



**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE UNA
DEXTRANA EN ROEDORES DE LABORATORIO.**

CLAUDIA JIMENA AVENDAÑO AYALA
Código 192522

Tesis para optar al título de:

Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Director

Prof. PhD.Luis Fernando Ospina G.

Co-director

Prof. MSc. Olga Cobos

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ÁREA CURRICULAR DE FARMACIA
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Bogotá D.C, mayo de 2010**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente al profesor LUIS FERNANDO OSPINA G. por todo su apoyo, orientación, paciencia y colaboración durante todo el camino.

A Marcela Aragón y Nadezdha Vergel por su valiosa amistad y ayuda incondicional que me acompañaron durante mas de un año.

A las profesoras Sonia Amparo Ospina y Olga Cobos por su apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

A mis amigos de maestría por apoyarme y creer en mí en todo momento.

DEDICATORIA

A Dios por mostrarme la luz en el camino justo cuando lo necesitaba y por darme la fuerza y valor necesario para continuar sin desfallecer.

A mis padres quienes han sido el apoyo incondicional para la realización tanto de este como de todos los proyectos de mi vida.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos por su inmensa alegría que llenan mi vida de esperanza cada día.

TABLA DE CONTENIDO

	Págs
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	13
PARTE 1. GENERALIDADES SOBRE ALIMENTOS FUNCIONALES Y EL POLÍMERO TIPO DEXTRANA	14
1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES: FIBRA DIETARIA	15
1.1.1 Efectos fisiológicos y bioquímicos de la fibra	16
1.2 POLÍMERO TIPO DEXTRANA	17
1.2.1 Caracterización del PD-IBUN	18
1.2.1.1 Solubilidad del PD-IBUN	20
1.2.1.2 Estabilidad térmica del PD-IBUN	20
1.2.1.3 Absorción de humedad del PD-IBUN	21
1.2.1.4 Ensayos de toxicidad del PD-IBUN	21
1.3 METODOLOGÍA	21
PARTE 2. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE LA RESPUESTA GLUCÉMICA	23
2.1 ASPECTOS TEÓRICOS	24
2.1.1 Generalidades de la diabetes mellitas	24
2.1.1.1 Potencial de la fibra dietaria en la diabetes mellitas	24
2.1.1.2 Diabetes mellitus tipo II	25
2.1.1.3 Epidemiología de la diabetes mellitus tipo II	26

2.1.1.4 Indicadores de glucosa en sangre	28
2.1.1.4.1 Índice glucémico	28
2.2 PARTE EXPERIMENTAL	28
2.2.1 Materiales y equipos	28
2.2.2 Metodología	29
2.2.2.1 Ensayo en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria por sobrecarga oral de glucosa	29
2.2.2.2 Ensayo en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria por sobrecarga oral de maltosa, sacarosa y almidón	30
2.2.2.3 Ensayo de administración repetida de PD-IBUN y sobrecarga de glucosa en roedores de laboratorio normoglucémicos	31
2.2.2.4 Análisis estadístico	31
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
2.3.1 Ensayos en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria	32
2.3.2 Ensayo de Administración repetida del PD-IBUN y sobrecarga de glucosa en roedores de laboratorio normoglucémicos	39
PARTE 3. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE EL PERFÍL LIPÍDICO	42
3.1 PERFÍL LIPÍDICO	43
3.1.1 Generalidades de las lipoproteínas	43
3.1.2 El colesterol	43
3.1.3 Los triglicéridos	44
3.1.4 Fibra y colesterol	45
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	46
3.2.1 Materiales y equipos	46
3.2.2 Metodología	47

3.2.2.1 Efecto del PD-IBUN en ratas Wistar con hiperlipidemia inducida por tyloxapol	47
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
PARTE 4. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE LA ACTIVIDAD INTESTINAL	53
4.1 TRÁNSITO INTESTINAL	54
4.1.1 Actividad gastrointestinal	54
4.1.2 Fibra dietaria y actividad gastrointestinal	56
4.1.1 Efectos fisiológicos	56
4.2 PARTE EXPERIMENTAL	56
4.2.1 Materiales y equipos	56
4.2.2 Metodología	57
4.2.2.1 Ensayo de tránsito parcial en el tracto gastrointestinal	57
4.2.2.2 Ensayo de tránsito total en el tracto gastrointestinal	57
4.2.2.4 Análisis estadístico	58
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.3.1 Ensayo de tránsito en tracto gastrointestinal parcial	58
4.3.2 Ensayo de tránsito total en tracto gastrointestinal	60
PARTE 5. PANORAMA GENERAL Y CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

	Págs
Tabla 1. Análisis nutricional del polímero tipo dextrana	19
Tabla 2. Solubilidad del biopolímero tipo dextrana en diferentes solventes	20
Tabla 3. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en el modelo de hiperglucemia por sobrecarga oral de glucosa	33
Tabla 4. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en el modelo de hiperglucemia transitoria por sobrecarga con sacarosa	35
Tabla 5. Efecto del PD-IBUN en los NGS en la hiperglucemia por sobrecarga con maltosa	36
Tabla 6. Efecto del PD-IBUN en la hiperglucemia por sobrecarga con almidón en los NGS	37
Tabla 7. Esquema de administración de tratamientos para el ensayo de hiperlipidemia inducida	47
Tabla 8. Evaluación del efecto del PD-IBUN sobre niveles de colesterol en ratas Wistar hiperlipidémicas	49
Tabla 9. Evaluación del efecto del PD-IBUN sobre los niveles de triglicéridos en ratas Wistar hiperlipidémicas por tyloxapol de hiperlipidemia en niveles de triglicéridos	51
Tabla 10. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal parcial en Ratas Wistar	59
Tabla 11. Efecto del PD-IBUN sobre el tiempo tránsito intestinal total en ratones ICR	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs
Figura 1. Polímero tipo dextrana en polvo	18
Figura 2. Estructura del polímero tipo dextrana	19
Figura 3. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de glucosa ratones ICR	32
Figura N°4. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga de glucosa en ratones ICR (ensayo preeliminar)	34
Figura 5. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS con sobrecarga oral de sacarosa en ratones ICR	35
Figura 6. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de maltosa en ratones ICR	37
Figura 7. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de almidón en ratones ICR	38
Figura 8. Efecto de la administración repetida del PD-IBUN en los NGS en ratones ICR	40
Figura 9. Estructura del colesterol	44
Figura 10. Estructura de los triglicéridos	45
Figura 11. Efecto del PD-IBUN sobre los niveles de colesterol en ratas Wistar en condiciones de hiperlipidemia	50
Figura 12. Efecto del PD-IBUN sobre niveles de triglicéridos en ratas Wistar en condiciones de hiperlipidemia	52
Figura 13. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal parcial en ratas Wistar	60
Figura 14. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal total en ratones ICR	61

RESUMEN

La evaluación del polímero tipo dextrana (PD-IBUN), elaborado por tecnología de enzimas, fue realizada en roedores de laboratorio teniendo en cuenta dos parámetros, el primero bioquímico, evaluando el posible efecto hipoglucemiante e hipolipemiante y el segundo, a nivel fisiológico, para determinar la actividad a nivel gastrointestinal.

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante en ratones de laboratorio, el PD-IBUN se empleó en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg, en sobrecargas de glucosa y carbohidratos como maltosa, sacarosa y almidón frente a diferentes patrones como la glibenclamida y la acarbosa. Por otro lado, se realizó un ensayo de administración repetida donde el PD-IBUN fue administrado en las mismas dosis mencionadas pero en un periodo de 15 días. Para la evaluación del posible efecto antihiperlipemiante se empleó un modelo de hipercolesterolemia inducida por tyloxapol en ratas. Los resultados mostraron que el PD-IBUN en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg no disminuye significativamente los parámetros bioquímicos evaluados: glucosa, colesterol y triglicéridos.

El efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal fue evaluado en dos ensayos diferentes: actividad de tránsito intestinal parcial y actividad de tránsito intestinal total. La primera de ellas fue realizada en roedores de laboratorio administrando el PD-IBUN en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg, utilizando la técnica del carbón activado (Lapa & col., 2001). La prueba de tránsito intestinal total fue realizada con las mismas dosis del PD-IBUN. En este caso, el marcador utilizado fue el rojo carmín, el cual permitió realizar el conteo y estimar el tiempo de evacuación de heces fecales con coloración roja. Los resultados mostraron que la dosis de PD-IBUN 400 mg/kg incrementa el tránsito intestinal y disminuye los tiempos de retención en el intestino.

En conclusión, dentro de los efectos bioquímicos y fisiológicos del PD-IBUN se destaca su posible papel como fibra soluble en la reducción de los tiempos de tránsito intestinal total.

Palabras clave: Polímero, dextrana, hiperglucemia, hiperlipidemia, tránsito intestinal.

ABSTRACT

The evaluation of the polymer dextran-like, produced by enzyme technology was conducted in laboratory rodents, taking into account two parameters, the first biochemical, evaluating the possible hypoglycemic and hipolypemic effect and the second, related to the physiological activity, determining the functionality on the gastrointestinal tract.

To evaluate the hypoglycemic effect, PD-IBUN was used in doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg body weight, glucose and carbohydrate overload as maltose, sucrose and starch against different patterns such as glibenclamide and acarbose were also used. The administration conducted a prolonged trial where the PD-IBUN was administered within the same doses mentioned but in a period of 15 days. The results showed that PD-IBUN in doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg does not significantly decreases the biochemical parameters assessed such as glucose, cholesterol and triglycerides. To evaluate the possible anti-hiperlipidemic effect, it was used the hypercholesterolemia tyloxapol induced model in rats. The results showed that PD-IBUN in doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg did not significantly lower the assessed biochemical parameters: glucose, cholesterol and triglycerides.

The effect of PD-IBUN on intestinal transit was evaluated in two different tests: partial intestinal transit activity, and total intestinal transit activity. The first one was conducted by administering PD-IBUN in 200 mg/kg and 400 mg/kg doses to laboratory rodents, using the technique of activated charcoal (Lapa & col., 2001). The total intestinal transit test was conducted with the same doses of PD-IBUN, in this case the marker carmine red was used to allow the counting and estimating the evacuation time of red stools. The results showed that the PD-IBUN dose of 400 mg/kg increased the intestinal transit and decreases the retention times in the gut.

In conclusion, within the biochemical and physiological effects of the PD-IBUN it is highlighted its possible role as soluble fiber in reducing the total intestinal transit time.

Keywords: polymer, dextran, hyperglycemia, hyperlipidemia, intestinal transit.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las enfermedades crónicas no transmisibles se han convertido en un problema epidemiológico en ascenso que afecta la salud pública. Diversos factores como el ritmo de vida, la edad, el sedentarismo y los hábitos alimentarios favorecen el desarrollo de estas enfermedades sin discriminar sexo, edad, raza o condición social (Grenier,2007).

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el control de diferentes trastornos metabólicos, como por ejemplo la diabetes, el objeto de este estudio fue determinar las propiedades sobre la respuesta glucémica y perfil lipídico del polímero tipo dextrana como fuente de fibra soluble además de su potencial actividad reguladora en el tracto intestinal en roedores de laboratorio, que permitieran obtener conclusiones sobre la funcionalidad del polímero que finalmente puedan llegar a ser usadas en la población humana en función de la mejora de la calidad de vida.

Actualmente el tratamiento farmacológico más frecuente de la diabetes mellitus tipo II, se realiza mediante el uso de hipoglicemiantes orales (sulfonilúreas y biguanidas) y/o insulina. Sin embargo, el uso de productos naturales, tales como extractos de plantas, que tienen un gran valor dentro de la población, son usados de manera masiva. Según información etnobotánica mundial, se emplean alrededor de 800 plantas y existen como evidencia del control de la diabetes mellitus (Marroquín & col, 2005). El desarrollo de estudios relacionados con la actividad hipoglicemiante obtenidos de fuentes naturales puede llevar al perfeccionamiento de fármacos con utilidad terapéutica potencial para el tratamiento de dicha enfermedad.

De acuerdo a estadísticas de la Asociación Latinoamericana de Diabetes, en el año 2003 se reportaron 194 millones de diabéticos en el mundo y se calculaban 215 millones de diabéticos para el 2010. Por otro lado, en 21 países de Latinoamérica, es decir aproximadamente 500 millones de habitantes, se reportaron 15 millones de casos de diabetes mellitus y se espera que en los próximos 10 años esta cifra incremente llegando hasta unos 20 millones de casos (ALAD, 2002).

Por su parte, la prevalencia en zonas urbanas oscila entre 7 y 8%, mientras en las zonas rurales es apenas del 1 al 2%. En Colombia, la diabetes mellitus es la quinta causa de muerte en el hombre entre 45 a 64 años y la tercera en la mujer de la misma edad. En particular, enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo II (DM), son difícilmente controladas por el organismo y es necesario su tratamiento partiendo desde la educación, la dieta, el ejercicio y finalmente la utilización de medicamentos potentes para controlar el incremento de azúcar en la sangre (Marin, 2005).

Por estas razones, en los últimos años se ha evolucionado en la investigación en productos funcionales para el tratamiento de desórdenes metabólicos relacionados con la respuesta glucémica entre otros (Murillo & col., 2006). La investigación de nuevos compuestos relacionados con actividades hipoglicemiantes, se lleva a cabo en diversos lugares del mundo, cada vez lanzando a la luz pública compuestos novedosos. Es por ello que, el Instituto de Biotecnología, el grupo de Bioprospección y Bioprocesos, realiza investigación aplicada con el objeto de obtener productos y servicios a partir de microorganismos nativos colombianos, ya que en Colombia se han realizado diversos estudios, con utilización de extractos de plantas para la evaluación del efecto hipoglicemiante en animales de experimentación (Murillo & col., 2006); sin embargo, el conocimiento de estudios sobre productos naturales derivados de microorganismos es aún muy escaso.

En este sentido, el laboratorio de Tecnología de Enzimas de la Universidad Nacional de Colombia, desarrolló un proceso para la obtención de un polímero de glucosa tipo dextrana que contiene un alto porcentaje de fibra soluble a partir de bacterias nativas. Estudios han demostrado que el aumento en la ingesta de fibra dietaria, particularmente de tipo soluble, mejora el control de la glicemia, disminuye la hiperinsulinemia y las concentraciones plasmáticas de lípidos en los diabéticos tipo II, lo que confiere un perfil idóneo de protección cardiovascular. Por otro lado, el uso de fibra soluble, aumenta la actividad gastrointestinal, lo que conlleva a la disminución de complicaciones en el intestino como el cáncer de colon y diverticulitis, además de otras enfermedades de diversas causas (Tungland & Meyer, 2002).

De esta forma, el uso de productos novedosos en el campo de alimentos funcionales requiere del estudio de sus propiedades benéficas, previo al desarrollo de potenciales usos del mismo. Por esta razón es importante la comprobación de dichas propiedades en el polímero tipo dextrana, estableciendo además metodologías estandarizadas para el análisis de este tipo de producto.

Es así como fue proyectada la evaluación del polímero tipo dextrana, desarrollado en el IBUN, y su papel en la respuesta glucémica, además del perfil lipídico y su función como fibra soluble en la motilidad del tracto gastrointestinal en roedores de laboratorio.

El polímero tipo dextrana producido por *Leconostoc mesenteroides* mediante tecnología de enzimas desarrollado en el IBUN, tiene un peso molecular de 850 KDa, resistente a las condiciones adversas y tiene una alta solubilidad en agua, características que fueron consideradas para el desarrollo de este proyecto. Por esta razón, el polímero tipo dextrana fue considerado tener un potencial importante para el desarrollo de productos funcionales que contemplan la fibra soluble y es por esto que la actividad de esta “fibra” fue evaluada de manera experimental. De esta manera se puede destacar la importancia de realizar estudios entorno a dicho compuesto y su relación con el efecto sobre la respuesta glucémica, colesterol y su actividad fisiológica sobre el tracto gastrointestinal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar algunos de los efectos bioquímicos y fisiológicos de una dextrana, como fuente de fibra soluble, obtenido por tecnología de enzimas, en pequeños roedores de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la administración repetida de una dextrana sobre la respuesta glucémica, en roedores de laboratorio.
- Evaluar el efecto de una dextrana sobre el perfil lipídico en roedores de laboratorio.
- Evaluar el efecto de una dextrana, sobre la velocidad de tránsito intestinal parcial y total en roedores de laboratorio.

**PARTE 1. GENERALIDADES SOBRE ALIMENTOS FUNCIONALES Y EL POLÍMERO
TIPO DEXTRANA**

PARTE 1. GENERALIDADES SOBRE ALIMENTOS FUNCIONALES Y EL POLÍMERO TIPO DEXTRANA

1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES: FIBRA DIETARIA

La vida diaria y la energía de los organismos vivos se encuentran soportadas de acuerdo a su alimentación. La función más importante de los alimentos es proveer nutrientes necesarios para contribuir con la reserva energética de los individuos. Sin embargo, existen algunos alimentos que debido a sus características especiales cumplen diferentes funciones en los seres que los consumen. Algunos de esos alimentos pueden promover efectos fisiológicos benéficos adicionales a los nutricionales, lo que se ha denominado como “función blanco”. (Cobos, 2004 ; Lenieswska & Rowland, 2006).

Los alimentos funcionales, investigados ampliamente desde 1980, son aquellos que contienen ingredientes activos los cuales benefician a una o un número de funciones en el cuerpo proporcionando bienestar y salud en la reducción del riesgo de una enfermedad ; o aquel alimento que tiene un efecto fisiológico mas allá de su efecto tradicional (Cobos, 2004),

Los componentes de los alimentos funcionales pueden ser prebióticos, probióticos o componentes bioactivos que tienen un efecto fisiológico específico (por ejemplo almidón resistente o ácidos grasos) o componentes con un valor nutritivo no esencial por ejemplo: oligosacáridos.

Una categoría de los alimentos funcionales que tiene gran interés de la población, la industria alimentaria y la comunidad científica, son los ingredientes prebióticos y la fibra dietaria, los cuales pueden modificar positivamente los procesos fisiológicos y biológicos en la nutrición o como auxiliar en el tratamiento de ciertas patologías humanas.

Por otro lado, se encuentra la fibra dietaria la cual se puede definir como la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y

absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso, la cual está presente en diferentes alimentos y puede ser clasificada de manera general en fibra insoluble y soluble (Haro, 2007).

