


FIGURA N° 3.6: Identificación de Alcaloides mediante el Patrón Cromatográfico en CCF de *Laurus nobilis L.* “Laurel”

Fase Móvil: Acetato de Etilo – Metanol – Hidróxido de Amonio (70:29:1)

Revelador: Reactivo Dragendorff R_f : 0.85

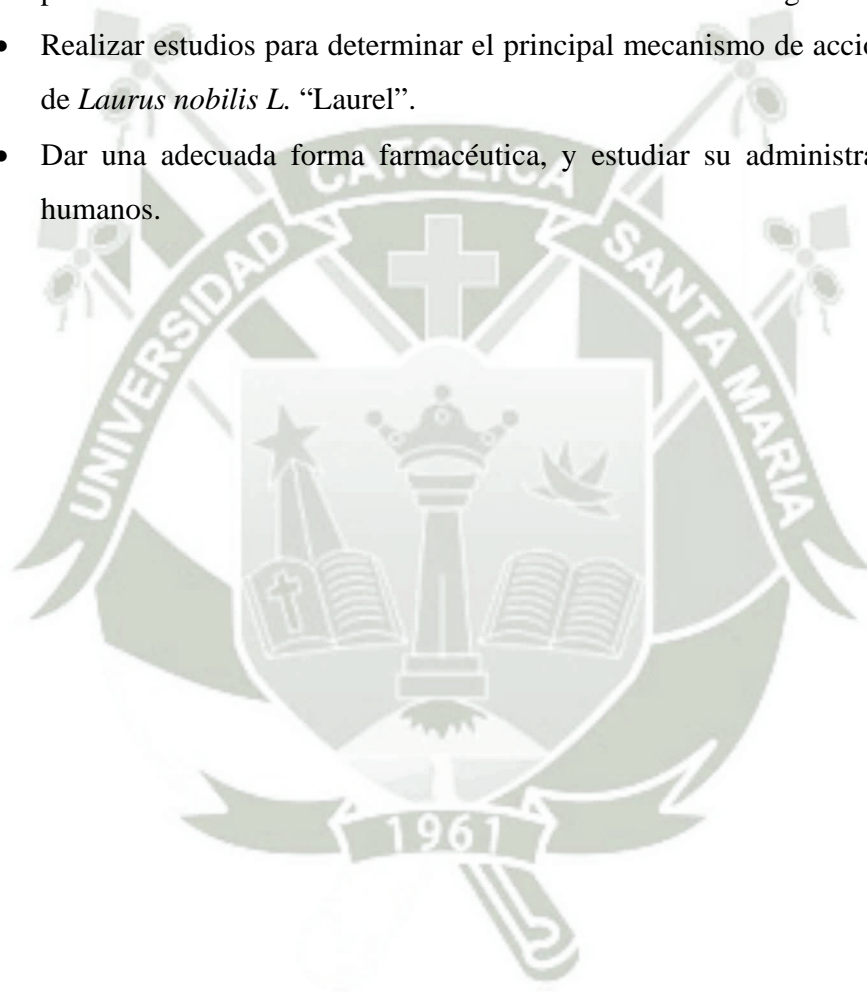
Fuente: Elaboración Propia

CONCLUSIONES

- Se preparó un extracto etanólico, un extracto con acetato de etilo, y por ultimo un extracto con hexano para *Laurus nobilis L.* “Laurel”.
- El extracto etanólico seco a la dosis de 0.0587 g/kg de peso tuvo efecto diurético y es natriurético y kaliurético.
- Al comparar el extracto etanólico seco a dosis de 0.0587 g/kg de peso con la hidroclorotiazida a dosis de 0.002 g/kg de peso; no se observó estadísticamente diferencia significativa.
- El estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico seco de las hojas de *Laurus nobilis L.* “Laurel” posee metabolitos secundarios tales como: terpenos, taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una investigación más profunda sobre los posibles efectos adversos y determinar la dosis tóxica del *Laurus nobilis L.* “Laurel”.
- Realizar un estudio, sobre las posibles alteraciones patológicas que pueda producir el extracto de *Laurus nobilis L.* “Laurel” en fisiología renal de las ratas.
- Realizar estudios para determinar el principal mecanismo de acción del extracto de *Laurus nobilis L.* “Laurel”.
- Dar una adecuada forma farmacéutica, y estudiar su administración en seres humanos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTHONY, CATHERINE PARKER; Anatomía y Fisiología (México; Interamericana; 1974).
2. ASCUETA, LEONARDO; THUDEO, ELYSANGELA; Compendio Ilustrado de Fisiología Renal (Brasil; Ordoñez; 1998).
3. BERDONCES JOSE LUIS; Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales (España; Editorial Océano; 2010).
4. BERNÉ YELITZA, CARÍAS DIAMELA, CIOCCIA ANNA M., GONZÁLEZ EDUARDO, HEVIA PATRICIO. Effect of the diuretic furosemide on urinary essential nutrient loss and on body stores in growing rats. ALAN [revista en la Internet]. 2005 Jun [citado 2012 Jul 06] ; 55(2): 154-160.
5. BLOMBERG, P. S.; Fitoterapia Renal (Brasil; Editorial Amazonas; 1996).
6. BOGNER, PHYLLIS HOLT; Handbook of Pharmacologic Therapeutics (Boston; Little, Brown and Company; 1998).
7. BRACK EGG, ANTONIO; Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú (Cusco; Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas; 1999).
8. BRUNETON, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, (Intercept Ltd, Andover, Hampshire, England, 1995).
9. BRUNETON JEAN; Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia (Zaragoza; Editorial Acribia; 1991).
10. CAIRO MARTÍNEZ MERCEDES, VICTORIO FRESNEDA MARITZA, CAMPOS MARTÍNEZ DAISY. Determinación del efecto diurético de Cymbopogon citratus (DC) Stapf (caña santa). Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet]. 1996 Dic [citado 2012 Ago 18] ; 1(3): 13-17.
11. CORTEZ, RUBEN DARIO; Técnicas de Separación Cromatográfica (Barquisimeto Lara 301; Sección de la red Latinoamericana de Química; 1998).
12. CRAMER, F.; Paper Chromatography 2da Edición (Londres, Editorial Mc Millan, 1954).

