

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Efecto de la panela de *Saccharum officinarum* y de la leche de *Glycine max* en *Rattus rattus var. albinus* con osteoporosis inducida

TESIS II
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE
BACHILLER EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

AUTORES:

Marcos Rodríguez Akemy Matilde
Saldaña Carbajal Keryman Nomy

ASESORA:

Q.F. Carmen Rosa Silva Correa

TRUJILLO – PERÚ
2016

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme la fortaleza para continuar y estar conmigo en cada momento, por los triunfos y situaciones difíciles vividas, por haber puesto en el camino a aquellas personas que han sido un gran soporte y compañía durante mi formación profesional, por darme la sabiduría necesaria para lograr satisfactoriamente este trabajo de investigación y por enseñarme a valorar la vida.

A MIS PADRES

Luis y Rosmery, por depositar su confianza en mí, brindándome su apoyo emocional y económico de manera incondicional incentivándome a seguir adelante y enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Gracias a ellos puedo ser todo lo que hoy soy, me dieron la vida, valores, principios, educación y sabios consejos para conseguir cada uno de mis objetivos. Todo ello con su gran amor y sin pedir nunca algo a cambio. Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a ellos.

A MI AMIGA

Keryman, pieza fundamental para culminar este trabajo de investigación, por siempre estar presente brindándome su amistad desinteresada y apoyándome en cada momento que la necesitaba.

Akemy

A DIOS

Por ser todo en mi vida, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque sin él nada hubiera sido posible, por estar conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A MIS PADRES

Armida y Jorge, por su apoyo incondicional en todo momento, su tenacidad y lucha interminable han hecho de ellos un gran ejemplo a seguir por mí. Por su gran amor, dedicación y por impulsarme a buscar nuevos retos. ¡Los adoro mucho!

A MI HERMANA

Giannela, que siempre está junto a mí brindándome su apoyo, cariño, comprensión y paciencia.

A MIS PAPACITOS

Amanda y Demetrio, por su cariño tan especial y su confianza de siempre. Y a mí papacito Andrés que ha estado siempre cuidándome y guiándome desde el cielo.

A MI AMIGA

Akemy, por ser una excelente compañera de tesis y amiga, por tu amistad sincera, y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Keryman

AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora y amiga:

Q.F. Carmen Rosa Silva Correa

Por brindarnos su tiempo, apoyo desinteresado, paciencia y
por habernos guiado en el desarrollo de este trabajo de Tesis
y lograr conjuntamente la culminación del mismo,
y por impulsar el crecimiento de nuestra formación profesional
en el área de la investigación científica.

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Lizardo Cruzado Rasco

Presidente

Q.F. Víctor Villareal La Torre

Miembro

Q.F. Carmen Rosa Silva Correa

Miembro

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR:

De conformidad con las disposiciones legales y vigentes de reglamentos de los Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo – La Libertad, sometemos a vuestro elevado criterio el presente trabajo de investigación titulado:

Efecto de la Panela de *Saccharum officinarum* y de la leche de *Glycine max* en *Rattus rattus var. albinus* con osteoporosis inducida.

Se propicia esta oportunidad para manifestar el más profundo agradecimiento a nuestra Alma Mater y a toda su plana docente, por su meritoria labor de educadores y por la formación profesional que nos han brindado a través de sus enseñanzas.

De manera muy especial agradecemos la valiosa colaboración de los señores miembros del jurado.

Dejamos a vuestra consideración señores miembros del jurado, la respectiva calificación del presente informe.

Trujillo, Enero del 2016

Marcos Rodriguez, Akemy Matilde

Saldaña Carbajal, Keryman Nomy

ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	2
INDICE.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
III. RESULTADOS.....	23
IV. DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES.....	32
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
VII. ANEXOS.....	37

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto de la panela *Saccharum officinarum* y de la leche de *Glycine max* en *Rattus rattus* var. *albinus* con osteoporosis inducida. Se utilizaron 18 especímenes de *Rattus rattus* var. *albinus* hembras de 3 meses de edad y peso corporal entre 150 g - 200 g, se realizó una distribución aleatoria en tres grupos, con 6 especímenes para cada grupo (control, problema I y problema II). Al inicio de la experiencia se tomaron muestras basales de calcio en sangre, después se indujo osteoporosis mediante ovariectomía, transcurrido los 45 días el grupo control sólo recibió dieta estándar y agua *ad libitum*, mientras que al grupo problema I se les administró por vía oral durante 28 días la leche de *Glycine max* a dosis de 2 mL, y para el grupo problema II se les administró por vía oral durante 28 días la panela de *Saccharum officinarum* a dosis de 3.5 mL. Después de este tiempo se realizó un nuevo control de calcio en sangre, finalmente se realizó la toma de placas radiográficas a los especímenes y observar los cambios en diferentes zonas del sistema óseo en cada uno de ellos. Se obtuvo los niveles de calcemia de cada espécimen de los grupos experimentales obteniéndose valores promedios de 5.71 mg/dL con la leche de *Glycine max* y 6.18 mg/dL de calcio en sangre con la panela de *Saccharum officinarum*, ambos valores disminuidos en comparación del valor promedio de 8.24 mg/dL de calcemia obtenido en el grupo control. En cuanto a los cambios óseos mediante placas radiográficas se observó hiperostosis en los animales que recibieron panela de *Saccharum officinarum*, no se encontró signos degenerativos osteoarticulares para la leche de *Glycine max*; y para el control se observó espondiloartrosis leve, escoliosis cervicodorsal y osteoporosis leve. Se concluyó que la panela de *Saccharum officinarum* y la leche de *Glycine max* contribuyen en la recuperación de la calcificación ósea.

PALABRAS CLAVES: panela, *Saccharum officinarum*, *Glycine max*, calcemia, osteoporosis, ovariectomía

ABSTRACT

In this research the effect of sugar cane *Saccharum officinarum* and milk Glycine max in *Rattus rattus* var. *albinus* with induced osteoporosis. 18 specimens were used *Rattus rattus* var. *albinus* female 3 months old and weighing 150 g - 200 g, was conducted randomly distributed in three groups, with 6 specimens for each group (control, problem I and problem II). At the beginning of the experiment basal calcium blood samples were taken after osteoporosis induced by ovariectomy, 45 days after the control group received only standard diet and water ad libitum, whereas the problem group I were administered orally for 28-day milk Glycine max to dose of 2 mL, and the problem for group II were orally administered for 28 days of *Saccharum officinarum* sugar cane at a dose of 3.5 mL. After this time a new control blood calcium was conducted, finally taking radiographic specimens and plates were observe changes in different areas of the skeletal system in each. Serum calcium levels for each specimen of the experimental groups obtained average values of 5.71 mg / dL with the milk of Glycine max and 6.18 mg / dL blood calcium with panela *Saccharum officinarum* was obtained, both decreased in value comparison values average of 8.24 mg / dL in serum calcium obtained in the control group. Regarding bone changes using radiographs hyperostosis was observed in animals receiving of *Saccharum officinarum* sugar cane, not osteoarticular degenerative signs for milk from Glycine max was found; and for controlling mild spondylosis, cervical mild scoliosis and osteoporosis was observed. It was concluded that *Saccharum officinarum* brown sugar and milk Glycine max contribute to the recovery of bone calcification.