La fibra insoluble se refiere a los componentes de la fibra dietaria que son insolubles en agua. Este tipo de fibra es aquella que es difícilmente fermentable en el intestino, dentro de las cuales se incluye la celulosa y la lignina principalmente. La fibra soluble por su parte, se refiere a aquella fibra que es soluble en agua, la cual forma un gel al hidratarse; está constituida por las pectinas, hemicelulosas, betaglucanos, fructanos, oligosacáridos, y gomas, entre otros. Este tipo de fibra se encuentra generalmente en alimentos fuente como las legumbres, las frutas, semillas, etc (Theuwissen & Mensink, 2008).

Así mismo, se ha encontrado en diversas investigaciones que la fibra soluble contribuye a estabilizar en pacientes diabéticos niveles de colesterol y azúcar en sangre, además de contribuir con la reducción en el riesgo cardiovascular (Tunland & Meyer, 2002). Todo esto es debido a que la fibra soluble hace lento el proceso de digestión y ayuda al cuerpo en la absorción de los nutrientes vitales de los alimentos.

1.1.1 Efectos fisiológicos y bioquímicos de la fibra

De acuerdo a diversos estudios, actualmente es reconocido a nivel mundial que la fibra dietaria, tanto la fracción soluble como insoluble, juegan un papel significativo en la prevención de diversas enfermedades y que las dietas con alto contenido de fibra, tales como aquellas ricas en cereales, frutas y vegetales, tienen un efecto positivo sobre la salud desde que su consumo se ha visto relacionado con la disminución en la incidencia de varios tipos de cáncer (Jiménez-Escribano & col., 2001).

Además de esto, se ha establecido que la fibra dietaria puede influenciar la velocidad de absorción de glucosa en el tracto intestinal. Este efecto ha sido comprobado en pacientes diabéticos, cuyos niveles de glucosa en sangre disminuye al consumir dietas ricas en fibra. También se ha descubierto que la fibra dietaria actúa como factor protector en contra de enfermedades cardiovasculares, diverticulosis, constipación, colon irritable, cáncer y diabetes mellitus (Rodríguez, 2006).

La fracción soluble de la fibra parece estar relacionada con la disminución de niveles de colesterol y la absorción de glucosa intestinal, mientras que la fracción insoluble parece estar relacionada con la regulación intestinal (Rodríguez, 2006).

Dentro del estudio de alimentos funcionales aparecen entonces, como antes se mencionan, los prebióticos y la fibra dietaria. Los criterios para la clasificación de ingredientes prebióticos son los siguientes: resistencia a la digestión, hidrólisis y fermentación causada por la microflora y, la más importante, estimulación selectiva de crecimiento de una o un número limitado de bacteria en heces fecales (en humanos). La resistencia a la digestión debería mostrar un método adecuado para los pacientes con problemas en el colon: colitis, úlcera y cáncer (Rodríguez, 2006).

Dentro de los efectos fisiológicos y bioquímicos de la fibra dietaria se pueden mencionar, entre otros, el aumento de la motilidad, el intercambio de cationes, la regulación intestinal.

1.2 POLÍMERO TIPO DEXTRANA

El polímero tipo dextrana, de ahora en adelante mencionado como PD-IBUN, fue desarrollado en el IBUN y extraído de microorganismos nativos colombianos no modificados genéticamente, de la especie *Leuconostoc mesenteroides*, con actividad transferasa (Saenz & Prado, 1998). Este microorganismo corresponde a una cepa catalogada como GRAS (Generally Recognized As Safe). El polímero ha sido obtenido por tecnología de enzimas empleando como sustrato sacarosa y una glucosiltransferasa obtenida por fermentación empleando el microorganismo nativo colombiano.

El PD-IBUN ha demostrado tener diferentes propiedades, dentro de las cuales se ha confirmado que el biopolímero está compuesto de glucosa y posee altas calidades fisiológicas y bioquímicas. Por otro lado, el proceso productivo se ha desarrollado en niveles de laboratorio y se ha llevado hasta planta piloto, de manera que se han estandarizado las operaciones unitarias que lo conforman hasta este nivel. Dentro de los estudios de caracterización realizados al polímero obtenido por tecnología de enzimas, se ha identificado que éste está compuesto en gran porcentaje por fibra soluble y debido a eso es necesario comprobar sus características funcionales.



Figura 1. PD-IBUN en polvo.

El PD-IBUN, es un producto promisorio en el campo de las industrias Química Farmacéutica y de Alimentos; que por sus propiedades fisicoquímicas y estructurales presenta aplicaciones potenciales como: agente viscosante, hidrogelificante, formador de cápsulas, aportador no calórico de fibra dietaria en alimentos y polímero formador de películas protectoras de frutas. Es un producto biotecnológico completamente biodegradable e inocuo (figura 1); que emplea Tecnologías Limpias de Producción (IBUN) (García, 2000).

1.2.1 Caracterización del PD-IBUN

Se trata de un polímero compuesto por unidades de glucosa unidas por enlace alfa 1-6, tipo dextrana (figura 2), que presenta características interesantes tales como alta solubilidad en agua, incremento de la viscosidad de las soluciones a altas concentraciones de polímero.

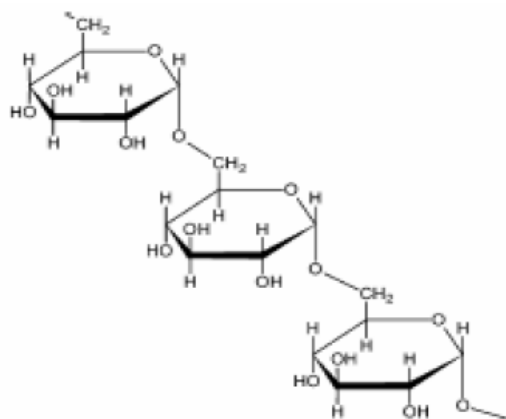


Figura 2. Estructura general del PD-IBUN.

Dentro de la caracterización del PD-IBUN previamente realizada por el grupo de tecnología de enzimas, se determinaron las siguientes características: su peso molecular es de 850 KDa, contiene un porcentaje de humedad del 10%, tiene un pH de 6.6 en solución acuosa. El porcentaje de fibra soluble es del 84.7%, la fibra dietaria total es el 86.1% (tabla 1).

Tabla 1. Análisis nutricional del PD-IBUN.

Componente	Resultado	Método de análisis
Agua	9.96%	A.O.A.C. 932.12 gravimetría
Proteína	1.42%	A.O.A.C. 920.152 Kjeldahl
Carbohidratos	84.74%	
Minerales	1.51%	A.O.A.C. 940.26
Fibra dietaria total (FDT)	86.17%	A.O.A.C. 985.29
Fibra dietaria insoluble (FDI)	1.37%	A.O.A.C. 1991.42
Fibra dietaria soluble (FDS)	84.79%	FDT – FDI = FDS.

Tomado de la ficha técnica del PD-IBUN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

1.2.1.1 Solubilidad del PD-IBUN

En cuanto a la solubilidad, el biopolímero es hidrosoluble, formando dispersiones homogéneas tipo hidrogel. Forma soluciones homogéneas en agua en concentraciones (peso/volumen) hasta del 20% como se observa en la tabla 2. (Giraldo, 2002).

Tabla 2. Solubilidad del PD-IBUN en diferentes solventes.

Solvente	Solubilidad
Agua destilada	200g/L
Acido clorhídrico 5%	31 g/L
Hidróxido de sodio 10%	20 g/L
Acido acético glacial	30 g/L
Aceite mineral	Insoluble
Aceite vegetal	Insoluble
Etanol (50%)	23 g/L
Isopropanol	Insoluble
Metanol	Insoluble
Acetona	Insoluble
PEG (400)	Insoluble

Tomado de la ficha técnica del PD-IBUN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

1.2.1.2 Estabilidad térmica del PD-IBUN

Por otro lado, la estabilidad térmica del polímero es superior a muchos otros polisacáridos solubles en agua, ya que mantiene su integridad química y física hasta alcanzar una temperatura de 180°C, donde presenta su punto de descomposición. Debido a esta propiedad, el polímero puede mantenerse en diversas condiciones como refrigeración, temperatura ambiente, sin llegar a afectar sus propiedades fisicoquímicas o reológicas (Giraldo, 2002).

1.2.1.3 Absorción de humedad del PD-IBUN

La capacidad de absorción de agua oscila entre 60 y 150 mg de agua por gramo de biopolímero, dependiendo de la humedad relativa a la cual esté expuesto en el almacenamiento; esto lo hace un material ligeramente higroscópico.

El PD-IBUN es compatible con biopolímeros solubles en agua, formando mezclas homogéneas con gelatina, carragenina, almidones modificados, peptinas, carboximetil celulosa (CMC) y goma xantana. Forma mezclas homogéneas con glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, glucosa y fructosa.

El polímero forma películas rígidas y flexibles empleando diferentes formulaciones con plastificantes. (Giraldo, 2002).

1.2.1.4 Ensayos de toxicidad del PD-IBUN

Por otra parte, se ha demostrado en pruebas *in vivo* en animales que no posee propiedades tóxicas, aún a dosis muy altas, ya que ha sido probado en animales mediante ensayos toxicológicos agudos y subagudos demostrando su inocuidad hasta niveles de más de 2000 mg/kg peso para la toxicidad aguda y 900 mg/kg/ por día para la toxicidad a dosis repetidas durante 28 días, por lo cual es considerado como no tóxico. Se encuentra en proceso la aprobación su registro sanitario por parte de las entidades regulatorias de nuestro país.

1.3 METODOLOGÍA

Se utilizó el PD-IBUN desarrollado en el IBUN obtenido por tecnología de enzimas (PD-IBUN), se tomó de un mismo lote de producción de la planta piloto asegurando la continuidad de los ensayos.

Para la realización de ensayos biológicos se utilizaron ratas Wistar adultas jóvenes, con un peso corporal entre 140 y 250 g, con edades entre 7 a 10 semanas y ratones ICR con

peso entre 50 a 80 g con edades entre 7 y 10 semanas, criados y mantenidos bajo condiciones estándar de fotoperíodo (12h luz/ 12h oscuridad), temperatura ambiental ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), agua y comida *ad libitum*, y esquemas de sanitización de su micro y macroambiente.

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo consideraciones éticas en cuanto al cuidado y uso de animales de experimentación .

Todos los ensayos realizados en animales de experimentación (roedores de laboratorio), fueron realizados según las normas de protección de animales de laboratorio estipulados en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

PARTE 2. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE LA RESPUESTA GLUCÉMICA

PARTE 2. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE LA RESPUESTA GLUCÉMICA

2.1 ASPECTOS TEÓRICOS

2.1.1 Generalidades de la diabetes mellitus

2.1.1.1 Potencial de la fibra dietaria en la diabetes mellitus

La fibra dietaria, definida como los componentes polisacáridos y ligninas de plantas, resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas, se ha convertido en uno de los intereses más duraderos de la última década a nivel mundial. La fibra dietaria resulta en una mezcla variada entre polisacáridos, celulosas, hemicelulosas, pectinas, gomas, mucílagos, polisacáridos de algas y ligninas, en los cuales se encuentra un gran potencial dentro del efecto hipoglucemiante de utilidad en el control de ciertas enfermedades crónicas que es de gran interés en el control de la diabetes mellitus tipo II (Moharib & EL-Batran, 2008). El porcentaje de fibra soluble de compuestos poliméricos aporta a la actividad intestinal como es indicado por Moharib y EL-Batran (2008), y la mayor reducción en la respuesta glucémica se observa con la fibra soluble, la cual incrementa la viscosidad del contenido en el tracto gastrointestinal y por tanto disminuye las tasas de digestión y absorción de carbohidratos.

La diabetes mellitus comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Existen varios tipos diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética, factores ambientales y estilo de vida. Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden comprender la disminución de la secreción de insulina, disminución de la incorporación de glucosa y un aumento en la producción de la misma (Malarca & García, 1997). En adición a los altos niveles de glucosa en sangre, la diabetes en el diagnóstico clínico está acompañada de hipercolesterolemia. Los pacientes diabéticos están expuestos a padecer riesgos cardiovasculares. Sin embargo, el mecanismo de la diabetes no es del todo claro aún, pero se cree que anomalías en el metabolismo de lípidos juegan un rol importante en su desarrollo.

Aunque no se ha comprobado que existe una relación directa entre el consumo de fibra y la diabetes mellitus (DM), existen evidencias que indican que se disminuye el riesgo de la enfermedad con el incremento en el consumo de fibra dietaria. Fibras viscosas, que hacen parte de alimentos o como suplementos dentro de la alimentación, ofrecen un potencial benéfico sobresaliente sobre la reducción de la respuesta glucémica y en el incremento de la sensibilidad a la insulina (Tungland & Meyer, 2002).

El efecto benéfico bioquímico de las fuentes de fibra en concentraciones de glucosa en la sangre se ha demostrado en las últimas dos décadas. Generalmente, se concluye que el mecanismo que explica la influencia de la fibra en la reducción de la glucemia posprandial es aún desconocido. Sin embargo, todo parece indicar que se encuentra relación entre el efecto que causa la fibra al retener carbohidratos por un periodo mayor antes de ser consumidos. Es de suponer entonces, que el acetato producido por la fermentación de la fibra es absorbido por la sangre periférica y este debe influenciar algunas de las funciones metabólicas sistémicas para lograr tal efecto. El acetato tiene influencia sobre los niveles de los ácidos grasos del serum, los cuales inhiben directamente la lipólisis en tejidos. De todas formas, el mecanismo exacto sigue en estudio, ya que es aún desconocida la forma en que la fibra conduce a la disminución de glucosa en sangre y, en contraste, se siguen evidenciando dichos efectos sobre pacientes con diabetes mellitus tipo II (Tungland & Meyer, 2002).

El interés en la DM como un problema de salud pública está aumentando en Latinoamérica. La prevención y el tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles se considera ahora una de las prioridades en países donde antes la mayoría de los recursos se destinaban a los problemas maternoinfantiles (ALAD, 2000).

2.1.1.2 Diabetes mellitus tipo II

En la diabetes mellitus tipo II el trastorno central es la resistencia de todos los tejidos periféricos a la acción de la insulina, debido a que se produce una hormona defectuosa porque existen trastornos del receptor o, lo que es más importante, a la presencia de alteraciones en los mecanismos intracelulares desencadenados por la unión de la hormona al receptor (Acosta, 2003).

La diabetes mellitus tipo II se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina que puede o no ser predominante. Ambos fenómenos deben estar presentes en algún momento para que se eleve la glucemia. Aunque no existen marcadores clínicos que indiquen con precisión cuál de los dos defectos primarios predomina en cada paciente, el exceso de peso sugiere la presencia de resistencia a la insulina mientras que la pérdida de peso sugiere una reducción progresiva en la producción de la hormona. Aunque este tipo de diabetes se presenta principalmente en el adulto, su frecuencia está aumentada en niños y adolescentes obesos (ALAD, 2000).

2.1.1.3 Epidemiología de la diabetes mellitus Tipo II

La epidemia actual de DM2 se debe a un proceso asociado a la mundialización, con cambios de estilo de vida basado en la subsistencia y un modelo de occidentalización moderno (Marín, 2005).

Existen alrededor de 15 millones de personas con DM en Latinoamérica y esta cifra llegará a 20 millones en 10 años, mucho más de lo esperado por el simple incremento poblacional. Este comportamiento epidémico probablemente se debe a varios factores entre los cuales se destacan la raza, el cambio en los hábitos de vida y el envejecimiento de la población. La mayoría de la población latinoamericana es mestiza (excepto Argentina y Uruguay), pero todavía hay algunos países como Bolivia, Perú, Ecuador y Guatemala donde más del 40% de los habitantes son indígenas (ALAD, 2000; Acosta, 2003).

Estudios en comunidades nativas americanas han demostrado una latente pero alta propensión al desarrollo de diabetes y otros problemas relacionados con resistencia a la insulina, que se hace evidente con el cambio en los hábitos de vida, lo cual está ocurriendo en forma progresiva. De hecho, entre un 20 y un 40% de la población de Centro América y la región andina todavía vive en condiciones rurales, pero su acelerada migración probablemente está influyendo sobre la incidencia de la DM2. La prevalencia en zonas urbanas oscila entre 7 y 8%, mientras en las zonas rurales es apenas del 1 al 2%.

En la mayoría de los países de Latinoamérica la tasa anual de crecimiento de la población mayor de 60 años es del orden del 3 al 4% mientras que en Estados Unidos no pasa del 0.5%. La prevalencia de diabetes mellitus tipo II en menores de 30 años es menor del 5% y después de los 60 sube a más del 20% (ALAD, 2000).

Por otro lado, la altura parece ser un factor protector. La prevalencia de diabetes mellitus tipo II en poblaciones ubicadas a más de 3.000 m.s.n.m tiene proporcionalmente una prevalencia que es casi la mitad de la encontrada en poblaciones similares desde el punto de vista étnico y socioeconómico pero ubicado a menor altura (ALAD, 2000)

La diabetes mellitus tipo II se diagnostica tardíamente. Alrededor de un 30 a 50% de las personas desconocen su problema por meses o años (en zonas rurales esto ocurre casi en el 100%) y en los estudios de sujetos con diabetes mellitus tipo II recién diagnosticada, la prevalencia de retinopatía oscila entre 16 y 21%, la de nefropatía entre 12 y 23% y la de neuropatía entre 25 y 40%. La DM2 ocupa uno de los primeros 10 lugares como causa de consulta y de mortalidad en la población adulta.

Los estudios económicos han demostrado que el mayor gasto de atención a la persona con diabetes se debe a las hospitalizaciones y que ese gasto se duplica cuando el paciente tiene una complicación micro o macrovascular y es cinco veces más alto cuando tiene ambas. La mayoría de las causas de hospitalización del diabético se pueden prevenir con una buena educación y un adecuado programa de reconocimiento temprano de las complicaciones.

La principal causa de muerte de la persona con DM2 es cardiovascular. Prevenirla implica un manejo integral de todos los factores de riesgo tales como la hiperglucemia, la dislipidemia, la hipertensión arterial, el hábito de fumar, etcétera. Todos estos factores, excepto el hábito de fumar, son más frecuentes en los diabéticos y su impacto sobre la enfermedad cardiovascular también es mayor.

2.1.1.4 Indicadores de glucosa en sangre

Existen diferentes indicadores de glucosa en sangre, los cuales se encuentran relacionados con el incremento de área bajo la curva de la respuesta de glucosa en sangre (IAUC), dos o tres horas después de la ingesta de alimentos. Dentro de algunos de los indicadores mas importantes se encuentra el índice glucémico (Monro & Shaw, 2008).