13. DAUD THOENE ADRIANA, HABIB INTERSIMONE NATALIA, SÁNCHEZ RIERA ALICIA. Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2007 Dic [citado 2012 Jun 09] ; 12(4).
14. DAVIS M. E.; *Therapy Progress and Prospect* (Inglaterra; Ed. Lancefield; 1992).
15. DELUCCHI GUSTAVO, FARINA EDUARDO, TORRES ROBLES SILVIA. *Laurus nobilis* (Lauraceae) especie naturalizada en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* [revista en la Internet]. 2007 Dic [citado 2012 Nov 05].
16. DEWICK, P. M; *Medicinal Natural Products* (Ed Jhon Wiley and Sons; 1997).
17. DOMINGUEZ XORGE ALEJANDRO; *Métodos de Investigación Fitoquímica* (México; Centro Reg. De Ayuda Técnica; 1973).
18. DUKE, A. J. *Handbook of Medicinal Herbs.* (CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida, 1985).
19. FERNANDEZ CUESTA, J.; *Guías Practicas Plantas Medicinales* (Barcelona; Omega; 1994).
20. GALLEGOS, G.; *Estadística Aplicada* (Arequipa, Ediciones Lumen, 1ra Edición, 1994).
21. GIRON L. M., FREIRE V., ALONZO A.; *Ethnobotanical Survey of the Medicinal Flora* (Guatemala; Ed. Lusher; 1997).
22. GOODMAN GILMANS A.; *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (México; Mc Graw Hill Interamericana; 2000).
23. GRAF SISTER LAURINE; *Análisis de Orina* (Ilus Color; 1998).
24. HABIB INTERSIMONE NATALIA, DAUD THOENE ADRIANA, SÁNCHEZ RIERA ALICIA. Efecto diurético de extractos acuosos y alcohólicos de flores de *Phrygilanthus acutifolius* (corpo) en ratas. *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2005 Dic [citado 2012 Ago 18] ; 10(3-4).
25. HARBORNE, J. B.; *Phytochemical Methods* (Ed. Chapman and Hall; 1973).
26. HOFFMANN, A., FARGA, C., LASTRA, J. y VEGHAZI, E., *Plantas Medicinales de Uso Común en Chile.* (Fundación Claudio Gay, Santiago, 1992).

27. ISEA FERNÁNDEZ GERARDO ALBERTO, RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ ILSÉN EMÉRITA, GIL ARAUJO MARCELO ANTONIO, SÁNCHEZ CAMARILLO EGAR ENRIQUE. Efecto diurético del extracto acuoso de pericarpio de melón (*Cucumis melo* L. variedad *reticulatus* Naud) en ratas. *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2008 Jun [citado 2012 Jul 05]; 13(2).
28. JIMÉNEZ NIEVES LESLY, LEÓN PADILLA MARÍA DEL CARMEN, HERRERA RODRÍGUEZ REINALDO, GARCÍA SIMÓN GASTÓN, CADENAS FREIXAS JOSÉ LUIS. Efecto diurético del *Xanthium strumarium* L. (guizajo de caballo). *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 1999 Abr [citado 2012 Jul 06]; 4(1): 22-25.
29. KATZUNG BERTRAM G.; *Farmacología Básica y Clínica* 5ta Edición (México; Editorial Manuel Moderno; 1996).
30. KUKLINSKI, Claudia; *Farmacognosia Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural* (Barcelona; Omega; 2000).
31. LITTER MANUEL; *Compendio de Farmacología* 4ta Edición (Buenos Aires; El Ateneo; 1992).
32. LITTER MANUEL; *Farmacología Experimental y Clínica* (Buenos Aires; El Ateneo; 1973).
33. LOEBL, SUZANNE; SPRATTOS GEORGE; *Manual de Farmacología* (México; Limusa; 1998).
34. LOCK DE UGAZ, OLGA; *Investigación Fitoquímica* (Lima; P.U.C.P.; 1988).
35. MARIEB, ELAINE N.; *Anatomía y Fisiología Humana* (Madrid; Pearson Educación; 2008).
36. MARTINEZ RAMIREZ, EFRAIN; *Estadística* (Arequipa; 1993).
37. MONSALVE CECILIA, CARÍAS DIAMELA, CIOCCIA ANNA MARÍA, HEVIA PATRICIO. Efecto de un incremento en la diuresis sobre la absorción y retención de algunos nutrientes en ratas. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [revista en la Internet]. 2007 Mar [citado 2012 Ago 10]; 41(1): 67-76.