KEYWORDS: panela, *Saccharum officinarum*, Glycine max, serum calcium, osteoporosis, ovariectomy

I.- INTRODUCCIÓN

La osteoporosis ha sido considerada como un problema mayor de salud pública mundial en la población senil (población que se encuentra en constante aumento). La prevalencia de esta enfermedad se incrementa con la edad avanzada siendo el 4% en mujeres de 50-59 años y alcanzando hasta el 52% a los 80 años. En la edad avanzada es factor fundamental en el 90% de las fracturas de columna y cadera, siendo el principal determinante del riesgo de fractura la cantidad de masa ósea, a la que se une la alteración de la calidad del hueso; finalmente, la propensión a las caídas facilita el desarrollo de la fractura en la persona predispuesta ¹⁻⁴.

La osteoporosis es considerada como un padecimiento común, multifactorial, progresivo y debilitante de la arquitectura del esqueleto óseo, y ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los cinco principales problemas de salud pública mundial en la actualidad. Este debilitamiento progresivo es consecuencia de la descalcificación progresiva de los huesos, lo cual aumenta el riesgo significativo de morbilidad prematura, manifestada por fracturas óseas, deformidad ósea y dolor crónico. La osteoporosis se puede producir por tres mecanismos básicos: El primero por una falla en la adquisición de una masa y calidad mineral ósea adecuada durante el crecimiento, segundo porque ocurre la resorción ósea excesiva que produce disminución de la masa ósea y deterioro de la microarquitectura del hueso; y finalmente la respuesta de formación inadecuada ante la resorción ósea ⁵⁻⁸.

El déficit de calcio o las alteraciones en su vías metabólicas son mecanismos implicados en la génesis de la osteoporosis: la disminución en la ingesta de calcio, la malabsorción o el déficit de vitamina D (debajo de 30 ng/ml) pueden conducir a un hiperparatiroidismo secundario, que lleva a pérdida acelerada de la masa ósea e incremento en la fragilidad ⁹⁻¹².

Estos riesgos son consecuentes al descenso estrogénico, el cual conlleva a una mayor pérdida de densidad mineral ósea, aun cuando existe una mayor expectativa de vida para las mujeres en comparación con los hombres. Tal es así, que los estrógenos son los principales responsables del mantenimiento de la masa ósea en la mujer y, junto a los andrógenos, también en el hombre adulto. Por lo cual la osteoporosis asociada a la deficiencia estrogénica tras la menopausia constituye la causa principal de pérdida de masa ósea con la edad, por ello la terapia de reemplazo estrogénico se considera el método más eficaz para reducir la pérdida de masa ósea asociada a la osteoporosis posmenopáusica y actualmente, se considera que los factores nutricionales son importantes para modular el pico y la subsiguiente pérdida de masa ósea asociada a la edad y a la deficiencia estrogénica ⁹⁻¹².

Por lo mencionado anteriormente los estrógenos son más útiles cuando el tratamiento se inicia antes de que haya pérdida importante de hueso, y sus acciones beneficiosas requieren administración continua; la pérdida de hueso se reanuda cuando se suspende el tratamiento, entonces la estrategia más adecuada para estimar el riesgo de fractura por osteoporosis es la que utiliza la densitometría ósea (DO) de manera selectiva en aquellos individuos que presenten mayor riesgo. Por tanto la indicación de la DO tiene que realizarse en función del número de factores de riesgo (FR) de fractura osteoporótica y el tipo (riesgo elevado o moderado) que presente el paciente ⁹⁻¹³.

Aunque, ésta es una enfermedad no curable, existen diversas formas farmacológicas y no farmacológicas de prevención y de tratamiento de la enfermedad ya establecida. La terapia de reemplazo hormonal juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de la densidad ósea, lo cual ayuda por consiguiente a prevenir la osteoporosis postmenopáusica; también se utiliza en el tratamiento de la pérdida de masa ósea cuando ésta ya ha comenzado. Además puede prevenir el deterioro de la densidad del hueso y puede reducir la incidencia de fracturas en la cadera ⁹⁻¹⁴.

Muchos alimentos vegetales contienen cantidades de las diversas moléculas de fitoestrógenos que tienen el potencial para mejorar la salud, lo cual son un grupo heterogéneo de compuestos no esteroideos derivados de plantas, con propiedades beneficiosas para el metabolismo celular y que poseen similitud estructural y funcional con los estrógenos. Dentro de los fitoestrógenos se encuentra a las isoflavonas incluyendo a la genisteína, es un fitoestrógeno isoflavonoide natural que tiene un efecto estimulador sobre la formación y la mineralización ósea y la daidzeína, ambas isoflavonas estimulan la formación ósea e inhiben la resorción osteoclástica, de modo que así aumentan la masa ósea, teniendo el potencial para prevenir la pérdida ósea con la edad ¹⁵⁻¹⁷.

Las isoflavonas están presentes en la soja (*Glycine max*) en grandes cantidades, por lo que es utilizada en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. Muchos tipos de alimentos de soja son consumidos en todo el mundo, entre ellos la leche de soja ¹⁸.

Así mismo, se tiene a la panela de (*Saccharum officinarum*) que se obtiene de la caña de azúcar, que es más pura que el azúcar porque es el resultado exclusivo de la evaporación de los jugos de la caña y de la siguiente cristalización de la sacarosa, sin que se someta a procesos de refinado o centrifugado o a otro proceso químico; por esta razón, la panela es un producto natural que mantiene todos los nutrientes de la caña de azúcar. La panela es un alimento de altos valores nutricionales, ya que está compuesta por carbohidratos, minerales y vitaminas debido a que en su preparación se añade hidróxido de calcio (como producto de la cal viva), grasa de res que contiene vitamina D, lo que facilita la absorción intestinal de calcio. También contiene fósforo, hierro, sodio, potasio y magnesio ¹⁹⁻²⁰.

Newton K. (2006) realizó un ensayo aleatorio con la finalidad de probar la hipótesis de que la administración de suplementos de isoflavonas de soja conserva la densidad mineral ósea (DMO) en hombres mayores y mujeres, se concluyó que los efectos del tratamiento sobre la DMO de la columna fueron significativamente

mayores en las mujeres que en los hombres ($p = 0,01$). En comparación, el porcentaje de cambio en la DMO de cadera fue similar en los grupos de tratamiento, y no fue diferente entre hombres y mujeres ²¹.

Albert C. (2002) realizó un ensayo clínico multicéntrico, abierto, prospectivo, observacional y no aleatorizado a 190 mujeres posmenopáusicas para el estudio de la eficacia y seguridad de una preparación fitoestrógenos derivados de *Glycine max* (L.) Merr en la sintomatología climatérica reporta que el tratamiento con PHYTO SOYA por cuatro meses resultó en una mejora significativa de la sintomatología que acompaña a la falta de estrógeno durante la menopausia, una disminución estadísticamente significativa en el número de sofocos que fue experimentado por 80.82% de las mujeres ²².