2.1.1.4.1 Índice Glucémico

El índice glucémico se refiere al efecto glucémico de carbohidratos disponibles relativos en un alimento comparado con el efecto en igual cantidad de glucosa. El índice glucémico es medido de forma indirecta, debido a que es el efecto del alimento y no de la cantidad de carbohidratos por sí mismos lo que se mide, sin embargo el efecto es atribuido a los carbohidratos y es calculado con base a carbohidratos. (Monro & Shaw, 2008).

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 Materiales y equipos

Para los ensayos realizados en la determinación de niveles de glucosa en sangre por administración oral del PD-IBUN, se utilizaron roedores de laboratorio obtenidos del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Se utilizó el PD-IBUN obtenido por tecnología de enzimas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional. Se utilizaron también compuestos patrones, como la glibenclamida (sigma[®]), y la acarbosa de Bayer[®]. Por otro lado, para las sobrecargas fueron utilizados los carbohidratos glucosa (sigma[®]), maltosa (sigma[®]) sacarosa (USP) y almidón (USP).

Se utilizó una balanza analítica Mettler AE-160 sensibilidad 0.1 mg, y para la determinación de la glucosa, el equipo Accu-check advantage de Roche® junto con las tiras reactivas Accu-check advantage II®.

2.2.2 Metodología

2.2.2.1 Ensayo en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria por sobrecarga oral de glucosa

El ensayo en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria consiste en administrar una sobrecarga de glucosa, después de la administración de los tratamientos con el fin de evaluar el comportamiento de los mismos dentro de un periodo de tiempo de aproximadamente 4 horas (Murillo & col., 2006).

Se tomaron grupos de 8 animales, ratones ICR suizo, de similar peso (aprox. 28-32g), 7-9 semanas de edad, machos distribuidos en 5 cajas aleatoriamente, previamente marcados y agrupados por peso.

Inicialmente se tomaron los niveles basales de glucosa en sangre (NGS) de los animales que llevaban un periodo de ayuno de aproximadamente 12 horas. Inmediatamente después se administraron por vía oral los tratamientos de la siguiente manera: Grupo control: Vehículo (Glicerina:propilenglicol:agua en una proporción 10:10:80), Grupo Tratamiento 1: glibenclamida 100 mg/kg, Grupo Tratamiento 2: PD-IBUN 100 mg/kg, Grupo tratamiento 3: PD-IBUN 200 mg/kg, Grupo tratamiento 4: PD-IBUN 400 mg/kg.

Pasada una hora de la administración de los tratamientos se realizó la toma de muestra de sangre a los animales e inmediatamente se les administró a todos los animales una sobrecarga oral de glucosa (2 g/kg de peso) de manera que se logaran las condiciones de hiperglucemia transitoria.

Después de la sobrecarga se realizaron tomas de muestras de sangre seguidas al cabo de una hora, dos horas y cuatro horas, de manera tal que se observara el efecto de los tratamientos sobre la hiperglucemia transitoria a lo largo del tiempo. La toma de muestra

de sangre se realizó mediante la técnica de punción del seno retro-orbital con capilares heparinizados y la lectura fue realizada empleando tiras reactivas Accu-check advantage II®. En presencia de la coenzima (PQO), la enzima de la tira reactiva, glucosa deshidrogenasa convierte la glucosa de la muestra de sangre en gluconolactona. Esta reacción crea una corriente eléctrica que el medidor interpreta para un valor de glucemia.

2.2.2.2 Ensayo en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria por sobrecarga oral de maltosa, sacarosa y almidón

Se realizaron ensayos con diferentes carbohidratos con el fin de determinar si existía alguna tendencia en la disminución de glucosa en sangre como consecuencia de un posible efecto causado por el desdoblamiento de los carbohidratos utilizados.

Se tomaron grupos de 8 animales, ratones tipo ICR suizo, de similar peso (aprox. 28-32g), machos de 7-9 semanas de edad, distribuidos en 5 cajas aleatoriamente.

Inicialmente se tomaron los NGS basales de los animales que llevaban un periodo de ayuno de aproximadamente 12 horas. Inmediatamente después se administraron por vía oral los tratamientos de la siguiente manera: Grupo control: Agua, Grupo Control: Acarbosa 10 mg/kg, Grupo Tratamiento 1: PD-IBUN 200 mg/kg, Grupo tratamiento 3: PD-IBUN 400 mg/kg.

Pasada media hora de la administración de los tratamientos se realizó la toma de muestra de sangre de los animales y se realizó la cuantificación de los NGS. Inmediatamente los animales de experimentación se sometieron a una sobrecarga de almidón o sacarosa (2 g/kg de peso) en cada experimento.

Después de la sobrecarga se realizaron tomas seguidas de sangre al cabo de 30, 60, y 120 minutos, de manera tal que se observara el comportamiento de los NGS a lo largo del tiempo. En el caso de la maltosa se realizó una variación en cuanto a la toma de muestras, ya que esta fue realizada a intervalos de 60 minutos durante 5 horas.

La toma de muestra de sangre se realizó mediante la técnica de punción del seno retro-orbital con capilares heparinizados y la lectura fue realizada empleando el método de tiras reactivas (Accu-check advantage II ®).

2.2.2.3 Ensayo de administración repetida de PD-IBUN y sobrecarga de glucosa en roedores de laboratorio normoglucémicos

Se realizó el ensayo de administración repetida para poder determinar el posible efecto en los NGS del polímero evaluado en dosis repetidas durante un periodo determinado de tiempo.

Se tomaron grupos de 5 animales por caja, para un total de 10 cajas de ratones machos, con un peso aproximado entre 28-32g y de 7 a 9 semanas edad, en 5 bloques distribuidos aleatoriamente. A cada bloque se le asignaron tratamientos en el siguiente orden: Grupo control: animales sin tratamiento más agua, Grupo Control 2: Vehículo, Grupo Patrón: Glibenclamida 100 mg/kg, Grupo tratamiento 1: PD-IBUN 200 mg/kg de peso, Grupo tratamiento 2: 400 mg/kg de peso, los cuales fueron administrados vía oral durante un periodo de 14 días. Durante el tiempo de la administración prolongada cada grupo tuvo a disposición agua y comida *ad libitum* hasta el día 14 en el que se retiró el alimento, llevando los animales a un ayuno de aproximadamente 12 horas.

Después del periodo de ayuno, se determinaron los NGS basales. Inmediatamente se realizó la última administración de los tratamientos previamente mencionados. Pasada una hora, se tomaron nuevamente los niveles de glucosa en sangre y se administró la sobrecarga de glucosa (2 g/kg). Se tomaron muestras de sangre a la hora, dos horas, tres y cinco horas después de la sobrecarga. La toma de muestra de sangre se realizó mediante la técnica de punción del seno retro-orbital con capilares heparinizados y la lectura fue realizada mediante el método en tiras reactivas (Accu-check advantage II ®).

2.2.2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza de dos vías, con la posterior prueba de Bonferroni. La significancia estadística

utilizada fue de $p < 0.05$. Se utilizó el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 5.0.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Ensayos en roedores de laboratorio con hiperglucemia transitoria

Se realizó un ensayo preliminar para determinar las dosis a las cuales el polímero debía ser usado para la evaluación de su efecto sobre los niveles de glucosa en sangre (NGS). Teniendo en cuenta las condiciones de toxicidad, inicialmente se escogieron dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg del PD-IBUN. Los datos del análisis estadístico detallado se pueden observar en el anexo 1.

De los resultados preliminares se estableció que el polímero en dosis de 50 mg/kg no tenía efecto alguno sobre la glucosa en sangre (figura 3), por ello se determinó que las dosis ideales a evaluar en este ensayo fueran superiores, teniendo en cuenta dosis del PD-IBUN de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 400 mg/kg. Las otras condiciones del ensayo preliminar se mantuvieron para el ensayo principal.

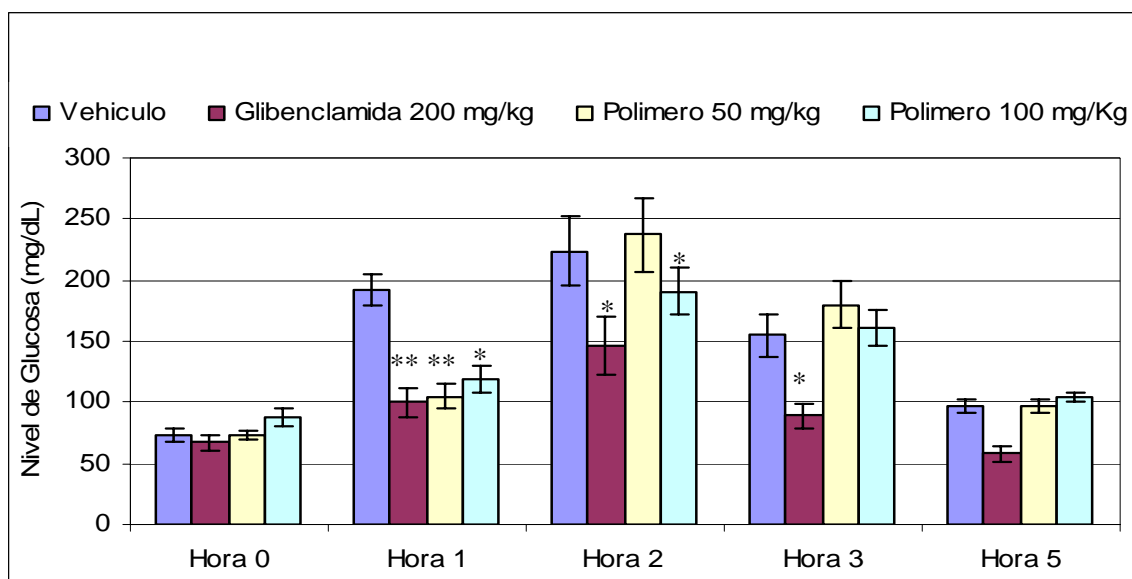


Figura N°3. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de glucosa ratones ICR (ensayo preeliminar). Media \pm D.E, $n = 8$ animales/grupo.

* $p < 0.05$ frente al grupo vehículo

El comportamiento de los diferentes tratamientos sobre la tolerancia oral a la glucosa se muestra en la figura 4 y tabla 3. La glucemia basal (ayuno de 12 horas) fue similar en todos los grupos y corresponde a NGS entre 76 y 96 mg/dL. Entre las horas 0 y 1 ocurre un leve aumento en los NGS en todos los grupos, ni siquiera la glibenclamida, que es un hipoglucemiante de referencia, logró reducir los NGS basales.

Posterior a la administración de sobrecarga oral de glucosa, el grupo control presenta una hiperglucemia marcada en la siguiente hora para luego descender en las horas 3 y 5 a valores de glucemia cercanos a los del nivel basal. Un comportamiento similar se presentó con el polímero en las tres dosis ensayadas. A las dos horas después de la sobrecarga de glucosa en todos los grupos de tratamientos, a excepción del grupo de glibenclamida, se aumentaron los NGS (tabla 3). En este ensayo la respuesta obtenida para glibenclamida se interpreta como un efecto anti-hiperglucemiante ya que atenuó la subida marcada de los NGS que sí se observó en los demás grupos. En las horas 3 y 5 la glibenclamida mostró NGS levemente inferiores a los niveles basales (hora 0), sin que esto signifique un efecto hipoglucemiante ya que las medias de respuesta no son significativamente diferentes. Los datos del análisis estadístico se pueden observar en el anexo 2.

Tabla 3. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en el modelo de hiperglucemia por sobrecarga oral de glucosa.

Tratamiento	Hora 0	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 5
Vehículo	97 ± 17	98 ± 13	150 ± 29	142 ± 25	105 ± 9
Glibenclamida 200 mg/kg	76 ± 11	90 ± 15	77 ± 15 *	67 ± 12	71 ± 5
PD-IBUN 100 mg/kg	80 ± 9	93 ± 18	130 ± 15	93 ± 10	83 ± 18
PD-IBUN 200 mg/kg	77 ± 10	104 ± 22	148 ± 30	101 ± 17	91 ± 16
PD-IBUN 400 mg/kg	81 ± 16	104 ± 22	150 ± 43	105 ± 13	97 ± 14

Media ± D.E. n=8 animales/ grupo. * p< 0.05 frente al vehículo.

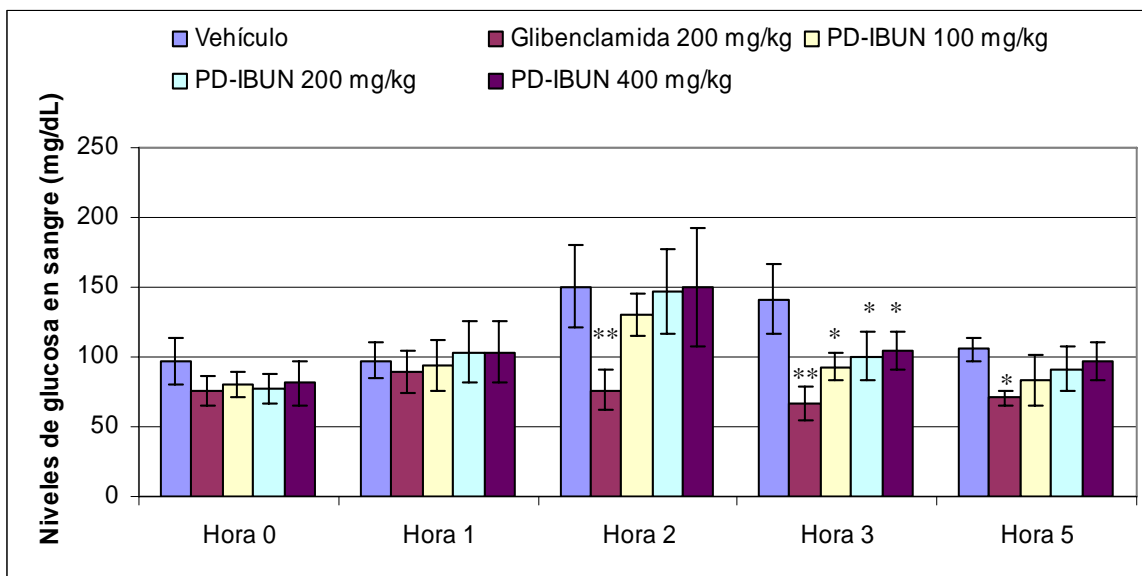


Figura N°4. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga de glucosa en ratones ICR. Media \pm D.E. 8 animales por grupo. ** $p < 0.01$ frente al grupo control.

En resumen, el PD-IBUN en las dosis ensayadas no modifica la tolerancia oral a la glucosa.

Después de la evaluación del efecto del polímero en los NGS por sobrecarga con glucosa, se realizaron ensayos para evaluar el efecto del polímero en sobrecargas con diferentes carbohidratos como maltosa, sacarosa y almidón. Las condiciones de los ensayos en cuanto a tiempos fueron ajustadas dependiendo de cada carbohidrato.

De acuerdo a ensayos preliminares, se determinó que el patrón a utilizar en los ensayos de sobrecargas de maltosa, sacarosa y almidón debía ser la acarbosa, ya que este compuesto es un inhibidor de las enzimas glucósido hidrolasas presentes en el tracto digestivo. Estas enzimas son necesarias para desdoblar los hidratos de carbono y así facilitar la disponibilidad de glucosa para absorción y paso al torrente sanguíneo.

En todos los grupos los NGS basales estuvieron por debajo de 100 mg/dL (tabla 4), similar a los resultados encontrados en el experimento anterior (sobrecarga oral de glucosa).

Tabla 4. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en el modelo de hiperglucemia transitoria por sobrecarga oral con sacarosa.

Tratamientos	Hora 0	30 min	Hora 1	Hora 2
Vehículo	75 ± 7	153 ± 25	128 ± 13	102 ± 8
Acarbosa 10 mg/kg	73 ± 12	113 ± 21*	116 ± 24*	98 ± 24
PD-IBUN 200 mg/kg	91 ± 11	157 ± 30	145 ± 25	120 ± 16
PD-IBUN 400 mg/kg	72 ± 15	156 ± 20	130 ± 11	113 ± 12

Media ± D.E, n=8 animales por grupo. * p< 0.05 frente al grupo vehículo

Teniendo en cuenta que la sobrecarga oral de sacarosa se administró en la hora 0 simultáneamente con los tratamientos correspondientes en cada grupo, el grupo control mostró una subida pronunciada en los NGS a los 30 minutos para luego descender en las horas 1 y 2, sin alcanzar los niveles basales al final del tiempo de observación. Con acarbosa se encontró una tendencia similar pero de menor magnitud que en el grupo control, demostrando esto un efecto anti-hiperglucemiante por parte de la acarbosa (anexo 3). El polímero en las dos dosis ensayadas mostró un efecto similar al del vehículo, con lo cual no se aprecia un posible efecto modulador de los NGS en este modelo (figura 5).

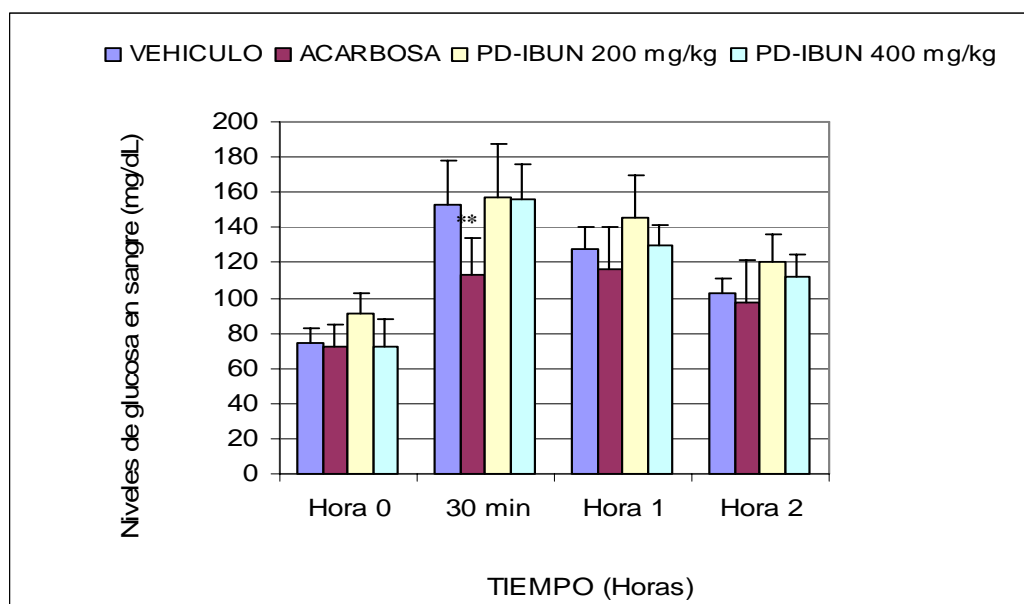


Figura N°5. Efecto del PD-IBUN sobre NGS con sobrecarga oral de sacarosa en ratones ICR. Media ± D.E., n= 8 animales por grupo. * p< 0.05 frente al grupo vehículo.