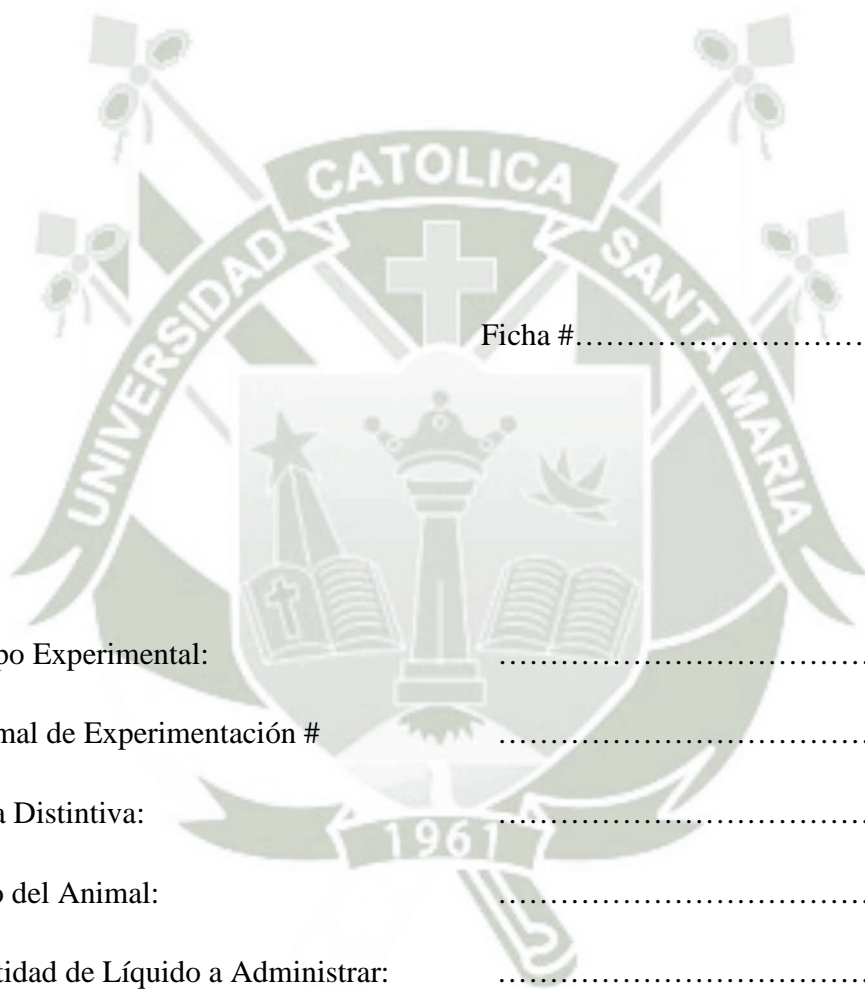
38. MUÑOZ V., ALBERTO; Salud con plantas Medicinales, Su Utilización Práctica; (Bogotá; Ecol; 2002).
39. ORLANDO MUÑOZ, MARCO MONTES, TATIANA WILKOMIRSKY, Plantas Medicinales de uso en Chile Química y Farmacología (Chile, Editorial Universitaria, 1999).
40. PAMPLONA ROGER, J.D.; Enciclopedia de las Plantas Medicinales (Madrid, Editorial Sanfeliz, 1995).
41. PERIS, J.B. STUBING, G.; VANACLOCHA; B; Fitoterapia Aplicada (Valencia; Colegio Oficial de Farmacéuticos de Valencia; 1995).
42. PRAKASH, V. Leafy Spices. (CRC Press Inc. Boca Ratón, Ann Arbor Boston, 1990).
43. R. DE A. RIVIRO, M.M.R: FUIZA DE MELO, F. DE BARROS, C. GOMES Y G. TROLIN; Acute Antihypertensive Effect in Concious Rats Produced by Some Medicinal Plants Used in the State (Sao Paulo).
44. RAMÍREZ JORGE HERNÁN, PALACIOS MAURICIO, GUTIÉRREZ OSCAR. Efecto diurético de la especie *Salvia scutellarioides* en ratas. *Biomédica* [serial on the Internet]. 2006 Mar [cited 2012 Jun 06] ; 26(1): 145-149.
45. RANDEATH, K.; *Thin Layer Chromatography* 2da Edicion (Editorial Academic Press, 1966).
46. ROBERT BERKOW; MARCK H. BEERS; ANDREW J. FLETCHER; *Manual Merck de Información Medica General* (España; Océano; 2007).
47. ROJAS ARMAS JUAN, ARROYO ACEVEDO JORGE, ALFONSO VALIENTE MARÍA ANTONIA. Actividad diurética del extracto metanólico de hojas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en ratas. *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2009 Dic [citado 2012 Jul 06] ; 14(4).
48. ROSCHLAY, KALANT; *Principios de Farmacología Medica* (Oxford; University Press; 2002).
49. ROSWELLES; DUBARY; *Phitochemical Academy* (Austria, Ed Ashley Hadens, 1996).