Bahram A. (1996) comprobó que los suplementos de la soja previene la pérdida ósea producida por deficiencia de la hormona ovárica y concluyó en que a pesar de la mayor tasa de recambio óseo en los animales alimentados con soja, las densidades óseas vertebrales y femorales de estas ratas fueron significativamente mayores que los de las ratas ovariectomizadas y que no recibieron tratamiento, lo que sugiere que la formación superó la resorción de los huesos ²³.

Brem, J. (2005) en su estudio “*Concentración de minerales en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno y progesterona*” resalta que el hueso no es una masa mineralizada adinámica sino que también en el desarrollo y mantenimiento del tejido óseo están involucrados varios procesos complejos que incluyen crecimiento endocondral, modelación y remodelación. En este modelo de osteoporosis experimental con ratas ovariectomizadas y bajo dichos modelos de trabajo, se registraron disminuciones significativas para magnesio sérico en ambos lotes castrados y fosfatasa alcalina sólo en el lote castrado que recibió tratamiento hormonal; el resto de minerales estudiados en sangre no mostraron diferencias. ²⁴

Landa C. (2003) evaluó el “*Papel de la terapia hormonal sustitutiva, en la prevención y tratamiento de la osteoporosis menopáusica*”, se afirma que la terapia hormonal sustitutiva ha demostrado utilidad para la prevención de la pérdida ósea; y tiene efecto positivo sobre la masa ósea con más intensidad sobre el hueso trabecular y se recupera el balance negativo del recambio óseo al acabar el tratamiento hormonal ²⁵.

Aguilar A. (2000) estudió el “*Efecto del suplemento dietético “Chancaca” sobre descalcificación inducida con una corticoterapia en megadosis por 30 días*” dando a conocer los beneficios de la chancaca como buen proveedor de calcio útil para el organismo, y en sus resultados se evidencia la recuperación de la calcificación ósea en la osteoporosis inducida por corticoides es *Rattus rattus var. albinus* ²⁶.

Debido a lo mencionado y considerando que en nuestro país y región existen muchos casos de mujeres menopáusicas que presentan un sin número de efectos secundarios con los tratamientos convencionales, surge la necesidad de evaluar los efectos de la panela de *Saccharum officinarum* y de la leche de *Glycine max* como tratamientos alternativos para contrarrestar la osteoporosis inducida.

Es por tal razón que en el presente trabajo de investigación se plantea el siguiente problema: ¿Cuál el efecto de la panela de *Saccharum officinarum* y de la leche de *Glycine max* en *Rattus rattus var. albinus* con osteoporosis inducida?

Se postuló como hipótesis que la leche de *Glycine max* y la panela de *Saccharum officinarum* producen la recuperación de la calcificación ósea en *Rattus rattus var. albinus* con osteoporosis inducida.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. MATERIAL

1.1.1. Material Biológico

Se utilizaron 5 Kg de panela de *Saccharum officinarum* (chancaca) elaborada por la Empresa Agroindustrial Laredo S.A. y 5 Kg de granos de *Glycine max (soya)* “La Norteña” (Fab. Industria de Granos del Perú S.A.C.) de la provincia de Trujillo – La Libertad.

1.1.2. Animales de experimentación

Se emplearon 18 especímenes de la especie *Rattus rattus var. albinus*, aparentemente sanas, hembras, de 3 meses de edad con un peso corporal promedio entre 150-200 g, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud - Lima.

1.1.3. Materiales e instrumentos

1.1.3.1. Material de Laboratorio

De uso común en el Laboratorio de Toxicología.

1.1.3.2. Material de Vidrio

- 03 Fiolas 100 mL
- 03 Cápsula de porcelana
- 01 Mortero de porcelana
- 03 Probetas de 100 mL
- 03 Vasos de precipitación de 50 mL
- 03 Vasos de precipitación de 100 mL
- 03 Vasos de precipitación de 250 mL
- 02 Pipetas de 1 mL
- 03 Pipetas de 5 mL
- 03 Pipetas de 10 mL
- 15 Tubos de ensayo

1.1.3.3. Equipos e Instrumentos

- Espectrofotómetro RA-50
- Centrífuga para microhematocrito H.W. Kessel S.A.
- Balanza analítica OHAUS GA 200
- Balanza de triple brazo OHAUS 700/800 series
- Baño María H.W. Kessel S.A.
- Estufa Memmert
- Refrigeradora Moraveco
- Micropipetas Braund
- Equipo de disección Leica Biosystems

2.1.3.4. Reactivos y Solventes

- Agua destilada DROPAKSA
- NaOH 10% p/v
- NaOH 1N
- HCl diluido
- EDTA sódico 0.01M
- Azul de hidroxinaftol
- Alcohol 96° DROPAKSA
- Kit para determinar calcio sérico (Ca-COLOR) “WIENER LAB”

2.1.3.5. Productos Farmacéuticos

- Ketamina Amp. 500 mg/10ml

Laboratorio: SANDERSON, Lote N°: 11030821, FV: 10-2018

- Gentamicina Amp. 160mg/2mL

Laboratorio: PHARMAGEN S.A.C., Lote N°:150421, FV:
04/2018

2.1.3.6. Otros

- Algodón de 1000 gr Coppon
- Tubos capilares para microhematocrito con heparina VITREX
- Cinta quirúrgica de papel Cirugistix
- Etiquetas para nombre Portafolio
- Guantes quirúrgicos 6 ½ IQ Medic
- Jeringas de Tuberculina 1 ml/cc NIPRO

- Lancetas NIPRO
- Puntas de pipeta (200 µl) BRAND
- Papel de filtro Whatman N° 1 tiras de 13 x 20 cms.
- Plumón de tinta indeleble Rovi´s
- Sondas nasogástricas N° 12
- Jaulas para especímenes 440 x 290 x 190 mm.

2.2. MÉTODOS:

2.2.1. Selección de Grupos de Experimentación:

Se seleccionaron 18 especímenes de experimentación *Rattus rattus var. albinus*, hembras de 3 meses de edad, aparentemente sanas con un peso corporal entre 150 g - 200 g, las cuales fueron distribuidos de manera aleatoria en 3 grupos experimentales.

A. Grupo Control: Conformado por 6 especímenes *Rattus rattus var. albinus* hembras ovariectomizadas, que no recibieron tratamiento y permanecieron en condiciones normales de alimento y ambiente.

B. Grupo Problema I: Conformado por 6 especímenes *Rattus rattus var. albinus* hembras ovariectomizadas y se les administró en ayunas por vía oral 2 mL de la leche de *Glycine max* una vez al día por las mañanas durante 4 semanas. Además, fueron alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum*.

C. Grupo Problema II: Conformado por 6 especímenes *Rattus rattus var. albinus* hembras ovariectomizadas y se les administró en ayunas por vía oral 3.5 mL de panela de *Saccharum officinarum* una vez al día por las mañanas durante 4 semanas. Además, fueron alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum*.

2.2.1. Acondicionamiento de los animales de experimentación ²⁷

En el desarrollo del trabajo de investigación se tuvo en cuenta las normas y procedimientos bioéticos establecidos internacionalmente para el manejo de animales en el laboratorio.