En resumen, el polímero en las dosis ensayadas no presenta efecto anti-hiperglucemiante ni hipoglucemiante frente a la sobrecarga oral de sacarosa.

Debido a que la maltosa en las paredes del intestino es desdoblada a glucosa, se quiso evaluar el efecto del polímero sobre este carbohidrato. Los resultados en la hora basal se comportaron de manera similar a lo encontrado en las sobrecargas de sacarosa y glucosa. El vehículo en las horas 1 y 2 muestra una subida progresiva en los NGS, mientras que en las horas 3 y 5 se evidencia el descenso de los mismos (figura 6). La acarbosa en la hora 1 muestra una leve subida en los NGS que se mantiene hasta la hora 2, en las dos últimas horas (3 y 5) los niveles disminuyen. Para las dosis de polímeros se evidencia un aumento en los NGS en la hora 1 que continúa hasta la hora 2. En las horas 3 y 5 disminuyen los NGS progresivamente.

Tabla 5. Efecto del PD-IBUN en los NGS en la hiperglucemia por sobrecarga con maltosa.

Tratamiento (maltosa)	Hora 0	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 5
Vehículo	65 ± 11	147 ± 26	158 ± 37	130 ± 27	88 ± 12
Acarbosa 10 mg/kg	69 ± 20	130 ± 22	141 ± 24	125 ± 8	95 ± 6
PD-IBUN 200 mg/kg	75 ± 15	100 ± 16	141 ± 19	118 ± 15	84 ± 11
PD-IBUN 400 mg/kg	71 ± 6	114 ± 17	157 ± 37	130 ± 20	97 ± 16

Media ± D.E., n=8 animales por grupo. * p< 0.05 frente al grupo vehículo

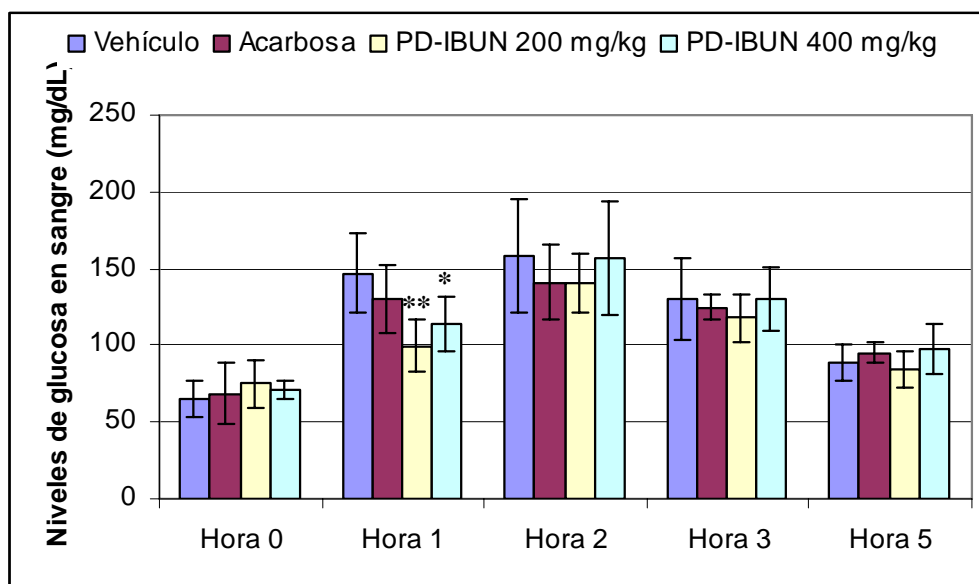


Figura N° 6. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de maltosa en ratones ICR. Media \pm D.E., n=8 animales por grupo, * $p < 0.05$ frente al grupo vehículo.

El grupo de acarbosa, respecto al grupo vehículo, disminuyó los NGS significativamente en la sobrecarga de maltosa, demostrando así como en el ensayo de sacarosa su efecto anti-hiperglucemiante (tabla 5, anexo 4). Los resultados obtenidos muestran que el PD-IBUN en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg, no tienen un efecto sobre el desdoblamiento de la maltosa en el tracto gastrointestinal.

Tabla 6. Efecto del PD-IBUN en los NGS en la hiperglucemia por sobrecarga con almidón.

Tratamientos	Hora 0	30 min	Hora 1	Hora 1:30	Hora 2	Hora 4
Vehículo	112 \pm 10	132 \pm 21	229 \pm 30	276 \pm 68	206 \pm 59	114 \pm 10
Acarbosa	113 \pm 13	134 \pm 27	180 \pm 41	217 \pm 61	174 \pm 33	125 \pm 46
PD-IBUN 200 mg/kg	116 \pm 9	132 \pm 18	196 \pm 36	252 \pm 58	219 \pm 65	117 \pm 17
PD-IBUN 400 mg/kg	120 \pm 15	150 \pm 26	199 \pm 28	279 \pm 60	249 \pm 94	135 \pm 51

Media \pm D.E., n=10 animales por grupo, * $p < 0.05$ frente al grupo vehículo.

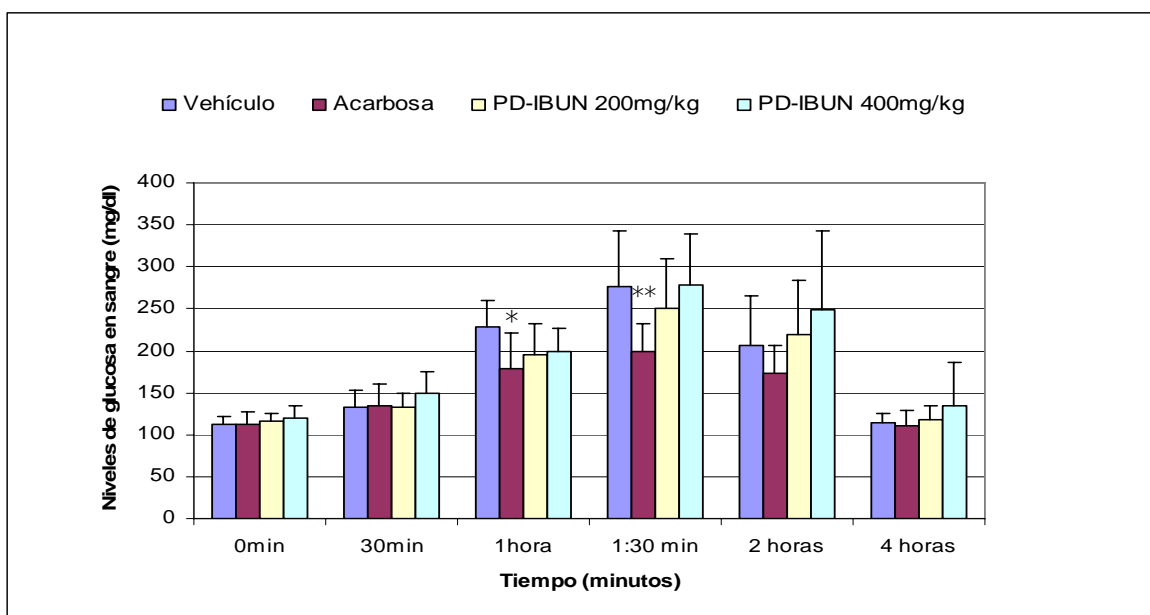


Figura N° 7. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de almidón en ratones ICR. Media \pm D.E. n=8 animales por grupo. * $p < 0.05$ frente al grupo vehículo

Como se puede observar en el ensayo de almidón, los niveles basales para los cuatro grupos se encontraban en un rango de 112 mg/dL a 120 mg/dL (tabla 6). Posterior a la sobrecarga con almidón, se observó un incremento en los NGS a los 30 minutos, y a la hora; sin embargo, para todos los grupos el punto de muestra más evidente en el incremento de NGS fue a la hora y media de la sobrecarga. Para el grupo acarbosa, a la hora y media, los NGS son de 217 mg/dL en promedio. Para el PD-IBUN el punto de mayor incremento en los NGS fue también a la hora y media, mostrando valores de 252 y 279 mg/dL para las dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg, respectivamente (figura 7).

Al igual que en ensayos anteriores con sobrecargas de sacarosa y maltosa, la acarbosa tiene un comportamiento similar frente a la sobrecarga de almidón en donde se evidencia una leve subida a los 30 minutos, hora y hora y media de manera paulatina sin superar los 220 mg/dL de glucosa en sangre en promedio. El polímero no demostró un efecto anti-hiperglucémico ni hipoglucemiante frente a la sobrecarga de almidón en ninguna de las dosis evaluadas (anexo 5). Comparativamente con el polímero, la inulina, polímero similar al PD-IBUN, en la ingesta normal no libera grandes cantidades de glucosa y por lo tanto no altera de manera significativa los NGS (Vanhoof & De Schrijver, 1995). De acuerdo a lo anterior, se podría pensar entonces que existe la posibilidad de que el PD-

IBUN libere algunas subunidades de glucosa en el tracto gastrointestinal lo cual contribuya al aumento de los NGS sin que esto signifique que tenga un comportamiento como un agente hiperglucemiante ya que como se puede observar a los 30 minutos de administrado presenta un comportamiento similar al encontrado en los grupos patrón y vehículo que se ve incrementado levemente en las subsiguientes horas; sin embargo, dado que su mecanismo de acción es aún desconocido no se puede asegurar que funcione de esta manera.

En resumen, el PD-IBUN en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg de peso corporal no evidenció efecto en la reducción de niveles de glucosa en sangre, en presencia de sobrecargas de glucosa, sacarosa, almidón y maltosa.

2.3.2 Ensayo de Administración repetida de PD-IBUN y sobrecarga de glucosa en roedores de laboratorio normoglucémicos

Después de administrar el polímero durante 15 días se realizó una curva de glucemia el último día para determinar el posible efecto protector del polímero. Como ya fue mencionado anteriormente, la curva de glucemia fue realizada bajo las mismas condiciones que las del ensayo de hiperglucemia transitoria aguda. Los datos del análisis estadístico pueden ser observados en más detalle en el anexo 6.

Para este ensayo, los resultados obtenidos muestran niveles basales similares entre los diferentes grupos de roedores. Después de administrados los tratamientos por última vez el último día de ensayo (día 15) los NGS del grupo control (111mg/dL promedio), al cual fue solamente administrado agua, son cercanos a los NGS presentados por los animales a los cuales les fue administrado el polímero en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg de peso. Para la hora 2, como se observa en la figura 8, los resultados se mantienen para el grupo patrón (glibenclamida). Los NGS obtenidos en los grupos correspondientes a animales tratados con vehículo y polímero superaron los 200 mg/dl de glucosa en sangre.

En la hora 3 se observó una disminución en los NGS de todos los grupos de animales tratados al igual que en la hora 5, donde los niveles de glucosa en sangre mostraron consistencia en la disminución entre los diferentes grupos. Ya que el polímero fue administrado por vía oral y no se evidenció diarrea durante el tiempo de observación y

toma de muestras se puede decir que el tránsito intestinal total no se vio afectado lo cual descarta la eliminación masiva del compuesto por heces fecales.

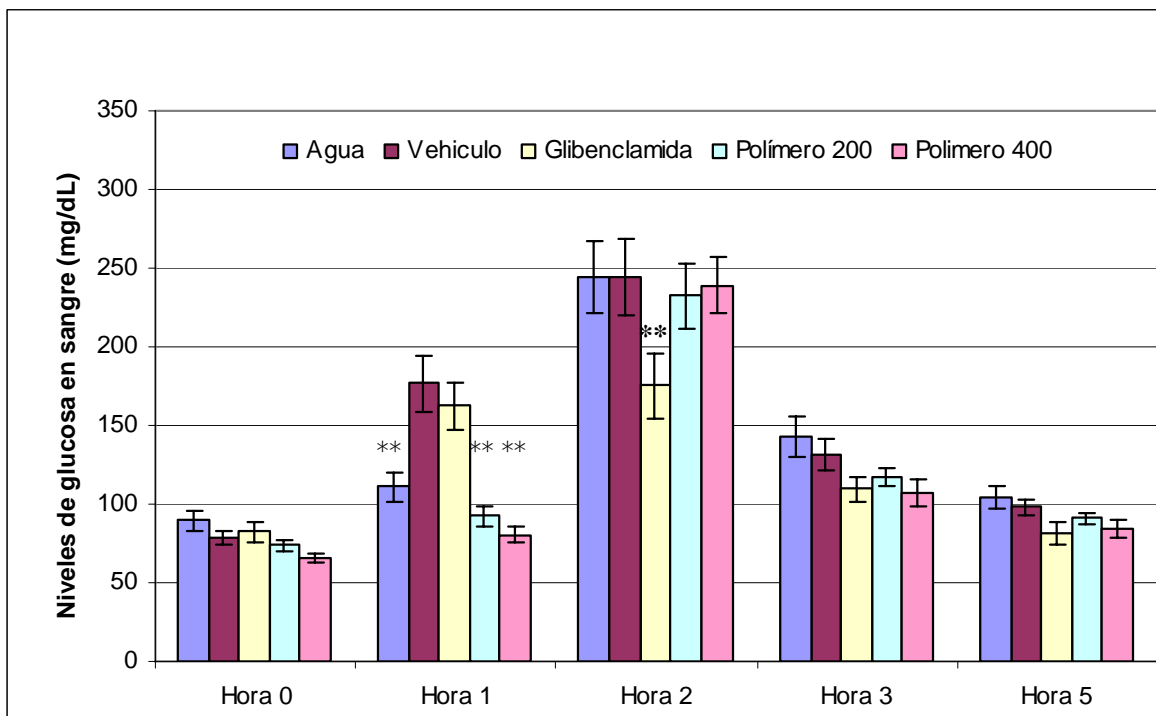


Figura N°8. Efecto de la administración repetida del PD-IBUN en los NGS en ratones ICR. Media \pm D.E., n= 10, * p < 0.05 frente al vehículo.

Como es indicado por Frias y Sgarbieri (1998), en estudios anteriores con la goma guar, la cual posee un alto contenido de fibra soluble (75%) al igual que el polímero evaluado (84%), esta disminuye los niveles de glucosa en suero únicamente durante el primer mes de experimento, lo cual indicó que no existe un efecto diferencial sobre los niveles de glucosa en sangre. De acuerdo a esto, y teniendo en cuenta la similitud en cuanto al contenido de fibra dietaria soluble, se puede asumir que compuestos poliméricos como la goma guar y el PD-IBUN no disminuyen de manera significativa los NGS en largos periodos de tiempo, inclusive cuando este ha sido administrado de manera repetida con el objeto de servir como agente protector del incremento de los NGS. Ya que no hay un efecto significativo sobre los NGS, se podría plantear un mecanismo fisiológico a nivel intestinal como se menciona en la literatura.

En resumen, el PD-IBUN evaluado después de la administración repetida en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg no tiene actividad protectora sobre los NGS ante la sobrecarga de glucosa.

PARTE 3. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO

PARTE 3. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO

3.1 PERFIL LIPÍDICO

3.1.1 Generalidades de las lipoproteínas

Los lípidos no son hidrosolubles, son transportados en el medio acuoso de la sangre mediante proteínas llamadas apolipoproteínas. La combinación de un lípido y una apolipoproteína se llama lipoproteína. Por lo tanto, las lipoproteínas tienen una función importante en el sistema de transporte de lípidos, que transporta colesterol y triglicéridos a diversas partes del organismo.

Los componentes lipídicos de las lipoproteínas tienen diferentes densidades y difieren sus proporciones en las diversas clases de lipoproteínas. Esta variación en densidad es la base de un método de clasificación de las lipoproteínas.

Una lipoproteína consta de cinco componentes principales, los cuales son: un componente proteína (apoproteína) y cuatro componentes lipídicos (apoproteínas, colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos) (Halpern, 1995).

3.1.2 El colesterol

El colesterol es un componente indispensable de todas las membranas celulares de los animales, cumple con una función vital ya que estas estructuras son las envolturas esenciales que protegen a la célula de su entorno externo (extracelular) y por lo tanto, ayuda a mantener el ambiente intracelular.

El colesterol puede ser encontrado de dos maneras: exógena (dieta) o endógena (sintetizada dentro del organismo). El colesterol de la dieta es una fuente sustancial de colesterol total; puede contribuir hasta en un 20 a 40% del colesterol total del organismo. El intestino delgado es el sitio de captación de colesterol de la dieta. La mayor síntesis

endógena representa 60 al 80% restante de colesterol. Se aceptaba comúnmente que la mayor parte del colesterol endógeno lo producía el hígado. Sin embargo, investigaciones recientes indican que gran parte de la biosíntesis de colesterol tiene lugar en tejidos extrahepáticos. El hígado, representa la mayor parte de la captación de colesterol del plasma.

El colesterol plasmático se deriva tanto del colesterol endógeno como del exógeno. El principal precursor para la biosíntesis de colesterol y otros lípidos como ácidos grasos y triglicéridos es la acetil-coenzima A (Murray & col., 2001).

El colesterol tiene un papel importante como precursor de hormonas esteroideas, las cuales son esenciales para el metabolismo normal, y ácidos biliares, los cuales son esenciales para la digestión y absorción de grasas (Murray & col., 2001).

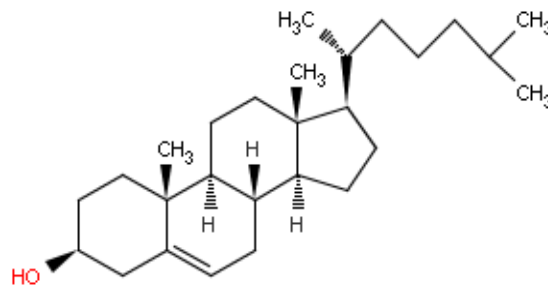


Figura 9. Estructura del colesterol.

Aproximadamente la mitad del colesterol del organismo proviene de su biosíntesis (cerca de 500 mg/día), mientras que la cantidad restante es obtenida de la dieta promedio. El hígado sintetiza aproximadamente el 50%, el intestino 15% y la piel una gran cantidad del porcentaje restante (Murray & col., 2004).

3.1.3 Los triglicéridos.

Los triglicéridos son lípidos estructuralmente simples, que son los principales componentes de la grasa almacenada. También son hidrofóbicos y constan de tres moléculas de ácidos grasos adheridos a un eje central de glicerol (figura 10).