50. ROUESSAC, FRANCIS; ROUESSAC, ANICK; Análisis Químico, Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas (Madrid; Mc Graw Hill; 2003).
51. STREINER Y NORMAN; Bioestadística (España; Editorial Harcourt Brace; 1998).
52. THIBODEAU, GARY A.; Anatomía y Fisiología (España; Harcourt; 2000).
53. THOMSON, W.A.R.; Guía Práctica Ilustrada de Plantas Medicinales (Barcelona, Editorial Blume, 1980).
54. TORRES TOVAR, HUMBERTO; PINO FIGUEROA ALEJANDRO; Guía de Prácticas de Farmacognosia II (Arequipa, U.C.S.M.; 2004).
55. TREASE; G.E.; Farmacognosia 13ava Edición (Bailliere Tindall; 1991).
56. VALDIVIA DUEÑAS, ENRIQUE; CORZO DE VALDIVIA, ANGELICA; CHIRINOS PACHECO, JULIO; Texto Guía Farmacología II (Arequipa; U.C.S.M.; 2007).
57. VALENCIA ORTIZ, CIRIA; Fundamentos de Fitoquímica (México, Editorial Trillas, 1995).
58. VANACLOCHA, B.; ARTECHE, A.; Fitoterapia Vademécum de Prescripción 3ra Edición (Barcelona, Editorial Masson, 1998).
59. VANDER ARTHUR J.; Fisiología Renal 4ta Edición (México; Mc Graw Hill; 1994).
60. WRIGHT, HAROLD N.; MONTAG, MILDRED; Tratado de Farmacología Terapéutica Incluyendo Medicamentos y Soluciones (México; Interamericana; 1960).
61. ZARFATI, VICTORIA; RODRIGUEZ, ALEJANDRO; Manuel del Equipo de Electrolitos Modelo Easy Lyte Medica (Brasil; Sinshene; 2008).
62. CONSULTAS EN INTERNET
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722007000200016&lng=es.](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722007000200016&lng=es)
<http://www.plantasparacurar.com/composición -del-laurel/>
<http://www.botanical-online.com/medicinalslaurusnobiliscastella.htm>
http://www.unedcervera.com/c3900038/quimica_ingenieria/cromatografia.html



ANEXO N° 1

MODELO DE FICHA CONTROL PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA
DIURESIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Laurus nobilis* L. ‘Laurel’ EN
RATAS



Ficha #.....

Grupo Experimental:

Animal de Experimentación #

Seña Distintiva:

Peso del Animal:

Cantidad de Líquido a Administrar:

Sustancia a administrar:

ANEXO N° 2

MODELO DE FICHA PARA VOLÚMENES Y DENSIDADES

Resultados:.....Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1					
HCTZ 2					
HCTZ 3					
HCTZ 4					
HCTZ 5					
HCTZ 6					

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1					
EXTRACTO 2					
EXTRACTO 3					
EXTRACTO 4					
EXTRACTO 5					
EXTRACTO 6					

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1					
AGUA 2					
AGUA 3					
AGUA 4					
AGUA 5					
AGUA 6					

ANEXO N° 6

**DATOS DEL VOLUMEN MINUTO DE ORINA (VMO) PARA CADA
TRATAMIENTO**

	HCTZ	EXT	AGUA
1h	2.40	1.62	0.42
2h	1.20	1.23	1.00
3h	0.88	0.92	0.65
4h	0.23	0.35	0.27
5h	1.73	0.82	0.28
6h	2.02	0.90	0.37
18h	0.32	0.50	0.13
19h	0.42	0.33	0.12
20h	0.12	0.20	0.20
21h	0.20	0.20	0.13
22h	0.13	0.25	0.15
23h	0.12	0.20	0.12
24h	0.09	0.12	0.18
Sumatoria	9.86	7.64	4.02
VMO	0.16	0.13	0.07