Los ambientes del bioterio donde permanecieron los especímenes tenían una temperatura de 20 a 25 °C y humedad relativa ambiental entre 40 a 70%. La iluminación se controló con 12 horas luz/12 horas oscuridad programado con reloj temporizador. Todos los animales de experimentación pasaron por un tiempo de adaptación (cuarentena) de 15 días desde su adquisición hasta su uso, con el objetivo de tener especímenes menos estresados y más sanos, que proporcionen un mejor resultado experimental.

En la alimentación de los especímenes se consideró los requerimientos de agua y comida “*ad libitum*”. Los frascos bebederos y contenedores de alimento fueron lavados y desinfectados (hipoclorito de sodio) cada vez que se suministró comida y agua. Todos los procedimientos fueron realizados acordes con los protocolos aprobados por la Institución y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NRC, USA 1996).

2.2.2. Determinación de calcio en sangre de *Rattus rattus var. albinus*²⁸:

Se tomaron muestras sanguíneas a todos los especímenes en experimentación, obtenidas de la parte terminal de la cola e inmediatamente se introdujo capilares heparinizados a una profundidad de 2 a 3 cm aproximadamente. Se dejó que la sangre salga libremente y se descartó la primera gota, luego se recogió la sangre directamente en capilares heparinizados, finalmente se centrifugó y se separó el suero de cada uno de ellos.

Se determinó calcemia mediante el método colorimétrico directo, se calculó el promedio de los valores obtenidos, dato que se consideró como medición basal de calcemia, la siguiente medición se realizó en el estadio post-cirugía (ovariectomía), y finalmente la tercera y última medición de calcemia se realizó en el estadio post- tratamiento.

Método colorimétrico directo ²⁸

Fundamento: El calcio reacciona con la cresoltaleincomplexona (Cfx) a pH alcalino, dando complejo de adición color magenta que se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm.

Procedimiento: Se procedió a realizar lectura del BLANCO interno del reactivo, para lo cual se utilizó 50 µL de reactivo cresoltaleincomplexona y 2 mL de agua destilada. Luego para obtener la lectura del STANDAR se añadió 20µL de solución standard de calcio (10mg/dL) más 50 µL de reactivo o-cresoltaleincomplexona.

Para las determinaciones de los DESCONOCIDOS o MUESTRAS de suero de los especímenes de los grupos control, problema I y problema II se agregó 20 µL de suero de estos más 50 µL de reactivo cresoltaleincomplexona para la determinación de las lecturas.

	BLANCO	STANDARD	DESCONOCIDO
Agua destilada	2 ml		
Standard de Calcio		20µL	
Muestra			20µL
Reactivo	50µL	50µL	50µL

Se agitaron los tubos de ensayo, se llevó a incubar 5 min a temperatura ambiente (15-25°C) y se procedió a leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm.

2.2.3. Realización de la ovariectomía ²⁹:

Los especímenes de 3 meses de edad fueron anestesiados con Ketamina a dosis de 100 mg/Kg vía intraperitoneal, luego se procedió a la realización de la incisión en la línea media dorsal de la piel, 3 cm de largo aproximadamente, a medio camino entre el centro de la espalda y la base de la cola, las incisiones de los músculos se hicieron bilateralmente.

Luego de buscar la conexión entre la trompa de falopio y el cuello uterino, se extirpó cada ovario, posteriormente se realizó la sutura con catgut crómico 4/0MR individualmente sobre la piel y se le administró 0.1 ml de

Gentamicina para evitar cualquier tipo de infección en el espécimen; seguidamente se dejó a los especímenes en reposo por un lapso de 45 días para su total recuperación, luego fueron incluidos en los experimentos.

2.2.4. Valoración de calcio en la panela de *Saccharum officinarum* y en la leche de *Glycine max*:

Método complexométrico de Connors ²⁶

Fundamento: El indicador azul de hidroxinaftol reacciona con el calcio, en medio alcalino, dando un color rojo vinoso que luego al titular con EDTA 0.01M, este desplaza al indicador que ha reaccionado con el calcio para formar complejo EDTA-Ca. Fenómeno que genera un viraje de color a azul oscuro, que indica el punto de equivalencia.

Procedimiento: Para la valoración de la panela de *Saccharum officinarum* se pesó exactamente 1g de la muestra y se disolvió en 10 mL de agua destilada tibia y para la valoración de la leche de *Glycine max* se tomó 10 mL de la muestra preparada (10g de Soya en 100 mL de agua tibia). Luego se añadió III gotas de HCl diluido a las 2 muestras. Llevamos a filtración cada muestra y luego se transfirió cuantitativamente a dos fioles de 100 mL respectivamente, aforando con agua destilada. Se tomó 50 mL de cada muestra a los matraces Erlenmeyer, en los cuales se añadieron 6mL de NaOH 1N a cada muestra. Además, se añadió también una cantidad suficiente del indicador Azul de Hidroxinaftol para cada muestra. Luego titulamos con solución reactiva EDTA 0.01M hasta viraje de color. Se anotó los mililitros gastados en cada muestra y se realizó los cálculos correspondientes.

2.2.5. Preparación de la leche de *Glycine max* ³⁰:

Los granos de *Glycine max* tras la limpieza fueron licuados para obtener una mejor forma. Según el método complexométrico de Connors se obtuvo que 1 g de soya contiene un promedio 4.1 mg de Calcio iónico, dato que nos sirvió para preparar la dosificación de la “leche de soya”, cantidad equivalente a 20 mg de calcio iónico. Se preparó una solución en promedio

de 5 g de soya/50 ml de agua añadiendo el porcentaje aprox. de merma de agua al hervir por unos 5-10 minutos revolviendo, finalmente se dejó enfriar hasta su administración.

Tratamiento con la leche de *Glycine max*³⁰

Al grupo problema I, después de la ovariectomía y culminado los 45 días de reposo de los especímenes en experimentación, se les administró por vía oral la leche de *Glycine max* a través de una sonda nasogástrica a una dosis diaria de 2 mL a cada espécimen, todos los días por las mañanas durante 4 semanas.

2.2.6. Preparación de dulce de la panela de *Saccharum officinarum*²⁶

Según el método complexométrico de Connors se obtuvo que 1 g de chancaca contiene un promedio 2.24 mg de Calcio iónico, dato que sirvió para preparar la dosificación de “chancaca”, cantidad equivalente a 20 mg de calcio iónico. Se preparó una solución en promedio de 9g de chancaca/90 ml de agua, añadiendo el porcentaje aprox. de merma de agua al hervir por unos 5-10 minutos revolviendo, finalmente se dejó enfriar hasta su administración.

Tratamiento con la panela de *Saccharum officinarum*²⁶

Al grupo problema II después de la ovariectomía y culminado los 45 días de reposo de los especímenes en experimentación, se le administró por vía oral la panela de *Saccharum officinarum* a través de una sonda nasogástrica una dosis diaria de 3.5 mL a cada espécimen, todos los días por las mañanas durante 4 semanas.

2.2.7. Estudio Radiográfico²⁶:

Finalizada la investigación se realizó la toma de placas radiográficas de los especímenes de cada grupo en estudio para corroborar los datos obtenidos y observar los cambios en diferentes zonas del sistema óseo (columna vertebral, tejido óseo).

2.2.8. Análisis Estadístico ²⁶:

Para el procesamiento estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences), aplicando la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para observar si existe diferencia significativa entre los valores de calcemia que fueron medidos en cada etapa de la investigación.