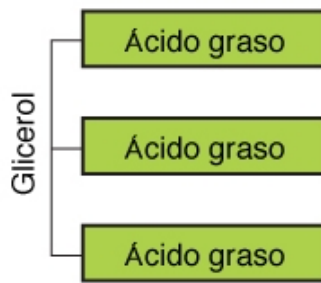


Figura 10. Estructura de los triglicéridos

3.1.4 Fibra y colesterol

Probablemente uno de los temas más estudiados es la relación de la fibra con la reducción de factores coronarios y enfermedades del corazón. El colesterol total sérico y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son generalmente aceptados como biomarcadores que indican el potencial riesgo de desarrollar alguna enfermedad. Datos experimentales, soportan que el colesterol en sangre puede ser disminuido utilizando varios tipos de fibra fermentadas que produzcan una viscosidad relativa alta (Ripsin & col., 1992; Anderson & col., 2000). Por otro lado, evidencia epidemiológica demuestra la relación entre la ingesta de fibra y la reducción del riesgo cardiovascular (Wolk & col., 1999).

Se ha demostrado en animales que la administración de fibra viscosa, como la inulina contribuye a la disminución de lípidos. Sin embargo, en humanos esto es aún un tema de discusión, y depende del consumidor. De esta manera, se tiene que sujetos hiperlipidémicos tengan una mayor tendencia a la reducción del colesterol sérico, mientras que sujetos de niveles normales tienen tendencia más hacia la reducción en los niveles de triglicéridos. Algunas de las razones del porqué estas diferencias entre resultados de animales y humanos, están basadas en la dosis de los productos con fibra que se utilizan, ya que en muchos casos la fibra usada en animales consiste en el 10% de su dieta, mientras que en humanos la cantidad tolerada es mucho menor. (Van loo & col., 1999)

Se ha sugerido de manera repetida que algunas fibras fermentadas, como por ejemplo la inulina, producen propionato, el cual disminuye la capacidad del hígado para sintetizar

nuevos ácidos grasos y triglicéridos a través de la inhibición de enzimas claves para dicho proceso. Esto sugiere que la inulina disminuye la expresión del gen para la enzima lipogénica (Delzenne & Kok, 1999; Theuwissen & Mensink, 2008).

De otro lado, como fue demostrado por Vanhoof y De Schrijver (1995), polímeros como la inulina muestran reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos en animales normoglicémicos, sin embargo, esto fue atribuido al incremento en la secreción de esteroides neutros y ácidos biliares.

La hiperlipidemia representa uno de los riesgos más representativos para el desarrollo de la arteriosclerosis, la cual es la mayor causa de mortalidad y morbilidad en los países occidentales (Amrani & col., 2006). El término hiperlipidemia se refiere concretamente a una concentración elevada de colesterol plasmático y/o de triglicéridos.

Las causas de la hiperlipidemia pueden ser primarias o secundarias. Las causas primarias se refieren a factores genéticos asociados o a la dieta. Las causas secundarias incluyen diabetes, hipotiroidismo, síndrome nefrótico e insuficiencia renal (Pejic & col., 2006)

Estudios clínicos experimentales y epidemiológicos han demostrado que el aumento en plasma de niveles de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) se encuentra relacionado con el desarrollo progresivo de la arteriosclerosis. Sin embargo, lipoproteínas de alta densidad funcionan como fracciones anti-aterogénicas. Los triglicéridos también se encuentran asociados a riesgo cardiovascular, especialmente en organismos con estado de diabetes (Harnafi & col., 2008).

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiales y equipos

Se utilizaron como compuestos patrones la glibenclamida (Sigma®), y la lovastatina (Genfar ®). Para la inducción de la hiperlipidemia se utilizó el agente tensioactivo Tyloxapol (Sigma®).

Dentro de los equipos fue utilizada la balanza analítica Mettler AE-160 sensibilidad 0.1 mg, y para la determinación de los niveles de colesterol y triglicéridos se utilizó el espectrofotómetro Bio-Rad modelo 550.

3.2.2 Metodología

3.2.2.1 Efecto del PD-IBUN en ratas Wistar con hiperlipidemia inducida por tyloxapol (Majithiya & col., 2004).

El ensayo para el análisis de colesterol y triglicéridos en animales de experimentación con hiperlipidemia consiste en la inducción de la hiperlipidemia en roedores de laboratorio mediante la administración intraperitoneal del agente tensioactivo tyloxapol. El tyloxapol, como agente químico altera físicamente las lipoproteínas de muy baja densidad, haciéndolas refractivas a la acción de las enzimas lipolíticas en la sangre y diversos tejidos, previniendo o retardando su remoción de la sangre y tejidos (Harnafi & col., 2008).

Para la determinación de la actividad del polímero de glucosa se tomaron 6 grupos de 6 ratas Wistar de 120 a 150 g y 9 semanas de edad, las cuales fueron dispuestas por grupos, con libre acceso a agua y comida. A las ratas, sin ayuno se les administraron los tratamientos como lo muestra la siguiente tabla:

Tabla N° 7. Esquema de administración de tratamientos para el ensayo de hiperlipidemia inducida.

Tratamiento	Hora cero Vía oral (v.o)	Hora 1 Vía Intraperitoneal (ip)
Control normolipidémico	Agua destilada	Suero fisiológico
Control hiperlipidémico	Agua destilada	Tyloxapol 300 mg/kg
Patrón 1: Lovastatina 40 mg/kg	Lovastatina	Tyloxapol 300 mg/kg
Patrón 2: Glibenclamida 200 mg/kg	Glibenclamida	Tyloxapol 300 mg/kg
PD-IBUN 200 mg/kg	PD-IBUN 200 mg/kg	Tyloxapol 300 mg/kg
PD-IBU 400 mg/kg	PD-IBUN 400 mg/kg	Tyloxapol 300 mg/kg

A las 24 horas de la administración ip del tyloxapol fue realizada la toma de muestra de sangre periférica mediante la técnica de punción del seno retro-orbital. Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas a 4.000 r.p.m., posteriormente el sobrenadante (suero) fue dispuesto en microplacas de 96 pozos, 4 réplicas por muestra para ello se utilizaron 10ul de cada muestra. El suero fue tratado con un reactivo enzimático (Kit Human[®]) para la determinación de colesterol ó triglicéridos, según el caso utilizando 1000ul del reactivo. Las muestras más el reactivo fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente llevadas a lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

Los niveles de colesterol o triglicéridos fueron calculados mediante la siguiente expresión:

$$C \text{ (mg/dL)} = \frac{A_m}{A_p} \times 200$$

Donde C es la concentración de colesterol ó triglicéridos en sangre, Am es la absorbancia de la muestra y Ap es la absorbancia del patrón. Se multiplica por 200 ya que el patrón para el kit (Human[®]) tiene una concentración de 200 mg/ml.

De acuerdo con el fundamento del kit comercial: la determinación de los triglicéridos sucedió después de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es la Quinoneimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de peroxidasa.

El colesterol, fue determinado después de la hidrólisis enzimática y la oxidación. El indicador es la quinoneimina también, y es formada por el peróxido de hidrógeno y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peroxidasa.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron diferentes ensayos preliminares para determinar la dosis correspondiente al Tyloxapol que produjera el aumento significativo de colesterol y triglicéridos en sangre. Inicialmente se probaron dosis de 200, 300 y 400 mg/kg según lo reportado por la

literatura (JingJing & Xiangrong, 2007). La dosis que más se ajustaba al modelo en ratas fue de 300 mg/kg de peso corporal. Como patrones se usaron lovastatina 40 mg/kg y glibenclamida 200 mg/kg. El PD-IBUN se empleo en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg de peso corporal.

Después de las 24 horas, se tomaron las muestras de sangre periférica sobre las cuales fueron determinados los niveles tanto de colesterol como de triglicéridos. Los niveles de colesterol y triglicéridos a las 24 horas, para el grupo control normolipidémico se tomó como el nivel basal de referencia para todos los grupos; dando un valor promedio de 89 mg/dL para colesterol y 163 mg/dL para triglicéridos. En el control hiperlipidémico se obtuvieron valores de 220 y 628 mg/dL para colesterol y triglicéridos respectivamente, evidenciando el incremento de los niveles en sangre causado por el agente tensioactivo. El patrón lovastatina mostró niveles superiores a los del control normal, pero inferiores a los del patrón glibenclamida. El PD-IBUN 200 mg/kg y 400 mg/kg, mantuvo niveles de colesterol y triglicéridos similares para las dos dosis evaluadas.

Tabla N°8. Evaluación del efecto del PD-IBUN sobre niveles de colesterol en ratas Wistar hiperlipidemicas.

Tratamiento	Niveles de colesterol (mg/dL)
Control normolipidémico	89 ± 13
Control hiperlipidémico	220± 35 **
Patrón 1: Lovastatina 40 mg/kg	140 ± 32 †
Patrón 2: Glibenclamida 200 mg/kg	165 ± 32
PD-IBUN 200 mg/kg	164 ± 37 †
PD-IBU 400 mg/kg	158 ± 21

Media ± D.E., n=6 ** p< 0.05 frente al control normolipémico, † p<0.05 frente al control hiperlipémico

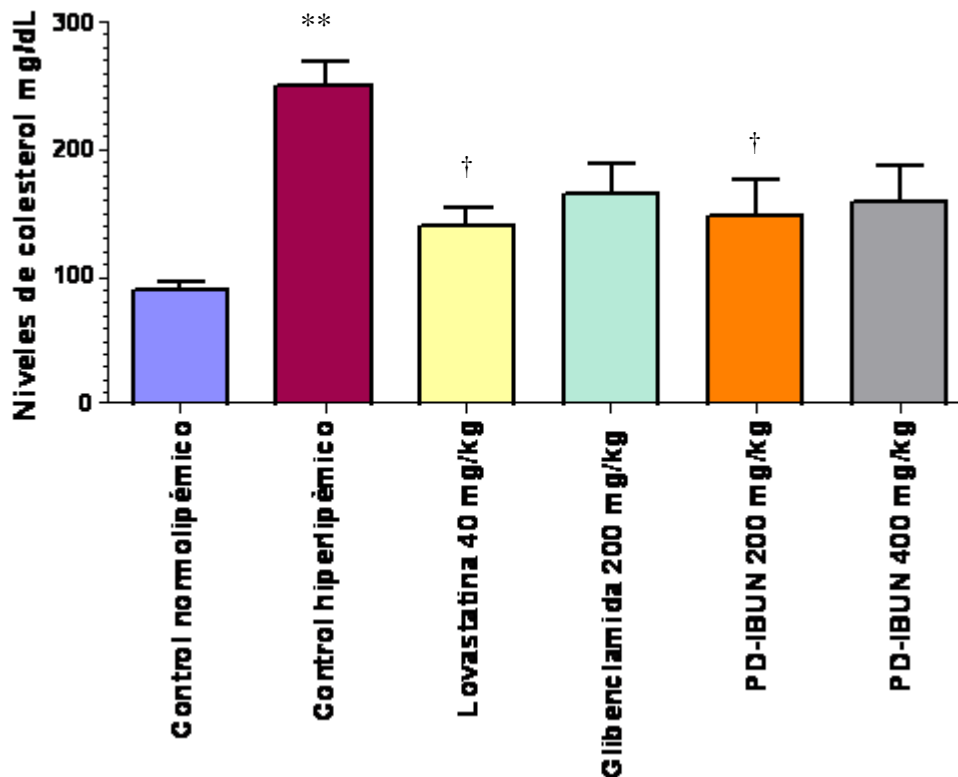


Figura N° 11. Efecto del PD-IBUN sobre los niveles de colesterol en ratas Wistar en condiciones de hiperlipidemia. Media \pm D.E., n=6. ** p< 0.05 frente al control normolipémico, † p<0.05 frente al control hiperlipémico

Los niveles de colesterol obtenidos por el grupo control hiperlipidémico (220 mg/dl) respecto al control normolipémico mostró el incremento significativo producido por el tyloxapol en los niveles de colesterol y triglicéridos (628 mg/dL). La lovastatina mostró un efecto anti-hiperlipemiente pero no significó su actividad normalizara los niveles hasta llegar a los basales. El grupo de la glibenclamida mostró resultados similares a los obtenidos por los grupos del PD-IBUN, mostrando un efecto anti-hiperlipemiente más leve que el de la lovastatina lo cual pudo deberse a que el mecanismo de acción de la glibenclamida está relacionado con la disminución de los NGS y no directamente con la disminución de los niveles del perfil lipídico.

Los resultados obtenidos por el PD-IBUN (tabla 8 y 9) comparado frente al grupo de hiperlipidemia muestran un posible efecto “anti-hiperlipidémico” ya que para estos dos grupos los niveles de colesterol y triglicéridos no demuestran un aumento tan elevado

como el control hiperlipémico. Al comparar los resultados obtenidos entre colesterol (figura N°11) y triglicéridos (figura N°12) para el grupo PD-IBUN, se evidencia la proporción entre los datos en todos los grupos tratados y, como era de esperarse, los valores de triglicéridos superan en casi el doble los de colesterol. Al comparar entre las dosis del PD-IBUN se encuentra una diferencia en cuanto a actividad anti-hiperlipemiante, la cual en dosis de 400 mg/kg tiene un mejor efecto sobre niveles tanto de colesterol como triglicéridos contra la actividad reflejada por la dosis de polímero 200 mg/kg de peso. Sin embargo, esta leve actividad no se puede evidenciar completamente debido a la dispersión de los datos.

Tabla N°9. Evaluación del efecto del PD-IBUN sobre los niveles de triglicéridos en ratas Wistar hiperlipidémicas por tyloxapol.

Tratamiento	Niveles de triglicéridos (mg/dL)
Control normolipémico	163 ± 26
Control hiperlipidémico	628 ± 127**
Patrón 1: Lovastatina 40 mg/kg	465 ± 135
Patrón 2: Glibenclamida 200 mg/kg	506 ± 126
PD-IBUN 200 mg/kg	599 ± 101
PD-IBU 400 mg/kg	498 ± 132

Media ± D.E., n=6, **p<0.05 frente al control normolipémico.

Como fue observado por Frias y Sgarbieri (1998), la fibra dietaria contenida en la goma guar demuestra disminución en los niveles de colesterol junto a cualquier dieta comparados con los niveles basales. El mecanismo de acción de esta fibra dietaria soluble se encuentra relacionado con la disminución leve del tránsito intestinal, dando origen a un proceso de fermentación en el intestino delgado, produciendo ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular los cuales son benéficos para el metabolismo de tejidos intestinales y la disminución de los niveles en el perfil lipídico (Frias & Sgarbieri, 1998). Teniendo en cuenta lo anterior, aunque el PD-IBUN posea características y porcentajes similares de fibra soluble a polímeros como la goma guar, los análisis mediante el test de Tukey demuestran que el polímero no produce una disminución estadísticamente significativa respecto a los otros grupos evaluados, lo que indica que la actividad del

polímero no es suficiente para disminuir niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, descartándose así como un compuesto hipolipemiante (anexo 7 , anexo 8).

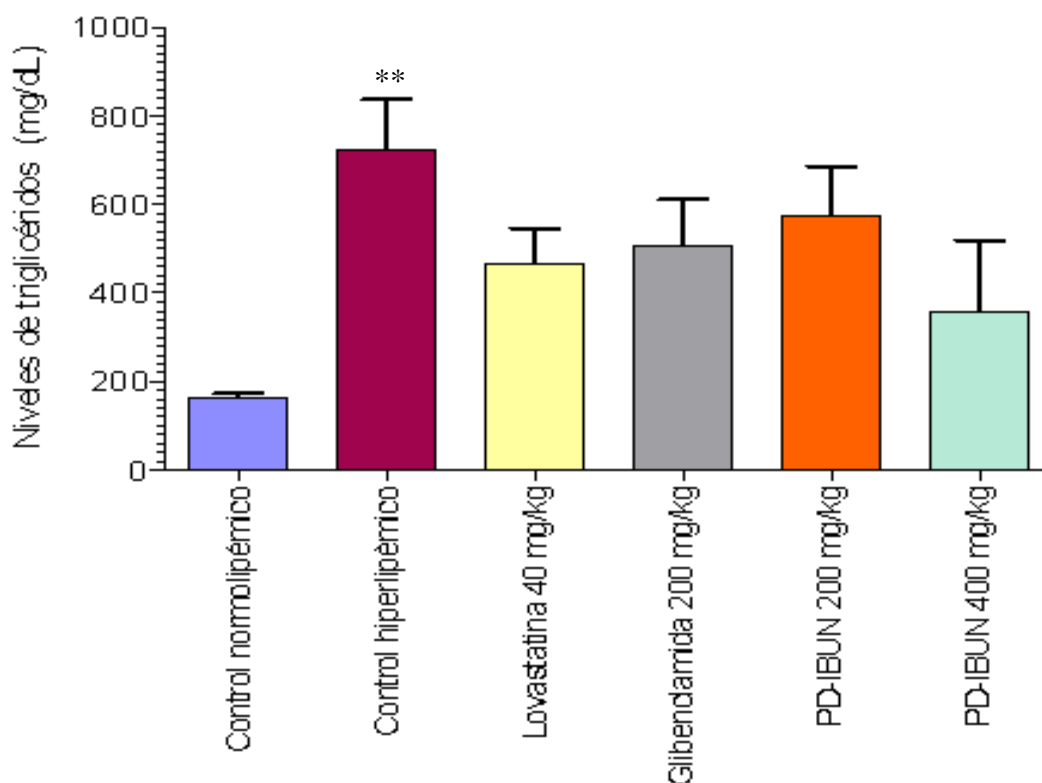


Figura N° 12. Efecto del PD-IBUN sobre niveles de triglicéridos en ratas Wistar en condiciones de hiperlipidemia. Media \pm D.E., n=6, ** p<0.05

En resumen, el PD-IBUN en dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg de peso, demostró aparente actividad reductora sobre los niveles de colesterol y triglicéridos comparados frente al grupo control hiperlipidémico. Sin embargo, no se puede asegurar que el polímero cumple una función hipocolesterolemia ya que los resultados no fueron estadísticamente significativos frente al grupo control hiperlipidémico.

PARTE 4. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE LA ACTIVIDAD INTESTINAL

PARTE 4. EFECTO DEL PD-IBUN SOBRE LA ACTIVIDAD INTESTINAL

4.1 TRÁNSITO INTESTINAL

El aumento o disminución del tránsito intestinal es actualmente uno de los parámetros más observados en animales de laboratorio junto a la administración de fármacos que interfieren con el sistema nervioso autónomo. Debido a que varios de estos compuestos poseen efectos secundarios como constipación o diarrea, es importante medir tales efectos cuando se está desarrollando un nuevo producto.