ANEXO N° 7

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 1 Hora

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.3974	4.5324	2.1350	2.10	1.0167
HCTZ 2	2.2058	4.1670	1.9612	1.80	1.0896
HCTZ 3	2.1920	5.4231	3.2311	3.20	1.0097
HCTZ 4	2.3130	4.9101	2.5971	2.60	0.9989
HCTZ 5	2.1140	5.0121	2.8981	2.80	1.0350
HCTZ 6	2.2910	4.1971	1.9061	1.90	1.0032

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.0943	3.8205	1.7262	1.70	1.0154
EXTRACTO 2	2.1988	4.4363	2.2375	2.20	1.0170
EXTRACTO 3	2.1187	3.3028	1.1841	1.10	1.0765
EXTRACTO 4	2.2542	3.6880	1.4338	1.40	1.0241
EXTRACTO 5	2.1047	3.9627	1.8580	1.80	1.0322
EXTRACTO 6	2.0945	3.6203	1.5258	1.50	1.0172

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.0148	2.3728	0.3580	0.30	1.1933
AGUA 2	2.0252	2.5323	0.5071	0.50	1.0142
AGUA 3	2.0148	2.4263	0.4115	0.40	1.0288
AGUA 4	2.2411	2.6543	0.4132	0.40	1.0330
AGUA 5	2.2100	2.6192	0.4092	0.40	1.0230
AGUA 6	2.1854	2.6931	0.5077	0.50	1.0154

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 2 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.3137	3.2254	0.9117	0.90	1.0130
HCTZ 2	2.2180	4.0712	1.8532	1.80	1.0296
HCTZ 3	2.1453	3.3401	1.1948	0.90	1.3276
HCTZ 4	2.0984	3.3244	1.2260	1.20	1.0217
HCTZ 5	2.0923	3.6523	1.5600	1.50	1.0400
HCTZ 6	2.0993	3.0091	0.9098	0.90	1.0109

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.0343	2.9904	0.9561	0.90	1.0623
EXTRACTO 2	2.0123	3.3009	1.2886	1.20	1.0738
EXTRACTO 3	2.0054	2.9283	0.9229	0.80	1.1536
EXTRACTO 4	2.1433	3.7223	1.5790	1.50	1.0527
EXTRACTO 5	2.0967	3.8412	1.7445	1.70	1.0262
EXTRACTO 6	2.1645	3.4897	1.3252	1.30	1.0194

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.9841	3.8454	0.8613	0.80	1.0766
AGUA 2	2.0323	2.8801	0.8478	0.80	1.0598
AGUA 3	2.0564	3.0621	1.0057	1.00	1.0057
AGUA 4	2.1298	3.1411	1.0113	1.00	1.0113
AGUA 5	2.1553	3.3393	1.1840	1.20	0.9867
AGUA 6	2.0213	3.2289	1.2076	1.20	1.0063

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 3 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.1337	3.0501	0.9164	0.90	1.0182
HCTZ 2	2.1783	2.7043	0.5260	0.50	1.0520
HCTZ 3	2.0978	3.2132	1.1154	1.10	1.0140
HCTZ 4	2.1902	3.1267	0.9365	0.90	1.0406
HCTZ 5	2.0623	2.7981	0.7358	0.70	1.0511
HCTZ 6	2.4300	3.6912	1.2612	1.20	1.0510

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.1351	3.3342	1.1991	1.20	0.9993
EXTRACTO 2	2.2342	3.1999	0.9657	0.90	1.0730
EXTRACTO 3	2.1646	3.2671	1.1025	1.10	1.0023
EXTRACTO 4	2.1323	3.2891	1.1568	1.10	1.0516
EXTRACTO 5	2.1612	2.7102	0.5490	0.50	1.0980
EXTRACTO 6	2.1323	2.8890	0.7567	0.70	1.0810

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2645	2.9872	0.7227	0.70	1.0324
AGUA 2	2.4365	3.0723	0.6358	0.60	1.0597
AGUA 3	2.5633	3.1011	0.5378	0.50	1.0756
AGUA 4	2.4231	3.1462	0.7231	0.70	1.0330
AGUA 5	2.2745	3.0017	0.7272	0.70	1.0389
AGUA 6	2.3145	3.0352	0.7207	0.70	1.0296

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 4 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.3021	2.4061	0.1040	0.10	1.0400
HCTZ 2	2.2341	2.6402	0.4061	0.40	1.0153
HCTZ 3	2.2408	2.7479	0.5071	0.50	1.0142
HCTZ 4	2.2903	2.5019	0.2116	0.20	1.0580
HCTZ 5	2.3113	2.4129	0.1016	0.10	1.0160
HCTZ 6	2.3209	2.4298	0.1089	0.10	1.0890

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.2346	2.4390	0.2044	0.20	1.0220
EXTRACTO 2	2.2506	2.7583	0.5077	0.50	1.0154
EXTRACTO 3	2.1997	2.8951	0.6954	0.70	0.9934
EXTRACTO 4	2.1709	2.2761	0.1052	0.10	1.0520
EXTRACTO 5	2.2193	2.7221	0.5028	0.50	1.0056
EXTRACTO 6	2.1989	2.3002	0.1013	0.10	1.0130