Los valores de calcemia fueron expresados como promedio y desviación estándar y analizados estadísticamente tomando como parámetro central la media aritmética. Para inferir estadísticamente en base a los resultados se consideró un nivel de significancia de 0,05.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

III. RESULTADOS

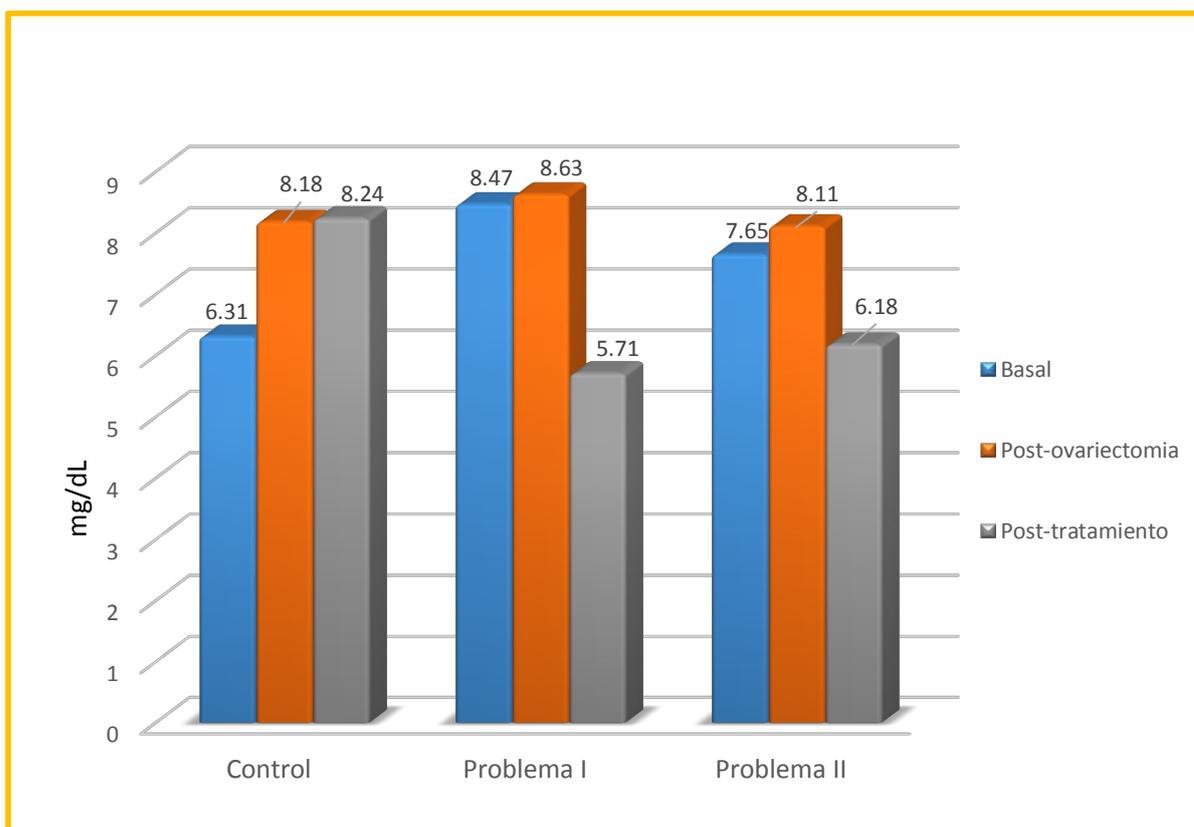


Gráfico 01. Valores promedios de calcio en sangre (mg/dL) en *Rattus rattus var albinus* de los grupos control, problema I y problema II durante toda la experiencia.



Fig. 1: Se observa Espondiloartritis leve, escoliosis cervical y osteoporosis leve en *Rattus rattus var. albinus* del grupo que no recibió tratamiento (grupo control) luego de la ovariectomía.



Fig. 2: Se observa densidad normal en el tejido óseo en *Rattus rattus var. albinus* que recibió la leche de *Glycine max* (grupo problema I) luego de la ovariectomía.



Fig. 3: Se observa signos de hiperdensidad ósea (hiperostosis) en *Rattus rattus* var. *albinus* que recibió la panela de *Saccharum officinarum* (grupo problema II) luego de la ovariectomía.

IV. DISCUSIÓN

La osteoporosis postmenopáusica es un caso ampliamente investigado, la incidencia de las fracturas aún no se ha reducido considerablemente, por lo que todavía existe necesidad de comprender su etiología, desarrollo de terapias eficaces para la osteoporosis postmenopáusica así mismo las diferentes alternativas de terapia de reemplazo hormonal. Es así, que para el presente estudio se utilizó ovariectomía en *Rattus rattus var. albinus*, método más utilizado para producir osteoporosis postmenopáusica experimental, el sometimiento de la extirpación de ovarios en los especímenes hembras conlleva a la deficiencia de estrógenos^{31,32}.

Al analizar el Gráfico 1, se observan los valores de la concentración sérica de calcio en los tres momentos en que se realizan las mediciones de calcio en sangre, tanto para los grupos problema I, problema II como para el grupo control. El valor promedio obtenido de calcio en sangre (calcemia) al inicio del experimento fue de 8.47, 7.65 y 6.31 mg/dL respectivamente. Estos datos se consideraron como valores de calcemia en condiciones fisiológicas normales, y fueron punto de partida para el desarrollo de las experiencias programadas posteriormente. Al someter a los especímenes a una descalcificación ósea a los tres grupos de experimentación mediante ovariectomía, se observaron los valores promedios 8.63, 8.11 y 8.18 mg/dL de calcio en sangre obtenidos en los especímenes de cada grupo de experimentación, dichos valores se vieron incrementados respecto a los valores promedios obtenidos en la primera medición. Este incremento de calcio en sangre (hipercalcemia) se obtuvo a los 45 días de cicatrización del espécimen *Rattus rattus var. albinus* y podría estar relacionado a la pérdida de masa ósea en el espécimen causado por el efecto de la ovariectomía, fenómeno que es similar a los cambios esqueléticos observados en las mujeres post-menopáusicas debido a la pérdida de estrógenos.

La rápida pérdida de masa ósea trabecular se produce por dos mecanismos, el primer mecanismo es por un aumento de la osteoclastogénesis que conduce a un aumento de la resorción del hueso, lo que resulta en una fase temprana de la rápida pérdida de masa

ósea. Esto hace una rápida salida de calcio de los huesos hacia la circulación lo que produce la supresión de la secreción de la hormona paratiroidea y la producción de vitamina D. Durante la fase tardía de la menopausia, la pérdida masa ósea ocurre predominantemente por un segundo mecanismo, que es debido a la disminución de la absorción de calcio intestinal. Esta disminución en la absorción de calcio causa de modo secundario hiperparatiroidismo y el aumento de la resorción ósea. Produciéndose de esta manera una hipercalcemia muy notoria en el grupo control, grupo que no fue sometido a ningún tratamiento después de la ovariectomía y que al término del experimento se observó tendencia de aumento de calcio en sangre de 8.24 mg/dL como se observa en el Gráfico 1, ³³.