4.1.1 Actividad gastrointestinal

Para el desarrollo de la actividad gastrointestinal, es entonces necesario un estímulo externo. Dentro de estos estímulos, a parte de la fibra, se encuentra el efecto prebiótico de diversas sustancias. En este contexto, un prebiótico se puede definir como un ingrediente activo no digerible que afecta benéficamente al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento, y/o activar el metabolismo de una o un número limitado de bacterias en el colon mejorando intrínsecamente la salud del huésped. Dentro de los efectos fisiológicos de los prebióticos se encuentra el aumento en la fermentabilidad de sustancias en el colon por el aumento de la microflora, aumentando de esta manera la actividad gastrointestinal (Gibson,2004).

La velocidad del tránsito gastrointestinal es uno de los factores que determina la intensidad de absorción del contenido luminal y regula la biodisponibilidad de fármacos y otras sustancias administrados por vía oral. Por esta razón, la medida de la velocidad del tránsito es etapa obligatoria en el estudio de compuestos inhibitorios o estimulatorios de la actividad peristáltica. Los métodos clásicos descritos en la literatura involucran la administración de diferentes marcadores coloreados y la evaluación del trayecto de los mismos en el intestino. Posteriormente, modelos que evalúan la producción y la medida del gas producido por la flora intestinal, después de la administración de lactosa, una

sustancia digerida solamente por enzimas colonicas, así como modelos que utilizan inulina radioactiva han sido descritos (Arbós y col., 1993).

La composición de microflora del tracto gastrointestinal (GI) varía con respecto al aumento de la edad de los seres vivos. Estos cambios involucran el decrecimiento en número y diversidad de bifidobacterias y bacterias benéficas; aumentando así el número de *enterobacterias*, *clostridia*, *streptococcus* y *enterococcus* en seres humanos mayores, ancianos y animales de edad avanzada. (Lesniewska & Rowland, 2006).

Los cambios en la comunidad bacteriana del GI, en seres vivos de edad avanzada están directamente relacionados con los cambios en los hábitos nutricionales; desde siempre se ha reconocido que los componentes dietarios co-determinan el espectro de la microflora intestinal. En particular, el aumento de la edad está asociado con la disminución del consumo de fibra dietética diaria, que afecta directamente los procesos de masticación, sensibilidad en el gusto y olfato. Sin embargo, a parte de estas alteraciones, se encuentra la relación con las alteraciones en la fisiología del GI y su función, tales como la alteración en la producción de ácidos gástricos, en la motilidad gastrointestinal y, por tanto, la disminución del tiempo de tránsito gastrointestinal. Estos cambios en la fisiología del GI, permiten el crecimiento de poblaciones de microflora que toman ventaja y forman nichos ecológicos dentro del tracto, y por ende causan alteraciones en la microbiota benéfica cambiando la homeostasis del GI y su funcionamiento.(Lesniewska & Rowland, 2006)

Las sustancias pro y prebióticas y sus combinaciones han demostrado modificaciones en la estructura de las comunidades bacterianas en ancianos. Sin embargo, a parte de estudios de tránsito intestinal y constipación, estudios han revelado efectos benéficos de probióticos y prebióticos, y su utilidad como suplementos ha sido ampliamente investigada en jóvenes adultos. (Marinho & col., 2007).

Numerosas metodologías para el estudio de la función del músculo liso gastrointestinal aparecieron en los últimos años. Muchos de esos métodos tuvieron sus principios fisiológicos adaptados al uso clínico. Sin embargo, el estudio del movimiento peristáltico resultó en una de las técnicas más importantes en el estudio de sustancias bioactivas.

4.1.2 Fibra dietaria y actividad gastrointestinal

4.1.1 Efectos fisiológicos

Los efectos fisiológicos de la fibra dependen de diferentes variables, pero generalmente dependen del tipo, dosis de fibra específica consumida, composición de la fibra y el perfil fisiológico del individuo que consume la fibra. Sin embargo, el mayor de los efectos fisiológicos de la fibra dietaria está relacionado con las interacciones con el contenido colonico a través de su fermentación. Uno de los factores de interés es entonces el tránsito intestinal (a través del colon), que determina la duración de contacto con las enzimas bacterianas, el aumento del bolo fecal y su velocidad de paso sobre el intestino (McFarlane & col., 2006, Munakata & col., 1995).

Sin embargo, esto depende del tipo de fibra consumida y de la frecuencia de la misma. Es así como, por ejemplo, la fibra insoluble se ha demostrado en diferentes experimentos en ratas y humanos, disminuye el tiempo de tránsito intestinal. Por otra parte, está relacionada con la atenuación de complicaciones intestinales tales como constipación, diverticulitis y posiblemente cáncer de colon.

Por otro lado, la fibra soluble, la cual contiene diferentes funciones a nivel fisiológico, se encuentra relacionada con la disminución del tiempo de vaciamiento gástrico, la disminución de colesterol y absorción de glucosa. La propiedad de atrapar colesterol se encuentra a su vez relacionada con la capacidad de disminuir el cáncer de colon en el hombre. (Ofuya & col., 2005)

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Materiales y equipos

El reactivo utilizado fue atropina (Zoo® 1mg/ml), carbón activado y rojo carmín. El equipo utilizado fue la balanza analítica Mettler AE-160 sensibilidad 0.1 mg.

4.2.2 Metodología

4.2.2.1 Ensayo de tránsito parcial en el tracto gastrointestinal

En el modelo del “carbón activado”, la velocidad del tránsito intestinal en roedores es medida por desplazamiento de este marcador después de un tiempo predeterminado de su administración oral. Los resultados se expresan con relación al largo del intestino delgado. (Lapa & col., 2001)

Se pesaron y marcaron ratas macho de 8 semanas de edad, con pesos promedios entre 250 y 300 g, en ayuno de 12 horas con libre acceso a agua. Se administraron intragástricamente (vía oral) el polímero de prueba (PD-IBUN) en dosis de 200 mg/kg, dosis de 400 mg/kg y vehículo, como control se tomó la atropina en una dosis de 10 mg/kg de peso administrada intraperitonealmente. Transcurridos 60 minutos de estos tratamientos, se administró el carbón activado (10%, 0.1ml/10g) por vía oral, a todos los animales. Pasados 30 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se abrió el abdomen de los animales y enseguida se retiró el estómago e intestino (de la región gastropilórica hasta la unión ileocecal) y la distancia recorrida por el carbón del píloro hasta la última porción del intestino conteniendo por lo menos 1 cm continuo de carbón. Se calculó el porcentaje de recorrido del carbón. Para la determinación del tránsito intestinal parcial se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ recorrido} = \frac{\text{Distancia recorrida por el carbón}}{\text{Largo total del intestino Delgado}} \times 100$$

4.2.2.2 Ensayo de tránsito total en el tracto gastrointestinal (Lapa & col., 2001)

Se utilizaron ratones ICR suizo sin ayuno, en lotes de 5 ratones por caja, se le administraron los tratamientos vehículo: Agua destilada por vía oral, Tratamiento 1: PD-IBUN 200 mg/kg, Tratamiento 2: PD-IBUN 400 mg/kg, Patrón: Atropina (10 mg/kg), los cuales se les administró por vía oral menos la atropina que fue administrada

intraperitonealmente. Inmediatamente después de los compuestos, se administró un marcador de heces fecales (rojo carmín al 1%). Posterior a la total administración fueron ubicados en jaulas individuales con fondo blanco para el conteo de heces fecales. El tiempo transcurrido entre la administración y la aparición de heces coloreadas fue el equivalente a la duración del tránsito intestinal total en el tracto gastrointestinal.

4.2.2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza de una vía aplicada sobre la posterior prueba de Tukey. La significancia estadística utilizada fue de $p < 0.05$. Se utilizó el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 5.0.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Ensayo de tránsito en tracto gastrointestinal parcial

En la tabla N°10 y figura N°13 se presentan para cada tratamiento los resultados promedio del recorrido del carbón activado sobre el tracto gastrointestinal. Los datos del análisis estadístico se encuentran detallados en el anexo 9.

El grupo control tuvo un vaciamiento promedio del 69%, mientras que el grupo patrón con atropina tuvo un vaciamiento promedio de 13%. El polímero en las dos dosis ensayadas presentó un vaciamiento similar en magnitud al del grupo control. De otro lado, el resultado de administrar atropina más el polímero en dosis de 200 mg/kg es levemente superior al de administrar atropina sola. El aceite de oliva produjo un vaciamiento promedio de 52%.

Tabla 10. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal parcial en ratas Wistar.

Tratamiento	Promedio (%)
Vehículo	69 ± 9
Atropina 1mg/kg	13 ± 10*
Atropina mg/kg + PD-IBUN 200 mg/kg	15 ± 9*
PD-IBUN 200 mg/kg	70± 9
PD-IBUN 400 mg/kg	71 ± 15
Aceite de Oliva ¹	52 ± 25

¹ 1ml/animal. n=10 animales por grupo. * p<0.05 frente al control

El protocolo es adecuado para este tipo de observación en ratas puesto que en media hora el grupo control no ha logrado la evacuación total del intestino delgado (aprox. 100 cm). La atropina se manifestó como un agente inhibidor del tránsito intestinal, efecto esperable dado su mecanismo de acción reportado en la literatura: se trata de un agente inhibidor de las repuestas muscarínicas de acetilcolina.

Las respuestas promedio del polímero, independiente de la dosis ensayada, no fueron diferentes ($p>0.05$) a las respuestas del grupo control; demostrando que el polímero no afecta ni positiva ni negativamente el tránsito intestinal (anexo 9). Esto concuerda con el resultado mostrado por la administración conjunta de atropina y polímero, donde lo que se ve es el predominio total de la respuesta de tipo atropínico.

El aceite de oliva fue usado bajo el supuesto de que promovía el tránsito intestinal, lo cual no se vio reflejado en este experimento. Por el contrario, se vio un aparente efecto inhibidor frente al grupo control, sin que la diferencia en los resultados sea estadísticamente significativa dada la variabilidad en las respuestas del grupo que recibió aceite de oliva. Es importante resaltar que no se observaron signos de diarrea con ninguno de los tratamientos.

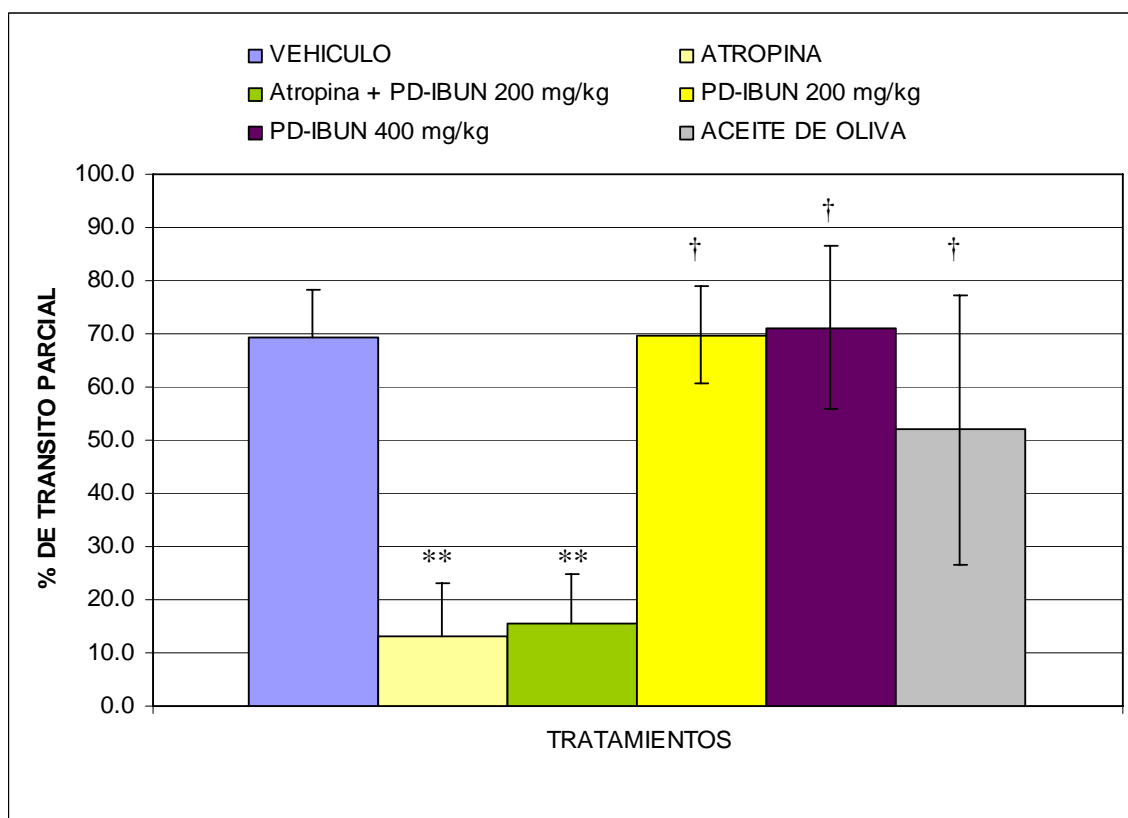


Figura N° 13. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal parcial en ratas Wistar. Media ± D.E., n=10 ratas por grupo, * p<0.05 respecto al vehículo; † p<0.05 respecto a la atropina.

4.3.2 Ensayo de tránsito total en tracto gastrointestinal

En ensayos preliminares se encontró que es más práctico el modelo de tránsito total en ratones dada la rapidez de su evacuación intestinal, mientras que en las ratas el tránsito total puede tardar hasta 24 horas. En ratones, el rojo carmín al 1% (dosis de 0.1 ml/ 10g de peso corporal) resultó ser un marcador adecuado para teñir el bolo fecal y permitir así una determinación inequívoca del tiempo de tránsito total: momento en que aparece la primera deposición de color rojo.

El tiempo promedio de tránsito total obtenido para el agua fue de 395 minutos y para la atropina fue de 374 minutos en promedio. El tiempo de tránsito total de los polímeros fue de 244 y 180 minutos para el PD-IBUN 200 mg/kg y PD-IBUN 400 mg/kg de peso, respectivamente (tabla N° 11).

Tabla 11. Efecto del PD-IBUN sobre el tiempo tránsito intestinal total en ratones ICR.

Tratamientos	Tiempo de tránsito	
	Rango (min)	Promedio (min)
Vehículo (agua)	122-517	395 ± 145
Atropina 1mg/kg	204-514	374 ± 104
PD-IBUN 200 mg/kg	96-500	244 ± 165
PD-IBUN 400 mg/kg	70-350	180 ± 105

n=10 ratones/grupo; *p<0.05 frente al grupo control.

De acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey, entre el vehículo y atropina no se evidenció diferencia estadísticamente significativa, a pesar de que la respuesta esperable de la atropina era un tiempo de tránsito mayor al del grupo control (anexo 10).

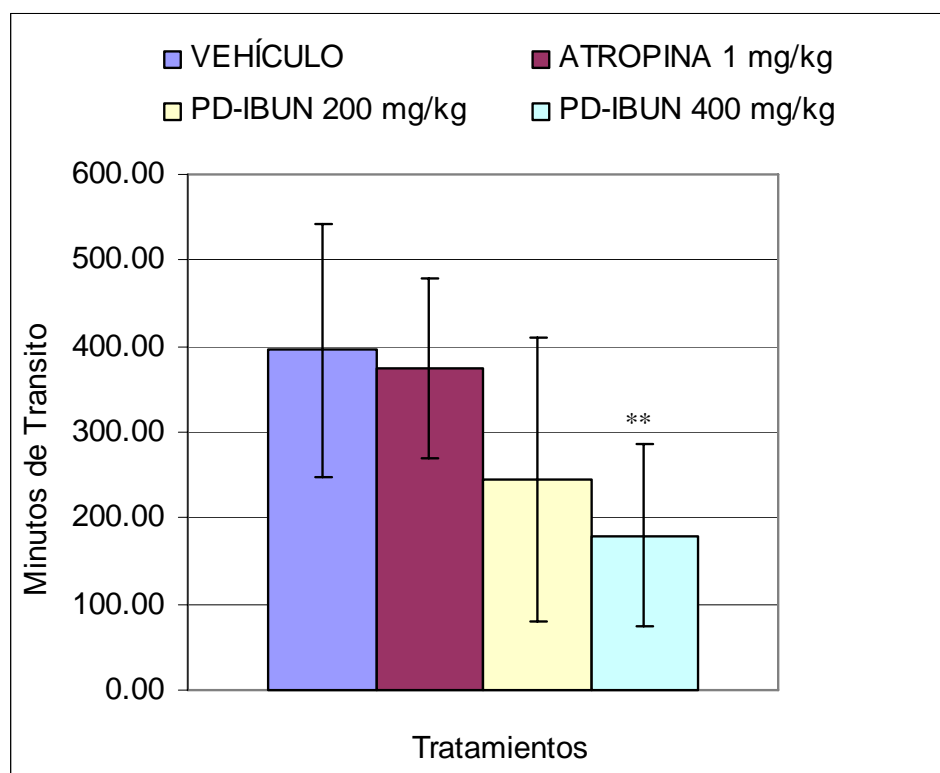


Figura 14. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal total en ratones ICR. Media ± D.E., n=10 ratones, ** p<0.05 respecto al vehículo.

Al comparar el polímero en dosis de 200 mg/kg respecto al vehículo no se encontró diferencia estadísticamente significativa, lo cual indica que el polímero en esta dosis no tiene actividad sobre el tránsito total; sin embargo, debido a la dispersión en los datos no se puede asegurar del todo que no exista un efecto sobre el tránsito intestinal (figura N° 14). El PD-IBUN 400 mg/kg, respecto al vehículo y el patrón (atropina) demuestra un efecto sobre el tránsito intestinal total que resulta en la disminución del tiempo de recorrido (diferencia estadísticamente significativa). El efecto del polímero en cuanto a la disminución de la motilidad intestinal puede ser debido a su comportamiento como fibra la cual, como lo describe Ofuya & col., (2005), tiene la habilidad de absorber agua formando un bolo mayor y de esta manera aumentando los movimientos peristálticos que resultan en la disminución del tiempo en el recorrido intestinal; efecto que puede resultar útil para promover la evacuación y contrarrestar cuadros de estreñimiento.

En conclusión, el PD-IBUN 400 mg/kg muestra un efecto promotor sobre el tránsito intestinal total.