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2203	2.7281	0.5078	0.50	1.0156
AGUA 2	2.2199	2.3212	0.1013	0.10	1.0130
AGUA 3	2.1986	2.5213	0.3227	0.30	1.0757
AGUA 4	2.2213	2.3295	0.1082	0.10	1.0820
AGUA 5	2.1899	2.6802	0.4903	0.50	0.9806
AGUA 6	2.2001	2.3057	0.1056	0.10	1.0560

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 5 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.1146	3.7199	1.6053	1.60	1.0033
HCTZ 2	2.2134	3.7512	1.5378	1.50	1.0252
HCTZ 3	2.2246	4.0571	1.8325	1.80	1.0181
HCTZ 4	2.2764	4.3759	2.0995	2.10	0.9998
HCTZ 5	2.2239	4.2295	2.0056	2.00	1.0028
HCTZ 6	2.1281	3.5901	1.4620	1.40	1.0443

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.1134	3.1823	1.0689	1.00	1.0689
EXTRACTO 2	2.1966	3.4104	1.2138	1.20	1.0115
EXTRACTO 3	2.2234	2.9823	0.7589	0.70	1.0841
EXTRACTO 4	2.1784	2.7839	0.6055	0.60	1.0092
EXTRACTO 5	2.2611	2.9601	0.6990	0.70	0.9986
EXTRACTO 6	2.1892	2.8991	0.7099	0.70	1.0141

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2355	2.3391	0.1036	0.10	1.0360
AGUA 2	2.2656	2.7679	0.5023	0.50	1.0046
AGUA 3	2.2306	2.7499	0.5193	0.50	1.0386
AGUA 4	2.2012	2.4202	0.2190	0.20	1.0950
AGUA 5	2.0995	2.2041	0.1046	0.10	1.0460
AGUA 6	2.2136	2.5132	0.2996	0.30	0.9987

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 6 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.2348	5.2401	3.0053	2.00	1.5027
HCTZ 2	2.1923	5.3241	3.1318	2.10	1.4913
HCTZ 3	2.2137	5.4532	3.2395	2.10	1.5426
HCTZ 4	2.2036	5.2928	3.0892	1.90	1.6259
HCTZ 5	2.2125	5.2131	3.0006	1.90	1.5793
HCTZ 6	2.1909	5.3212	3.1303	2.10	1.4906

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.2032	3.1191	0.9159	0.90	1.0177
EXTRACTO 2	2.2212	3.0892	0.8680	0.80	1.0850
EXTRACTO 3	2.1892	3.3909	1.2017	1.20	1.0014
EXTRACTO 4	2.1992	2.9981	0.7989	0.80	0.9986
EXTRACTO 5	2.2134	2.8151	0.6017	0.60	1.0028
EXTRACTO 6	2.1939	3.2995	1.1056	1.10	1.0051

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2739	2.7801	0.5062	0.50	1.0124
AGUA 2	2.2901	2.9885	0.6984	0.70	0.9977
AGUA 3	2.3132	2.5314	0.2182	0.20	1.0910
AGUA 4	2.2781	2.4775	0.1994	0.20	0.9970
AGUA 5	2.1964	2.6901	0.4937	0.50	0.9874
AGUA 6	2.1992	2.3091	0.1099	0.10	1.0990

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 18 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.0998	2.5922	0.4924	0.50	0.9848
HCTZ 2	2.1452	2.2489	0.1037	0.10	1.0370
HCTZ 3	2.1892	2.5968	0.4076	0.40	1.0190
HCTZ 4	2.2013	2.4216	0.2203	0.20	1.1015
HCTZ 5	2.1892	2.6902	0.5010	0.50	1.0020
HCTZ 6	2.1902	2.4018	0.2116	0.20	1.0580

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.1107	2.7123	0.6016	0.60	1.0027
EXTRACTO 2	2.1099	2.6149	0.5050	0.50	1.0100
EXTRACTO 3	2.0934	2.5094	0.4160	0.40	1.0400
EXTRACTO 4	2.2135	2.7291	0.5156	0.50	1.0312
EXTRACTO 5	2.1258	2.7302	0.6044	0.60	1.0073
EXTRACTO 6	2.2510	2.6631	0.4121	0.40	1.0303

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2109	2.4271	0.2162	0.20	1.0810
AGUA 2	2.2091	2.3099	0.1008	0.10	1.0080
AGUA 3	2.2613	2.3673	0.1060	0.10	1.0600
AGUA 4	2.2631	2.3601	0.0970	0.10	0.9700
AGUA 5	2.2543	2.4573	0.2030	0.20	1.0150
AGUA 6	2.2639	2.3631	0.0992	0.10	0.9920