Por otro lado, el déficit de estrógenos, consecuencia de la ovariectomía, produce incremento en el número de unidades de remodelación ósea activadas por unidad de tiempo, interactuando con células del sistema inmune, primordialmente por aumento de la formación de osteoclastos y reducción de su apoptosis ³².

Aunque existe un incremento en la respuesta de formación ósea, esta es inadecuada para el grado de resorción, ya que también se evidencia un mayor grado de apoptosis de los osteoblastos. La fragilidad ósea es consecuencia de una adaptación fallida; así, por ejemplo, durante la menopausia, la remodelación del hueso pierde su equilibrio y se produce pérdida ósea. El proceso de resorción ósea está controlado por una compleja interacción entre las células osteoblásticas y osteoclasticas. Dicho proceso puede llegar a incrementar la fragilidad ósea, más allá de lo esperable simplemente por la disminución de la densidad mineral. Por consiguiente, en la Figura 1 se muestra el resultado de la imagen radiográfica del grupo control, evidenciando el proceso de desmineralización ósea, osteoporosis leve con disminución de densidad en el sistema óseo y escoliosis cervical de concavidad derecha con tendencia a la deformación de los huesos largos ³².

Para los grupos de experimentación con tratamiento alternativo de leche de *Glycine max* y panela de *Saccharum officinarum* administrados en el grupo problema I y grupo problema II respectivamente, por un periodo de 28 días (4 semanas), se obtuvieron

valores promedios de 5.71 mg/dL y 6.18 mg/dL de calcio en sangre, los que están disminuidos en comparación del valor promedio de 8.24 mg/dL de calcemia obtenida en el grupo control. En estos grupos la tendencia homeostática se debe al tratamiento que reciben y a los beneficios que presentan dichos alimentos en su contenido; a pesar que en el grupo problema I la cantidad de calcio en sangre fue más baja que la del grupo problema II, ambos valores resultan menores en comparación con el valor promedio obtenido después de una descalcificación ósea que se observa en el grupo control.

En cuanto a la disminución de calcemia obtenida con el tratamiento de leche de *Glycine max* se puede afirmar que podría prevenir la pérdida de masa ósea inducida por la ovariectomía en *Rattus rattus var albinus* según se observa en el grupo problema I y se corrobora con la imagen radiográfica que muestra la Figura 2. Aunque el mecanismo por el cual actúa la leche de *Glycine max* (soya) aún no se ha aclarado totalmente, se plantea diferentes hipótesis³³.

La leche de *Glycine max* contiene fitoestrógenos, incluyendo isoflavonas (genisteína y daidzeína) y considerando que existe gran interés en el uso de los fitoestrógenos como sustitutos para terapias de reemplazo de estrógeno tradicionales en las mujeres menopáusicas. Algunas evidencias sugieren que estos compuestos pueden proporcionar efectos selectivos de tejido (los fitoestrógenos tienen una afinidad de unión a receptores de estrógenos)³³.

La genisteína es un isoflavonoide natural que se encuentra en las Leguminosae y se ha demostrado que tiene un efecto anabolizante sobre el metabolismo del hueso, sugiriendo su papel en la prevención de la osteoporosis. La genisteína tiene un efecto estimulante sobre la formación de hueso y mineralización en el sistema de cultivo de tejidos *in vitro*, y que puede estimular la síntesis de proteínas en las células osteoblásticas. Por otra parte, genisteína se ha demostrado que inhiben la resorción ósea osteoblástica mediante la prevención de la formación y la diferenciación de los osteoclastos como las células de células de médula ósea, y la apoptosis de osteoclastos maduros se induce por la genisteína a través del mecanismo de señalización de Ca^{2+} . Además, el efecto supresor de la genisteína sobre los osteoclastos del hueso de rata albina es en parte involucrado en

la inhibición de la proteína quinasa y la activación de la proteína tirosina fosfatasa en los osteoclastos ¹⁸.

La evidencia de estudios epidemiológicos en personas mujeres mayores en Asia sugiere que el alto consumo de isoflavonas (Soya) pueden tener un efecto protector contra las fracturas en comparación con las poblaciones occidentales. Además, estudios recientes indican que un consumo adecuado de vitamina D se asocia con un menor riesgo de fracturas osteoporóticas de cadera en las mujeres posmenopáusicas ³³.

Las isoflavonas de *Glycine max* también han demostrado tener propiedades antioxidantes mediante la inhibición de la producción de peróxido de hidrógeno y activación de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión. Los antioxidantes previenen los daños de oxidación y de ese modo prevenir la resorción ósea y estimula la formación de hueso ³³.

Por otra parte, el estrógeno y PTH son factores importantes en la regulación del metabolismo de los huesos, la leche de *Glycine max* (soya) podría aumentar el estrógeno y reducir la PTH a nivel sérico, que pueden desempeñar un papel importante en la supresión de la resorción ósea elevada ³³.

En la Figura 2 se observa la recuperación en el sistema óseo de los especímenes a los que se les administró leche de *Glycine max*, los elementos óseos visibles se muestran de forma, tamaño y densidad conservada ^{19,34}.

Por otro lado, la disminución de calcemia obtenida con el tratamiento con la panela de *Saccharum officinarum* (chancaca) podría prevenir la pérdida de masa ósea inducida por la ovariectomía en *Rattus rattus var albinus*, según se observa en el grupo problema II con la imagen radiográfica que muestra la Figura 3.

Además entre los valores de calcemia hallados en los grupos problema I y problema II se evidencia una mayor concentración hemática de calcio para el grupo problema II, esta mayor concentración se debería a dos factores, en primer lugar a que el

calcio que contiene la panela de *Saccharum officinarum*, está en forma de base (hidróxido de calcio), en estudios realizados por el Instituto Anboisse de Francia, se realizó una cuantificación de los componentes de la panela, encontrándose que 1 kilogramo contiene de 40 a 100 g de calcio y además contiene 6.5 g aprox. de vitamina D₂, esto nos da indicio de ser un alimento que favorece no sólo el aporte sino también absorción intestinal del calcio y que en el procesamiento final de la panela de *Saccharum officinarum* se sabe que se añade residuos de grasa de res, que se unta a los moldes durante esta etapa para facilitar su vaciado, que permitiría mayor aporte de vitamina D₂, esto nos da indicio de ser un alimento que favorece no sólo el aporte sino también absorción intestinal del calcio y el otro factor es que en su procesamiento final de la panela de *Saccharum officinarum* se sabe que se añade residuos de grasa de res, que se unta a los moldes durante esta etapa para facilitar su vaciado, que permitiría mayor aporte de vitamina D, cual facilita la absorción intestinal de calcio.

En la Figura 3 se observa la recuperación del espécimen con un efecto más marcado en el tejido óseo de los especímenes a los que se les administró panela de *Saccharum officinarum*, muestra mayor depósito calcio en los huesos (Hiperdensidad ósea), de forma y tamaño conservado^{19,34}.

Finalmente se realizó el Análisis de Varianza ANOVA para los resultados obtenidos de los tres grupos (Anexo 2). El valor tabulado F con 2 y 15 gl. es igual a 3.68 y el valor experimental F obtenido es igual a 8.80; al ser mayor que el valor tabulado F, se rechaza la hipótesis nula de que las medias de la población son iguales (con un 95 % de probabilidad).