5. PANORAMA GENERAL Y CONCLUSIONES

5. PANORAMA GENERAL Y CONCLUSIONES

Eastwood y Morris (1992) reportaron que los constituyentes principales de la fibra dietaria o carbohidratos no disponibles son polisacáridos no almidonados, que tienen una acción fisiológica a nivel gastrointestinal y que inhiben la absorción de glucosa y su toma a nivel intestinal. Estos autores estudiaron el rol de la viscosidad y fermentabilidad de fibras en el tratamiento de diabetes mellitas, encontrando su efecto sobre niveles los niveles de glucosa en sangre.

La ingesta de una gran cantidad de fibra dietaria ha sido recomendada para disminuir los niveles de lípidos en plasma en personas con hiperlipidemia y para mejorar el nivel de glucosa en sangre. En dichos ensayos, tanto en ratas como en humanos llegaron a la conclusión de que los polisacáridos de plantas tienen actividad hipoglucemiante e hipolipemiante (Frias & Sgarbieri, 1998).

Aunque la fibra dietaria ha demostrado tener efectos sobre el metabolismo de esteroides, este efecto no es tan sencillo de explicar, ya que como se menciona en la literatura, puede deberse a diversos mecanismos. Algunos de ellos pueden explicarse como la alteración de la absorción de lípidos, la reducción de ácido biliar en el intestino delgado, la absorción de bilis en el ciego, o finalmente de manera indirecta a través de ácidos grasos de cadena corta especialmente ácido propiónico resultantes de la fermentación de la fibra (Eastwood & Morris, 1992).

Teniendo en cuenta lo anterior, la actividad bioquímica de una fibra, como el polímero evaluado en el presente estudio, puede observarse a partir de efectos fisiológicos que contribuyan a la disminución o prevención en la elevación de niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre. Para ello, y como lo reporta la literatura (Frias & Sgarbieri, 1998), es entonces muy valioso realizar estudios con polímeros con características similares a la fibra y determinar el comportamiento entre fibras solubles.

La determinación de actividad sobre los NGS fue llevada a cabo en modelos de sobrecargas de diferentes carbohidratos como la glucosa, maltosa, sacarosa y almidón.

Los resultados mostraron que el polímero no tiene efecto sobre los NGS como potencial hipoglucemiante, pero que a la vez tampoco incrementa los NGS de manera significativa. Para la determinación de los niveles del perfil lipídico, el empleo del tyloxapol como acelerante en la producción de colesterol permitió evidenciar la leve actividad del polímero comparado con el grupo control hiperlipidémico. Sin embargo, los resultados demostraron que no había una diferencia estadísticamente significativa. El modelo utilizado permitió observar que la hiperlipidemia causada por agentes químicos no es contrarrestada por el efecto del polímero sobre parámetros bioquímicos. Es por ello que, como se propuso anteriormente, sería importante determinar la actividad del mismo en modelos de hiperlipidemias inducidos por dietas ricas en grasa. De esta manera, se podría evaluar si la actividad gastrointestinal del polímero está relacionada definitivamente con la disminución de los parámetros bioquímicos ya que, como se menciona en la literatura factores como viscosidad y solubilidad intestinal son indispensables para la acción de compuestos como las fibra solubles.

El modelo de actividad gastrointestinal parcial resultó ser un modelo útil para determinar la actividad del polímero comparado con compuestos inhibidores del tránsito, vislumbrando que su efecto fue superior y que por ende no se produce disminución de la evacuación de heces fecales. Sin embargo, aunque aún es desconocido el mecanismo de acción específico del PD-IBUN, con los resultados obtenidos en ensayos de actividad intestinal, el polímero no se descarta como un estimulante de la actividad gastrointestinal.

Con base en lo anterior se derivan las siguientes CONCLUSIONES:

1. El PD-IBUN en las dosis ensayadas no modifica la tolerancia oral a la glucosa, es decir, no muestra efecto anti-hiperglucemiante ni hipoglucemiante en ratones ICR.
2. El PD-IBUN en las dosis ensayadas no presenta un efecto anti-hiperglucemiante frente a la sobrecarga oral de maltosa, sacarosa y almidón en ratones ICR.
3. El PD-IBUN no presenta efecto protector bajo las dosis administradas, inclusive por administración repetida, sobre los NGS ante la sobrecarga oral de glucosa.

4. En el ensayo de tránsito intestinal parcial, el polímero no tiene efecto inhibidor ni promotor de la motilidad en ratones ICR.
5. El PD-IBUN 400 mg/kg muestra efecto promotor sobre el tránsito intestinal total en ratas tipo Wistar.
6. El PD-IBUN no tiene un efecto significativo en la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos en ratas tipo Wistar.
7. Del PD-IBUN evaluado en dos dosis tanto para los efectos bioquímicos como fisiológicos, se destaca su posible acción como fibra en la reducción de los tiempos de tránsito intestinal total.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACOSTA, S. (2003). Efecto hipoglicemiante y antioxidante del extracto acuoso de *Psidium guayaba* (guayaba) en ratas diabéticas. Tesis Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman

ALAD (2000). Guías para el diagnóstico y manejo de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia. *Rev. Asociación Latinoamericana de Diabetes*. Supl. 1. 1-79.

AMRANI S, Harnafi H, Bounani N H, Aziz M, Caid H S, Manfredini S, Besco E, Napolitano M, Bravo E. (2006). Hypolipidemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. *Phytoth. Res.*, 20: 1040-1045.

ANDERSON JW, Allgood LD, Lawrence A, Altringer LA, Jerdack GR, Hengehold DA, Morel JG. (2000). Cholesterol-lowering effects of psyllium intake adjunctive to diet therapy in men and women with hypercholesterolemia: meta-analysis of 8 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:472-479.

ARBOS J, Zegri LA, Lopez-Florian FRJ. (1993). A Simple method for determining the rate of gastrointestinal transit in the rat. *Physiol. Bioch. Biophys.*, 101:113-115.

COBOS O. (2004). Selección y caracterización de inulina de una fuente disponible en el país para ser utilizada como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales. Tesis Universidad Nacional de Colombia.

DELZENNE NM, Kok N (1999). Biochemical basis oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J. Nutr.*, 129:1467S-1470S

EASTWOOD MA, Morris ER. (1992). Physical properties of dietary fibre that influence physiological function: A model for polymers along the intestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:436-442.

FRIAS AC, Sgarbieri VC. (1998). Guar gum effects on food intake, blood serum lipids, and glucose levels of Wistar rats. *Plant. Foods. Hum. Nutr.*, 53:15-28.

GARCÍA IM. (2000). Estudio de la producción y caracterización de levana cepa 34.1. Laboratorio de tecnología de enzimas. Tesis Universidad Nacional de Colombia.

GIBSON G. (2004). Fibre and effects on probiotics (The prebiotic concept). *Clin. Nutr. Suppl.*, 1(2): 25-31.

GIRALDO SE. (2002). Caracterización de las propiedades de hidrofiliidad de levana de origen biotecnológico. Tecnología de enzimas. Tesis Universidad Nacional de Colombia.

GRENIER L, Calvo C, Cuellar A, Martínez S. (2007). Efecto hipoglicemiante y antioxidante del extracto alcohólico y acuoso de *Allophyllus cominia* (L). *SW. Rev. Cub. Quím.*, 19:65-67.

HALPERN M J. (1995). Lipids and arteriosclerosis. *Molec. Aspec. Med.* 16: 521-525

HARO O. (2007). Efecto de la fibra en un modelo de colitis experimental en rata. Papel de los ácidos grasos de cadena corta. Tesis Universidad de Granada- España.

HARNAFI H, Caid HS, Bounani NH, Aziz M, Amarani S. (2008). Hypolipemic activity polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem.*, 108: 205-212.

JIMENEZ-Escribano A, Rincón M., Pulido R., Saura-Calixto F. 2001. Guava fruit as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.*, 49:5489–5493.

JINGJING C, Xiangrong L. (2007). Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 16:290-294.

LENIESWSKA V, Rowland I. (2006). Effect on components of the intestinal microflora and plasma neuropeptide levels of feeding *Lactobacillus delbrueckii bifidobacterium*, and inulin to adult and elderly rats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:6533-6538.

LAPA J, Souccar C, Lima-Landman MT, Lima de MT. (2001). CYTED: Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales. *Rivaplamed. Brasil*, 51-53

MALARCA JM, García VM. (1997). Fundamentos de endocrinología. 4Ed. Editorial Salvat. 485-512.

MARIN MH. (2005). Actualización en el diagnóstico y manejo de la diabetes mellitus. Universidad Tecnológica de Pereira.

MARINHO MC, Lordelo MM, Cunha LF, Freire JPB (2007). Microbial activity in the gut of piglets: I. effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livest Sci.* 108: 236-239

MARROQUIN R, Flores M, García MM, Mora JL, Sánchez JF, Aguilar A. (2005). Efecto antihiper glucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. *Rev. Mex. Cien. Farm.* 36:27-32.

MAJITHIYA JB, Parmar AN, Balaraman R. (2004). Effect of curcumin on triton WR 1339 induced hypercholesterolemia in mice. *Indian J. Pharmacol.*, 36:381-384.

MCFARLANE S, Mcfarlane GT, Cummings JH. (2006). Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 24:701-714.

MOHARIB SA, El-Batran SA (2008). Hypoglycemic effect of dietary fibre in diabetic rats. *J. Agric. Sci.*, 4(5), 455-461.

MONRO J, Shaw M. (2008). Glycemic impact, glycemic glucose equivalents, glycemic index, and glycemic load, definitions, distinctions and implications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 87:273S-243S.

MUNAKATA A, Satoru I, Masahiro T, Schigeyuki N, Kazu S (1995). Effects of dietary fiber on gastrointestinal transit time, fecal properties and fat absorption in rats. *J. Exp. Med.* 176: 227-238.

MURRAY R, Granner D, Mayes P, Rodwell V (2001). *BIOQUIMICA DE HARPER*. Edición 11. editorial Mc Graw Hill.

MURILLO E, Tique M, Ospina L.F. (2006). Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 35 (1): 64-80.

OFUYA Z M, Gerogewill A A, AGU GO (2005). The effect of dietary fibre on transit time in rats. *Afr. J. Appl. Zool. Environ. Biol.*, 7:45-47.

PEJIC N. R, Lee T. D. (2006). Hypertriglyceridemia. *J. AM. Board Fam. Med.*, 19(3):310-316.

RIPSIN CM, Keenan JM, Jacobs DR, Elmer PJ, Welch RR, Horn LV, Lie K, Turnbull WH, Thyse FW, Kestin M, Hegsted M, Davidson DM, Davidson MH, Dugan LD, Wahnefried-Denmar W, Beling S (1992). Oat products and lipid lowering: a meta-analysis. *JAMA*, 67:3317-3325.

RODRIGUEZ R, Jimenez A, Bolaños JF, Guillén R, Heredia A. (2006). Dietary fiber from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends. Food Tech.*, 17:3-5.

SAENZ AC, Prado MC. (1998). Aislamiento de cepas nativas con actividad levansacarasa. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología. Tesis Colegio Mayor de Cundinamarca.

THEUWISSEN E, Mensink R. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol Behav.*, 94:285-292.

TUNGLAND BC , Meyer D. (2002). Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. *CRFSFS*. 3:78-92.

VAN LOO J, Cummings JH, Delzenne N, Englyst H. (1999). Functional food properties of nondigestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94- 1095). *Br. J. Nutr.*, 81:121-132.

VANHOOF K, De Schrijver R (1995). Effect of unprocessed and baked inulin on lipid metabolism in normo and hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*, 15: 1637-1646.

WOLK A, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Hu FB, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC. (1999). Long-term intake of dietary fiber and decreased risk of coronary heart disease among women. *JAMA.*, 281:1998-2004.

ANEXOS

ANEXO N°1. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga de glucosa (ensayo preliminar)

Two-way ANOVA		
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	13,31	P<0.0001
Column Factor	9,86	P<0.0001
Row Factor	29,47	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Column Factor	***	Yes
Row Factor	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	117600	9798	4,217
Column Factor	3	87100	29030	12,50
Row Factor	4	260300	65080	28,01
Residual	180	418200	2323	

Vehículo vs Glibenclamida				
Row Factor	Vehículo	Glibenclamida	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	73,20	67,20	-6,000	-70.13 to 58.13
Hora 1	191,5	99,50	-92,00	-156.1 to -27.87
Hora 2	203,8	136,2	-67,60	-131.7 to -3.473
Hora 3	154,9	89,10	-65,80	-129.9 to -1.673
Hora 5	96,90	57,60	-39,30	-103.4 to 24.83

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-6,000	0,2783	P > 0.05	ns
Hora 1	-92,00	4,268	P<0.001	***
Hora 2	-67,60	3,136	P < 0.05	*
Hora 3	-65,80	3,052	P < 0.05	*
Hora 5	-39,30	1,823	P > 0.05	ns

Vehiculo vs PD-IBUN 50 mg/kg				
Row Factor	Vehiculo	PD-IBUN 50	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	73,20	72,80	-0,4000	-64.53 to 63.73
Hora 1	191,5	105,3	-86,20	-150.3 to -22.07
Hora 2	203,8	236,8	33,00	-31.13 to 97.13
Hora 3	154,9	170,7	15,80	-48.33 to 79.93
Hora 5	96,90	97,10	0,2000	-63.93 to 64.33

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-0,4000	0,01856	P > 0.05	ns
Hora 1	-86,20	3,999	P<0.001	***
Hora 2	33,00	1,531	P > 0.05	ns
Hora 3	15,80	0,7330	P > 0.05	ns
Hora 5	0,2000	0,009278	P > 0.05	ns

Vehiculo vs PD-IBUN 100 mg/kg				
Row Factor	Vehiculo	PD-IBUN 100	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	73,20	87,70	14,50	-49.63 to 78.63
Hora 1	191,5	118,8	-72,70	-136.8 to -8.573
Hora 2	203,8	118,8	-85,00	-149.1 to -20.87
Hora 3	154,9	161,4	6,500	-57.63 to 70.63
Hora 5	96,90	104,0	7,100	-57.03 to 71.23

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	14,50	0,6727	P > 0.05	ns
Hora 1	-72,70	3,373	P<0.01	**
Hora 2	-85,00	3,943	P<0.001	***
Hora 3	6,500	0,3015	P > 0.05	ns
Hora 5	7,100	0,3294	P > 0.05	ns

ANEXO N° 2. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga de glucosa.

Table Analyzed	Data 1	
Two-way RM ANOVA	Matching by cols	
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	13,25	P<0.0001
Time	30,65	P<0.0001
Column Factor	22,01	P<0.0001
Subjects (matching)	16,5694	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Time	***	Yes
Column Factor	***	Yes
Subjects (matching)	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	16	24050	1503	6,621
Time	4	55630	13910	61,26
Column Factor	4	39950	9988	11,63
Subjects (matching)	35	30070	859,2	3,785
Residual	140	31780	227,0	

Bonferroni posttests				
Vehiculo vs Glibenclamida				
Column Factor	Vehiculo	Glibenclamida	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	96,50	75,75	-20,75	-49.59 to 8.087
Hora 1	97,63	89,88	-7,750	-36.59 to 21.09
Hora 2	150,4	76,50	-73,88	-102.7 to -45.04
Hora 3	141,5	66,88	-74,63	-103.5 to -45.79
Hora 5	105,4	70,63	-34,75	-63.59 to -5.913

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-20,75	2,207	P > 0.05	ns
Hora 1	-7,750	0,8245	P > 0.05	ns
Hora 2	-73,88	7,859	P<0.001	***
Hora 3	-74,63	7,939	P<0.001	***
Hora 5	-34,75	3,697	P<0.01	**

Vehiculo vs PD-IBUN 100				
Column Factor	Vehiculo	PD-IBUN 100 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	96,50	80,25	-16,25	-45.09 to 12.59
Hora 1	97,63	93,25	-4,375	-33.21 to 24.46
Hora 2	150,4	130,3	-20,13	-48.96 to 8.712
Hora 3	141,5	92,88	-48,63	-77.46 to -19.79
Hora 5	105,4	82,88	-22,50	-51.34 to 6.337

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-16,25	1,729	P > 0.05	ns
Hora 1	-4,375	0,4654	P > 0.05	ns
Hora 2	-20,13	2,141	P > 0.05	ns
Hora 3	-48,63	5,173	P<0.001	***
Hora 5	-22,50	2,394	P > 0.05	ns

Vehiculo vs PD-IBUN 200				
Column Factor	Vehiculo	PD-IBUN 200 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	96,50	77,13	-19,38	-48.21 to 9.462
Hora 1	97,63	103,6	6,000	-22.84 to 34.84
Hora 2	150,4	147,5	-2,875	-31.71 to 25.96
Hora 3	141,5	100,5	-41,00	-69.84 to -12.16
Hora 5	105,4	91,38	-14,00	-42.84 to 14.84

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-19,38	2,061	P > 0.05	ns
Hora 1	6,000	0,6383	P > 0.05	ns
Hora 2	-2,875	0,3058	P > 0.05	ns
Hora 3	-41,00	4,362	P<0.001	***
Hora 5	-14,00	1,489	P > 0.05	ns

Vehiculo vs Polimero 400				
Column Factor	Vehiculo	Polimero 400	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	96,50	81,13	-15,38	-44.21 to 13.46
Hora 1	97,63	103,5	5,875	-22.96 to 34.71
Hora 2	150,4	149,9	-0,5000	-29.34 to 28.34
Hora 3	141,5	104,5	-37,00	-65.84 to -8.163
Hora 5	105,4	97,25	-8,125	-36.96 to 20.71

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-15,38	1,636	P > 0.05	ns
Hora 1	5,875	0,6250	P > 0.05	ns
Hora 2	-0,5000	0,05319	P > 0.05	ns
Hora 3	-37,00	3,936	P<0.001	***
Hora 5	-8,125	0,8644	P > 0.05	ns

ANEXO N° 3. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga de sacarosa

Two-way RM ANOVA	Matching by cols	
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	3,28	0,0003
Time	56,25	P<0.0001
Column Factor	9,65	0,0028
Subjects (matching)	20,5427	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Time	***	Yes
Column Factor	**	Yes
Subjects (matching)	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	9	5610	623,3	3,830
Time	3	96200	32070	197,0
Column Factor	3	16490	5498	5,634
Subjects (matching)	36	35130	975,8	5,995
Residual	108	17580	162,8	

Bonferroni posttests				
Vehículo vs Acarbosa				
Column Factor	Vehículo	Acarbosa	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	74,80	72,50	-2,300	-27.21 to 22.61
Hora 30	153,1	112,8	-40,30	-65.21 to -15.39
Hora 1	127,8	116,3	-11,50	-36.41 to 13.41
Hora 2	102,4	97,70	-4,700	-29.61 to 20.21