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 19 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.1446	2.6459	0.5013	0.50	1.0026
HCTZ 2	2.2634	2.4701	0.2067	0.20	1.0335
HCTZ 3	2.1998	2.6032	0.4034	0.40	1.0085
HCTZ 4	2.2343	2.8341	0.5998	0.60	0.9997
HCTZ 5	2.2531	2.5601	0.3070	0.30	1.0233
HCTZ 6	2.2256	2.7248	0.4992	0.50	0.9984

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.2315	2.8305	0.5990	0.60	0.9983
EXTRACTO 2	2.2461	2.6709	0.4248	0.40	1.0620
EXTRACTO 3	2.2301	2.4486	0.2185	0.20	1.0925
EXTRACTO 4	2.2298	2.4321	0.2023	0.20	1.0115
EXTRACTO 5	2.2397	2.7313	0.4916	0.50	0.9832
EXTRACTO 6	2.2400	2.3438	0.1038	0.10	1.0380

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2196	2.3289	0.1093	0.10	1.0930
AGUA 2	2.2315	2.3372	0.1057	0.10	1.0570
AGUA 3	2.2256	2.3318	0.1062	0.10	1.0620
AGUA 4	2.2318	2.4391	0.2073	0.20	1.0365
AGUA 5	2.2297	2.3301	0.1004	0.10	1.0040
AGUA 6	2.2011	2.3101	0.1090	0.10	1.0900

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 20 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.2560	2.3591	0.1031	0.10	1.0310
HCTZ 2	2.2506	2.4594	0.2088	0.20	1.0440
HCTZ 3	2.2309	2.3409	0.1100	0.10	1.1000
HCTZ 4	2.1998	2.3098	0.1100	0.10	1.1000
HCTZ 5	2.2201	2.3281	0.1080	0.10	1.0800
HCTZ 6	2.2009	2.3049	0.1040	0.10	1.0400

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.2301	2.4312	0.2011	0.20	1.0055
EXTRACTO 2	2.0996	2.2097	0.1101	0.10	1.1010
EXTRACTO 3	2.1121	2.3227	0.2106	0.20	1.0530
EXTRACTO 4	2.2605	2.3709	0.1104	0.10	1.1040
EXTRACTO 5	2.1106	2.4201	0.3095	0.30	1.0317
EXTRACTO 6	2.2187	2.5311	0.3124	0.30	1.0413

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2283	2.3401	0.1118	0.10	1.1180
AGUA 2	2.2001	2.5131	0.3130	0.30	1.0433
AGUA 3	2.2304	2.3296	0.0992	0.10	0.9920
AGUA 4	2.2071	2.3201	0.1130	0.10	1.1300
AGUA 5	2.2101	2.7203	0.5102	0.50	1.0204
AGUA 6	2.2011	2.3001	0.0990	0.10	0.9900

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 21 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.2341	2.4391	0.2050	0.20	1.0250
HCTZ 2	2.2654	2.3609	0.0955	0.10	0.9550
HCTZ 3	2.1168	2.3199	0.2031	0.20	1.0155
HCTZ 4	2.2536	2.3522	0.0986	0.10	0.9860
HCTZ 5	2.3614	2.4669	0.1055	0.10	1.0550
HCTZ 6	2.2106	2.7176	0.5070	0.50	1.0140

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.0641	2.1731	0.1090	0.10	1.0900
EXTRACTO 2	2.1897	2.6951	0.5054	0.50	1.0108
EXTRACTO 3	2.2306	2.3386	0.1080	0.10	1.0800
EXTRACTO 4	2.2006	2.3125	0.1119	0.10	1.1190
EXTRACTO 5	2.3165	2.6132	0.2967	0.30	0.9890
EXTRACTO 6	2.2767	2.3791	0.1024	0.10	1.0240

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.0108	2.2124	0.2016	0.20	1.0080
AGUA 2	2.2626	2.3636	0.1010	0.10	1.0100
AGUA 3	2.3601	2.4701	0.1100	0.10	1.1000
AGUA 4	2.3705	2.4708	0.1003	0.10	1.0030
AGUA 5	2.2595	2.4558	0.1963	0.20	0.9815
AGUA 6	2.3347	2.4398	0.1051	0.10	1.0510

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 22 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.1987	2.2997	0.1010	0.10	1.0100
HCTZ 2	2.1196	2.2306	0.1110	0.10	1.1100
HCTZ 3	2.2667	2.5659	0.2992	0.30	0.9973
HCTZ 4	2.2446	2.3501	0.1055	0.10	1.0550
HCTZ 5	2.3103	2.4203	0.1100	0.10	1.1000
HCTZ 6	2.2106	2.3216	0.1110	0.10	1.1100

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.2607	2.5797	0.3190	0.30	1.0633
EXTRACTO 2	2.2597	2.3687	0.1090	0.10	1.0900
EXTRACTO 3	2.2991	2.4021	0.1030	0.10	1.0300
EXTRACTO 4	2.3119	2.8403	0.5284	0.50	1.0568
EXTRACTO 5	2.2967	2.5149	0.2182	0.20	1.0910
EXTRACTO 6	2.3002	2.6022	0.3020	0.30	1.0067