Como resultado, el ANOVA indica que existe una diferencia significativa entre los tres grupos. Al rechazarse las hipótesis nulas de los grupos problemas I y II se puede tomar validez de cualquiera de los dos tratamientos administrados.

V. CONCLUSIONES

1. La panela de *Saccharum officinarum* y la leche de *Glycine max* aportan calcio y contribuyen en la recuperación de la calcificación ósea en *Rattus rattus var. albinus* con osteoporosis inducida.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Looker A, Wahner H, Dunn W, Calvo M, Harris T, Heyse S, et al. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int* 1998;8:468-89
2. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2005; 16 Suppl 2:S3-7.
3. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115:3318- 25.
4. Kronenberg H. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423:332-6
5. Toumba M, Skordis N. Osteoporosis syndrome in thalassaemia major: An Overview. *J Osteopor* 2010; 55 (3): 97-127.
6. Nguyen N, Frost S, Center J, Eisman J, Nguyen T. Development of a nomogram for individualizing hip fracture risk in men and women. *Osteopor Int* 2007; 18: 1109-1117.
7. National Osteoporosis Foundation. American Bone Health: The State of Osteoporosis and Low Bone Mass in Our Nation. 2003
8. Kronenberg H. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; 423:332-6.
9. Salazar K. Osteoporosis: Un problema mayor de salud pública. *Rev. costarric. salud pública* [Online]. 2008, vol.17, n.32, pp. 75-79. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292008000100010&script=sci_arttext
10. Riggs B, Khosla S, Melton L. A unitary model for involuntional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:763-73.
11. Mahavni V, Sood A. Hormone replacement therapy and cancer risk. *Curr Opin Oncol.* 2001;13:384-9

12. Sánchez A, Puche R, Zeni S, et al. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea. *Reemo*. 2003; 12:14-29.
13. Estrada M, Ferrer A, Borràs A, Benítez D, Espallargues M. Guía para la indicación de la densitometría ósea en la valoración del riesgo de fractura y en el control evolutivo de la osteoporosis [en línea] 2006 [fecha de acceso 18 de noviembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.gencat.cat/salut/depsan/units/aatrm/pdf/gp0601es.pdf>
14. Silva R. Menopausia y terapia de reemplazo hormonal. [Revista médica]. 2004;Vol. 14 N° 04
15. Gortázar A. Los fitoestrógenos como agentes moduladores del metabolismo óseo. Laboratorio de metabolismo mineral y óseo. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. *REEMO*. 2006; 15(2):34-6.
16. Anderson J, Garner S. Phytoestrogens and bone. *Clin Endocrinol Metab*. 1998; 12:543- 57.
17. Anderson J, Messina M, Garner S. Effects of phyto-estrogens on tissues. *Nutr Res Rev*. 1999; 12:75-116.
18. Masayoshi Y. Isoflavone and Bone Metabolism: Its Cellular Mechanism and Preventive Role in Bone Loss. Review. University of Shizuoka, Japan. *Rev. Journal of Health Science* 2002; 48(3) 209-222.
19. Álvarez F. Fondo Nacional de la Panela, perfil de la panela. [Revista Online]. Sistema De Inteligencia De Mercados - SIM, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2004. Pp.: 2-4
20. Chen C. El Manual del Azúcar de Caña. 11ª ed. D.F. México. Ed. Limusa. S.A. México; 1991. pp: 56,162-177, 235-237, 496,497.
21. Newton K, LaCroix A, Levy, Potter J, Lampe J. Soy protein and bone mineral density in older men and women: A randomized trial. Washington, USA. *ELSEVIER. Maturitas* 55: 270–277, 2006.
22. Albert C, Altabre F, Baró E, Buendía A, Cabero M, Cancelo C, Castelo B. Efficacy and safety of a phytoestrogen preparation derived from *Glycine max* (L.) Merr in climacteric symptomatology: A multicentric, open, prospective and non-randomized trial. España, *Rev. Phytomedicine*. 2002; Vol. 9: 85–92

23. Bahram A, Lee A, Bruce H, Daxa A, Stacewicz M, Pellin Q, Subhash K. Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. Chicago, USA. American Institute of Nutrition. Rev. JN THE JOURNAL OF NUTRITION. 1996; Vol. 126: 161-167.
24. Brem, Juan J, Trulls, Horacio E, Ortíz de Rus, María L, Picot, José A, Brem, José C. Concentración de minerales en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno y progesterona. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Veterinarias. Argentina; 2005. pp:11
25. Landa C. Papel de la terapia hormonal sustitutiva, en la prevención y tratamiento de la osteoporosis menopáusica. Centro de Atención a la Mujer. Pamplona. España; 2003. pp:99-105
26. Aguilar A, Avalos E. Efecto del suplemento dietético “Chancaca” sobre descalcificación inducida con una corticoterapia en megadosis por 30 días. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2000. pp:18-25
27. Cardozo C, Mrad A, Martínez C, Rodríguez E, Lolos F. El animal como sujeto experimental. Aspectos Técnicos y Éticos. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB). Universidad de Chile. Chile; 2007.
28. Alva S, Gutiérrez M, Gonzales A y col. Manual de prácticas de laboratorio. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Perú; 2011; pp.: 64,65
29. Brem J, Trulls J, Horacio E, Ortíz L, Picot A. Concentración de minerales en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno y progesterona. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Veterinarias. Argentina; 2005. pp:11
30. Taguchi H, Chen H, Yano R, Shoumura S. Comparative Effects of Milk and Soymilk on Bone Loss in Adult Ovariectomized Osteoporosis Rat. Department of Anatomy, Gifu University Graduate School of Medicine. JAPAN. August, 2006.
31. Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Okumura T and Shoumura S. Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur. *Histol Histopathol* 2002; 17:1129–1135.
32. Kalu D. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1995; 15:175–191.

33. Omi N. Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptide on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *Rev. J Nutr Sci Vitaminol* 2004; 40:201–211.
34. Feskanich D, Willett W and Colditz G. Calcium, vitamin D, milk consumption, and hip fractures: a prospective study among postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:504–511.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANEXOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANEXO I: Valores promedios de calcio en sangre (mg/dL) en *Rattus rattus var albinus* de los grupos antes y después de la ovariectomía y el tratamiento.

GRUPOS	BASAL	POST-OVARIECTOMIA (28 días)	POST-TRATAMIENTO (45 días)
Control (n=6)	6.31±1.22	8.18±0.60	8.24±0.20
Problema I (n=6)	8.47±0.93*	8.63±1.57*	5.71±1.65*
Problema II (n=6)	7.65±0.82*	8.11±1.53*	6.18±0.98*
PROMEDIO	7.47±1.31	8.31±1.25	-----

Donde: n: número de especímenes en estudio

P<0.05 comparado con el grupo control (test de ANOVA)

*: Promedio de las determinaciones de calcemia en cada grupo ± la desviación estándar.

ANEXO II: Análisis de varianza (ANOVA) de los valores de calcemia después del tratamiento con la panela de *Saccharum officinarum* y con la leche de *Glycine max* en *Rattus rattus var albinus*.

GRUPOS	Tamaño muestral	Suma	Media	Varianza	
Post Tratamiento	Control	6	49.46	8.243333333	0.04110667
	Problema I	6	34.24	5.706666667	2.71910667
	Problema II	6	37.1	6.183333333	0.95826667

FUENTE	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Post Tratamiento	21.81097778	2	10.90548889	8.79834413	0.00296404	3.682320344
Error	18.5924	15	1.239493333			
Total	40.40337778	17				

ANEXO III: TITULACIÓN DEL DULCE DE CAÑA DE AZÚCAR “CHANCACA”

- Factorizando EDTA

EDTA 0.01 M
F=?
GT = 10 ml
GP = 9,8 ml

Agregar:
- 10 ml CaCO_3 0.01M F:1
- 1 ml NaOH 10% P/V
- X g. de azul de hidroxinaftol

Titulamos hasta color azul

- Titulación de Calcio contenido en Chancaca

EDTA 0.01 M
F= 1.0204
Gt = 20 ml
Gp =20.408

Agregar:
- Muestra Chancaca
- 50 ml H_2O
- 5 ml. HCl cc
- 2 ml NaOH 10% P/V
-15.2 g. de azul de hidroxinaftol

Titulamos hasta color azul

ANEXO IV: RESULTADOS PARA LA DOSIFICACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO COMPLEXOMÉTRICO DE CONNORS

✚ PARA TITULACIÓN DE SACCHARUM OFFICINARUM

Calculando Volumen:

Gasto = 2.8 ml EDTA 0.01 M

1ml EDTA 0.01 M----- 0.4008 mg Ca²⁺

2.8 ml EDTA 0.01 M----- X

X = 1.12224 mg Ca²⁺

1.12224 mg Ca²⁺----- 50 ml dilución

X ----- 100 ml dilución

X = 2.24 mg Ca²⁺

2.24 mg Ca²⁺----- 10 ml dilución

1 g chancaca → 2.24 mg Ca²⁺

Preparación de la Solución de Chancaca: Se preparó en promedio 9 g de chancaca/90 ml de agua (cantidad equivalente a 20 mg de calcio iónico)

Dosificación: Se le administró 3.5 ml diarios por 4 semanas.

2.24 mg Ca²⁺----- 10 ml

0.224 mg Ca²⁺ -----1ml.

✚ PARA TITULACIÓN DE GLYCINE MAX:

Calculando Volumen:

Gasto = 5.1 ml EDTA 0.01 M

1ml EDTA 0.01 M----- 0.4008 mg Ca²⁺

5.1 ml EDTA 0.01 M----- X

$$X = 2.04408 \text{ mg Ca}^{2+}$$

2.04408 mg Ca²⁺----- 50 ml dilución

X ----- 100 ml dilución

$$X = 4.1 \text{ mg Ca}^{2+}$$

4.1 mg Ca²⁺----- 10 ml dilución

X ----- 100 ml dilución

$$X = 41 \text{ mg Ca}^{2+}$$

10 g Soya → 41 mg Ca²⁺

1 g Soya → 4.1 mg Ca²⁺

Preparación de la Solución de Soya: Se preparó en promedio 5 g de Soya/50 ml de agua (cantidad equivalente a 20 mg de calcio iónico)

Dosificación: Se le administro 2 ml diarios por 4 semanas.

41 mg Ca²⁺----- 100 ml

0.41 mg Ca²⁺ -----1ml.

ANEXO V: ESQUEMA DE PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE *Saccharum Officinarum*

Colocamos el agua a hervir y posteriormente colocamos la chancaca.



Colocamos en trozos pequeños la chancaca para que sea más fácil su disolución (nos ayudamos con una varilla). Luego de disuelto, dejamos enfriar.



Colocamos la sonda nasogástrica al espécimen.



Procedemos a la administración del preparado de la chancaca.



BIBLIOTECA

ANEXO VI: ESQUEMA DE PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA LECHE DE *Glycine Max*



Pesamos previamente la soya



Repetimos el procedimiento de la chancaca para posteriormente dejar enfriar y quedar preparado para la administración.

Preparamos al espécimen colocándole la sonda nasogástrica previo a la administración de leche de soya.





Luego de colocar la sonda a los especímenes, administramos la leche de soya a dosis determinadas previamente.

ANEXO VII: ESQUEMA DE LA TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y LA DETERMINACIÓN DE CALCIO SÉRICO EN LAS 3 ESTADIOS DE LA EXPERIENCIA

➤ TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS:



Se realizó un corte en la parte terminal de la cola y se introdujo una pequeña lanceta estéril a una profundidad de 2 a 3 cm



Se dejó que la sangre salga libremente descartándose la primera gota.

Se recogió la sangre directamente en capilares heparinizados.



Frotamos la herida con **Yodo Povidona**.



Luego centrifugamos y separamos el suero de cada uno de ellos.



➤ **DETERMINACIÓN DE CALCIO EN SANGRE.**

Método colorimétrico directo para la determinación de calcio sérico.

1. Se procedió a realizar la preparación del BLANCO interno.



Se utilizó 50 μL de reactivo o-cresolftalein complexona y 2 mL de agua destilada.

2. Preparación del STÁNDAR



Se añadió 20 μL de solución Standard de calcio (10mg/dL) más 50 μL de reactivo o-cresolftalein

3. Preparaciones de los **DESCONOCIDOS** o **MUESTRAS** de suero de los animales del grupo control, problema I y II.

Se agregó 20 μL de suero de los animales en experimentación más 50 μL de reactivo o-cresoltalein complexona complexona.



Finalmente se procedió a leer las absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm.



Estas lecturas hechas al inicio de la experiencia constituyeron los valores basales de calcio hemático. Luego se repitió el mismo procedimiento para la total recuperación de los especímenes, POST-CIRUGÍA (Ovariectomía), y para la finalización de la experiencia, POST-TRATAMIENTO.

ANEXO VIII: CANTIDAD DE CALCIO EN SANGRE (mg/dL) EN CADA GRUPO DE EXPERIMENTACIÓN

GRUPOS	CALCIO BASAL	CALCIO POST OVARECTOMIA	CALCIO POST TRATAMIENTO
Control 1 (C1)	5.64	8.13	8.22
Control 2 (C2)	4.81	7.28	8.15
Control 3 (C3)	8.47	9.12	7.97
Control 4 (C4)	6.44	8.31	8.28
Control 5 (C5)	6.15	7.92	8.25
Control 6 (C6)	6.33	8.29	8.59
Promedio Control	6.31	8.18	8.24
Problema I-1	9.61	11.13	8.46
Problema I-2	7.58	7.87	4.94
Problema I-3	8.66	8.83	6.61
Problema I-4	7.17	6.31	5.72
Problema I-5	9.20	8.73	3.81
Problema I-6	8.59	8.93	4.70
Promedio Problema I	8.47	8.63	5.71
Problema II-1	8.07	8.66	6.17
Problema II-2	8.41	9.43	5.53
Problema II-3	8.31	8.72	7.26
Problema II-4	6.56	5.23	7.36
Problema II-5	6.68	7.63	4.86
Problema II-6	7.85	8.97	5.92
Promedio Problema II	7.65	8.11	6.18
PROMEDIO TOTAL	7.47	8.31	-