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.2046	2.3156	0.1110	0.10	1.1100
AGUA 2	2.2248	2.3258	0.1010	0.10	1.0100
AGUA 3	2.2221	2.3282	0.1061	0.10	1.0610
AGUA 4	2.2346	2.3452	0.1106	0.10	1.1060
AGUA 5	2.2590	2.3699	0.1109	0.10	1.1090
AGUA 6	2.3001	2.7266	0.4265	0.40	1.0663

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 23 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.2636	2.3656	0.1020	0.10	1.0200
HCTZ 2	2.3146	2.4246	0.1100	0.10	1.1000
HCTZ 3	2.3601	2.4701	0.1100	0.10	1.1000
HCTZ 4	2.0998	2.2103	0.1105	0.10	1.1050
HCTZ 5	2.1013	2.3201	0.2188	0.20	1.0940
HCTZ 6	2.2134	2.3208	0.1074	0.10	1.0740

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.2343	2.5363	0.3020	0.30	1.0067
EXTRACTO 2	2.2199	2.3259	0.1060	0.10	1.0600
EXTRACTO 3	2.1987	2.3009	0.1022	0.10	1.0220
EXTRACTO 4	2.2201	2.4243	0.2042	0.20	1.0210
EXTRACTO 5	2.2341	2.5382	0.3041	0.30	1.0137
EXTRACTO 6	2.2109	2.4209	0.2100	0.20	1.0500

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.0986	2.2096	0.1110	0.10	1.1100
AGUA 2	2.2136	2.3223	0.1087	0.10	1.0870
AGUA 3	2.2231	2.3358	0.1127	0.10	1.1270
AGUA 4	2.0192	2.2349	0.2157	0.20	1.0785
AGUA 5	2.2981	2.4102	0.1121	0.10	1.1210
AGUA 6	2.0139	2.1249	0.1110	0.10	1.1100

* Fuente Propia

RESULTADOS DE DENSIDAD DE LAS MUESTRAS DE ORINA

RESULTADOS 24 Horas

GRUPO 1	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
HCTZ 1	2.0934	2.1993	0.1059	0.10	1.0590
HCTZ 2	2.1126	2.2198	0.1072	0.10	1.0720
HCTZ 3	2.2334	2.3418	0.1084	0.10	1.0840
HCTZ 4	2.1258	2.2386	0.1128	0.10	1.1280
HCTZ 5	2.2506	2.3101	0.0595	0.05	1.1900
HCTZ 6	2.0699	2.1718	0.1019	0.10	1.0190

GRUPO 2	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
EXTRACTO 1	2.0758	2.1798	0.1040	0.10	1.0400
EXTRACTO 2	2.0603	2.1663	0.1060	0.10	1.0600
EXTRACTO 3	2.2346	2.3456	0.1110	0.10	1.1100
EXTRACTO 4	2.2567	2.4667	0.2100	0.20	1.0500
EXTRACTO 5	2.2099	2.3109	0.1010	0.10	1.0100
EXTRACTO 6	2.2112	2.3236	0.1124	0.10	1.1240

GRUPO3	VASO (Po)	VASO (Pf)	DIF.	VOL.	DEN.
AGUA 1	2.1349	2.3389	0.2040	0.20	1.0200
AGUA 2	2.2351	2.4601	0.2250	0.20	1.1250
AGUA 3	2.3109	2.4185	0.1076	0.10	1.0760
AGUA 4	2.0936	2.4934	0.3998	0.40	0.9995
AGUA 5	2.2199	2.3349	0.1150	0.10	1.1500
AGUA 6	2.3136	2.4381	0.1245	0.10	1.2450

* Fuente Propia



**Obtención de Extractos a diferentes
Polaridades**



Obtención del Extracto Etanólico



Extracto Etanólico



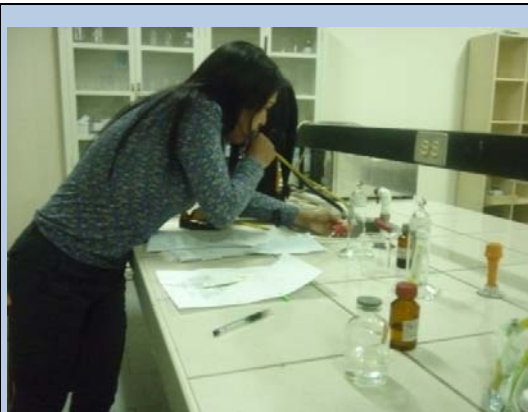
**Administración de los Diferentes
Tratamientos a los Animales de
Experimentación**



Recolección de Orina



Corrida Cromatográfica



Revelado de Placas Cromatográficas



Placas Cromatográficas



Analizador de Electrolitos



**Analizando Electrolitos de Muestras de
Orina**