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-2,300	0,2688	P > 0.05	ns
Hora 30	-40,30	4,710	P<0.001	***
Hora 1	-11,50	1,344	P > 0.05	ns
Hora 2	-4,700	0,5493	P > 0.05	ns

Vehículo vs Polímero 200				
Column Factor	Vehículo	Polímero 200	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	74,80	90,90	16,10	-8.813 to 41.01
Hora 30	153,1	156,8	3,700	-21.21 to 28.61
Hora 1	127,8	145,1	17,30	-7.613 to 42.21
Hora 2	102,4	120,3	17,90	-7.013 to 42.81

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	16,10	1,882	P > 0.05	ns
Hora 30	3,700	0,4324	P > 0.05	ns
Hora 1	17,30	2,022	P > 0.05	ns
Hora 2	17,90	2,092	P > 0.05	ns

Vehículo vs Polímero 400				
Column Factor	Vehículo	Polímero 400	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	74,80	77,10	2,300	-22.61 to 27.21
Hora 30	153,1	152,4	-0,7000	-25.61 to 24.21
Hora 1	127,8	129,5	1,700	-23.21 to 26.61
Hora 2	102,4	110,5	8,100	-16.81 to 33.01

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	2,300	0,2688	P > 0.05	ns
Hora 30	-0,7000	0,08181	P > 0.05	ns
Hora 1	1,700	0,1987	P > 0.05	ns
Hora 2	8,100	0,9467	P > 0.05	ns

ANEXO N° 4. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga oral de maltosa

Two-way ANOVA		
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	4,13	0,1224
Column Factor	2,75	0,0085
Row Factor	61,45	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Column Factor	**	Yes
Row Factor	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	7430	619	1,52
Column Factor	3	4940	1650	4,06
Row Factor	4	110000	27600	67,9
Residual	140	56900	406	

Bonferroni posttests				
Vehículo vs Acarbosa				
Row Factor	Vehículo	Acarbosa	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	68,3	73,0	4,75	-25.3 to 34.8
Hora 1	141	130	-11,8	-41.8 to 18.3
Hora 2	154	141	-12,8	-42.8 to 17.3
Hora 3	130	125	-4,75	-34.8 to 25.3
Hora 5	88,1	95,3	7,13	-23.0 to 37.2

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	4,75	0,471	P > 0.05	ns
Hora 1	-11,8	1,17	P > 0.05	ns
Hora 2	-12,8	1,27	P > 0.05	ns
Hora 3	-4,75	0,471	P > 0.05	ns
Hora 5	7,13	0,707	P > 0.05	ns

Vehículo vs PD-IBUN 200 mg/kg				
Row Factor	Vehículo	PD-IBUN 200 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	68,3	73,9	5,63	-24.5 to 35.7
Hora 1	141	103	-38,4	-68.5 to -8.28
Hora 2	154	132	-21,9	-52.0 to 8.22
Hora 3	130	114	-16,0	-46.1 to 14.1
Hora 5	88,1	86,4	-1,75	-31.8 to 28.3

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	5,63	0,558	P > 0.05	ns
Hora 1	-38,4	3,81	P < 0.01	**
Hora 2	-21,9	2,17	P > 0.05	ns
Hora 3	-16,0	1,59	P > 0.05	ns
Hora 5	-1,75	0,174	P > 0.05	ns

Vehículo vs PD-IBUN 400 mg/kg				
Row Factor	Vehículo	PD-IBUN 400 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	68,3	70,8	2,50	-27.6 to 32.6
Hora 1	141	114	-27,5	-57.6 to 2.60
Hora 2	154	157	3,38	-26.7 to 33.5
Hora 3	130	130	0,125	-30.0 to 30.2
Hora 5	88,1	97,4	9,25	-20.8 to 39.3

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	2,50	0,248	P > 0.05	ns
Hora 1	-27,5	2,73	P < 0.05	*
Hora 2	3,38	0,335	P > 0.05	ns
Hora 3	0,125	0,0124	P > 0.05	ns
Hora 5	9,25	0,918	P > 0.05	ns

ANEXO N°5. Efecto del PD-IBUN sobre los NGS en sobrecarga de almidón

Two-way RM ANOVA	Matching by cols	
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	4,21	0,0015
Time	58,05	P<0.0001
Column Factor	3,95	0,0309
Subjects (matching)	14,3092	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	**	Yes
Time	***	Yes
Column Factor	*	Yes
Subjects (matching)	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	15	46190	3079	2,589
Time	5	637400	127500	107,2
Column Factor	3	43330	14440	3,309
Subjects (matching)	36	157100	4365	3,670
Residual	180	214100	1189	
Bonferroni posttests				
Vehículo vs Acarbosa				
Column Factor	Vehículo	Acarbosa	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	111,7	113,3	1,600	-54.50 to 57.70
Hora 30	132,1	134,5	2,400	-53.70 to 58.50
Hora 1	229,3	179,6	-49,70	-105.8 to 6.402
Hora 1:30	275,9	198,4	-77,50	-133.6 to -21.40
Hora 2	205,8	173,8	-32,00	-88.10 to 24.10
Hora 4	114,2	110,3	-3,900	-60.00 to 52.20

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	1,600	0,08630	P > 0.05	ns
Hora 30	2,400	0,1295	P > 0.05	ns
Hora 1	-49,70	2,681	P < 0.05	*
Hora 1:30	-77,50	4,180	P<0.001	***
Hora 2	-32,00	1,726	P > 0.05	ns
Hora 4	-3,900	0,2104	P > 0.05	ns

Vehículo vs Polimero 200				
Column Factor	Vehículo	Polimero 200	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	111,7	115,8	4,100	-52.00 to 60.20
Hora 30	132,1	131,9	-0,2000	-56.30 to 55.90
Hora 1	229,3	196,1	-33,20	-89.30 to 22.90
Hora 1:30	275,9	251,6	-24,30	-80.40 to 31.80
Hora 2	205,8	218,6	12,80	-43.30 to 68.90
Hora 4	114,2	117,3	3,100	-53.00 to 59.20

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	4,100	0,2212	P > 0.05	ns
Hora 30	-0,2000	0,01079	P > 0.05	ns
Hora 1	-33,20	1,791	P > 0.05	ns
Hora 1:30	-24,30	1,311	P > 0.05	ns
Hora 2	12,80	0,6904	P > 0.05	ns
Hora 4	3,100	0,1672	P > 0.05	ns

Vehículo vs Polimero 400				
Column Factor	Vehículo	Polimero 400	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	111,7	119,6	7,900	-48.20 to 64.00
Hora 30	132,1	149,9	17,80	-38.30 to 73.90
Hora 1	229,3	199,0	-30,30	-86.40 to 25.80
Hora 1:30	275,9	278,6	2,700	-53.40 to 58.80
Hora 2	205,8	249,0	43,20	-12.90 to 99.30
Hora 4	114,2	134,7	20,50	-35.60 to 76.60

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	7,900	0,4261	P > 0.05	ns
Hora 30	17,80	0,9601	P > 0.05	ns
Hora 1	-30,30	1,634	P > 0.05	ns
Hora 1:30	2,700	0,1456	P > 0.05	ns
Hora 2	43,20	2,330	P > 0.05	ns
Hora 4	20,50	1,106	P > 0.05	ns

ANEXO N° 6. Efecto de la administración repetida del PD-IBUN sobre los NGS

Two-way RM ANOVA	Matching by cols	
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	7,95	P<0.0001
Time	59,83	P<0.0001
Treatment	2,88	0,0674
Subjects (matching)	13,7263	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Time	***	Yes
Treatment	ns	No
Subjects (matching)	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	16	91060	5691	5,730
Time	4	685000	171200	172,4
Treatment	4	32990	8248	2,362
Subjects (matching)	45	157200	3493	3,516
Residual	180	178800	993,2	

Bonferroni posttests				
Agua vs Vehiculo				
Treatment	Agua	Vehiculo	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	89,40	78,20	-11,20	-68.82 to 46.42
Hora 1	111,2	176,5	65,30	7.681 to 122.9
Hora 2	244,1	244,2	0,09999	-57.52 to 57.72
Hora 3	143,3	131,2	-12,10	-69.72 to 45.52
Hora 5	103,7	98,10	-5,600	-63.22 to 52.02

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-11,20	0,6481	P > 0.05	ns
Hora 1	65,30	3,779	P<0.01	**
Hora 2	0,09999	0,005786	P > 0.05	ns
Hora 3	-12,10	0,7002	P > 0.05	ns
Hora 5	-5,600	0,3241	P > 0.05	ns

Agua vs Glibenclamida				
Treatment	Agua	Glibenclamida	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	89,40	82,40	-7,000	-64.62 to 50.62
Hora 1	111,2	162,7	51,50	-6.119 to 109.1
Hora 2	244,1	175,1	-69,00	-126.6 to -11.38
Hora 3	143,3	109,7	-33,60	-91.22 to 24.02
Hora 5	103,7	81,40	-22,30	-79.92 to 35.32

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-7,000	0,4051	P > 0.05	ns
Hora 1	51,50	2,980	P < 0.05	*
Hora 2	-69,00	3,993	P < 0.001	***
Hora 3	-33,60	1,944	P > 0.05	ns
Hora 5	-22,30	1,290	P > 0.05	ns

Agua vs Polímero 200				
Treatment	Agua	Polímero 200	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	89,40	73,60	-15,80	-73.42 to 41.82
Hora 1	111,2	92,40	-18,80	-76.42 to 38.82
Hora 2	244,1	232,4	-11,70	-69.32 to 45.92
Hora 3	143,3	117,4	-25,90	-83.52 to 31.72
Hora 4	103,7	90,90	-12,80	-70.42 to 44.82

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-15,80	0,9143	P > 0.05	ns
Hora 1	-18,80	1,088	P > 0.05	ns
Hora 2	-11,70	0,6771	P > 0.05	ns
Hora 3	-25,90	1,499	P > 0.05	ns
Hora 5	-12,80	0,7407	P > 0.05	ns

Agua vs PD-IBUN 400 mg/kg

Treatment	Agua	PD-IBUN 400 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	89,40	65,10	-24,30	-81.92 to 33.32
Hora 1	111,2	80,30	-30,90	-88.52 to 26.72
Hora 2	244,1	239,2	-4,900	-62.52 to 52.72
Hora 3	143,3	107,0	-36,30	-93.92 to 21.32
Hora 5	103,7	84,00	-19,70	-77.32 to 37.92

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-24,30	1,406	P > 0.05	ns
Hora 1	-30,90	1,788	P > 0.05	ns
Hora 2	-4,900	0,2836	P > 0.05	ns
Hora 3	-36,30	2,101	P > 0.05	ns
Hora 5	-19,70	1,140	P > 0.05	ns

Vehiculo vs Glibenclamida

Treatment	Vehiculo	Glibenclamida	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	78,20	82,40	4,200	-53.42 to 61.82
Hora 1	176,5	162,7	-13,80	-71.42 to 43.82
Hora 2	244,2	175,1	-69,10	-126.7 to -11.48
Hora 3	131,2	109,7	-21,50	-79.12 to 36.12
Hora 5	98,10	81,40	-16,70	-74.32 to 40.92

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	4,200	0,2430	P > 0.05	ns
Hora 1	-13,80	0,7986	P > 0.05	ns
Hora 2	-69,10	3,999	P < 0.001	***
Hora 3	-21,50	1,244	P > 0.05	ns
Hora 5	-16,70	0,9664	P > 0.05	ns

Vehiculo vs Polímero 200

Treatment	Vehiculo	Polímero 200	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	78,20	73,60	-4,600	-62.22 to 53.02
Hora 1	176,5	92,40	-84,10	-141.7 to -26.48
Hora 2	244,2	232,4	-11,80	-69.42 to 45.82
Hora 3	131,2	117,4	-13,80	-71.42 to 43.82
Hora 5	98,10	90,90	-7,200	-64.82 to 50.42

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-4,600	0,2662	P > 0.05	ns
Hora 1	-84,10	4,867	P < 0.001	***
Hora 2	-11,80	0,6828	P > 0.05	ns
Hora 3	-13,80	0,7986	P > 0.05	ns
Hora 5	-7,200	0,4167	P > 0.05	ns

Vehiculo vs PD-IBUN 400 mg/kg				
Treatment	Vehiculo	PD-IBUN 400 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	78,20	65,10	-13,10	-70.72 to 44.52
Hora 1	176,5	80,30	-96,20	-153.8 to -38.58
Hora 2	244,2	239,2	-5,000	-62.62 to 52.62
Hora 3	131,2	107,0	-24,20	-81.82 to 33.42
Hora 5	98,10	84,00	-14,10	-71.72 to 43.52

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-13,10	0,7581	P > 0.05	ns
Hora 1	-96,20	5,567	P < 0.001	***
Hora 2	-5,000	0,2893	P > 0.05	ns
Hora 3	-24,20	1,400	P > 0.05	ns
Hora 5	-14,10	0,8159	P > 0.05	ns

Glibenclamida vs Polímero 200				
Treatment	Glibenclamida	Polímero 200	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	82,40	73,60	-8,800	-66.42 to 48.82
Hora 1	162,7	92,40	-70,30	-127.9 to -12.68
Hora 2	175,1	232,4	57,30	-0.3190 to 114.9
Hora 3	109,7	117,4	7,700	-49.92 to 65.32
Hora 5	81,40	90,90	9,500	-48.12 to 67.12

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-8,800	0,5092	P > 0.05	ns
Hora 1	-70,30	4,068	P < 0.001	***
Hora 2	57,30	3,316	P < 0.01	**
Hora 3	7,700	0,4456	P > 0.05	ns
Hora 5	9,500	0,5497	P > 0.05	ns

Glibenclamida vs PD-IBUN 400 mg/kg				
Treatment	Glibenclamida	PD-IBUN 400 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	82,40	65,10	-17,30	-74.92 to 40.32
Hora 1	162,7	80,30	-82,40	-140.0 to -24.78
Hora 2	175,1	239,2	64,10	6.481 to 121.7
Hora 3	109,7	107,0	-2,700	-60.32 to 54.92
Hora 5	81,40	84,00	2,600	-55.02 to 60.22

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-17,30	1,001	P > 0.05	ns
Hora 1	-82,40	4,768	P < 0.001	***
Hora 2	64,10	3,709	P < 0.01	**
Hora 3	-2,700	0,1562	P > 0.05	ns
Hora 5	2,600	0,1505	P > 0.05	ns

Polímero 200 vs PD-IBUN 400 mg/kg

Treatment	Polímero 200	PD-IBUN 400 mg/kg	Difference	95% CI of diff.
Hora 0	73,60	65,10	-8,500	-66.12 to 49.12
Hora 1	92,40	80,30	-12,10	-69.72 to 45.52
Hora 2	232,4	239,2	6,800	-50.82 to 64.42
Hora 3	117,4	107,0	-10,40	-68.02 to 47.22
Hora 5	90,90	84,00	-6,900	-64.52 to 50.72

Treatment	Difference	t	P value	Summary
Hora 0	-8,500	0,4919	P > 0.05	ns
Hora 1	-12,10	0,7002	P > 0.05	ns
Hora 2	6,800	0,3935	P > 0.05	ns
Hora 3	-10,40	0,6018	P > 0.05	ns
Hora 5	-6,900	0,3993	P > 0.05	ns

ANEXO N° 7. Efecto del PD-IBUN sobre los niveles de colesterol

One-way analysis of variance	
P value	0,0014
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	5,318
R squared	0,4783

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	11,02
P value	0,0510
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	72310	5	14460
Residual (within columns)	78870	29	2720
Total	151200	34	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Sano vs Tyloxapol	-159,6	7,147	Yes	***	-255.9 to -63.25
Sano vs Lovastatina	-50,67	2,380	No	ns	-142.5 to 41.17
Sano vs GB	-75,40	3,542	No	ns	-167.2 to 16.44
Sano vs P200	-57,76	2,713	No	ns	-149.6 to 34.08
Sano vs P400	-68,74	3,229	No	ns	-160.6 to 23.10
Tyloxapol vs Lovastatina	108,9	4,877	Yes	*	12.58 to 205.2
Tyloxapol vs GB	84,18	3,770	No	ns	-12.15 to 180.5
Tyloxapol vs P200	101,8	4,560	Yes	*	5.495 to 198.1
Tyloxapol vs P400	90,84	4,068	No	ns	-5.487 to 187.2
Lovastatina vs GB	-24,73	1,162	No	ns	-116.6 to 67.11
Lovastatina vs P200	-7,088	0,3329	No	ns	-98.93 to 84.75
Lovastatina vs P400	-18,07	0,8488	No	ns	-109.9 to 73.77
GB vs P200	17,64	0,8286	No	ns	-74.20 to 109.5
GB vs P400	6,660	0,3128	No	ns	-85.18 to 98.50
P200 vs P400	-10,98	0,5158	No	ns	-102.8 to 80.86

ANEXO N° 8. Efecto del PD-IBUN sobre los niveles de triglicéridos

One-way analysis of variance	
P value	0,0139
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	3,531
R squared	0,3953

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	18,28
P value	0,0026
P value summary	**
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1009000	5	201900
Residual (within columns)	1544000	27	57180
Total	2553000	32	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Sano vs Tyloxapol	-561,5	5,484	Yes	**	-1006 to -117.4
Sano vs Lovastatina	-302,6	3,100	No	ns	-726.0 to 120.8
Sano vs GB	-343,5	3,519	No	ns	-766.9 to 79.92
Sano vs P200	-412,3	4,027	No	ns	-856.4 to 31.82
Sano vs P400	-196,0	1,915	No	ns	-640.1 to 248.1
Tyloxapol vs Lovastatina	258,8	2,528	No	ns	-185.3 to 702.9
Tyloxapol vs GB	218,0	2,129	No	ns	-226.1 to 662.0
Tyloxapol vs P200	149,2	1,395	No	ns	-314.7 to 613.0
Tyloxapol vs P400	365,4	3,417	No	ns	-98.42 to 829.3
Lovastatina vs GB	-40,89	0,4189	No	ns	-464.3 to 382.5
Lovastatina vs P200	-109,7	1,071	No	ns	-553.8 to 334.4
Lovastatina vs P400	106,6	1,041	No	ns	-337.5 to 550.7
GB vs P200	-68,77	0,6717	No	ns	-512.9 to 375.3
GB vs P400	147,5	1,440	No	ns	-296.6 to 591.6
P200 vs P400	216,2	2,022	No	ns	-247.6 to 680.1

ANEXO N° 9. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal parcial en ratas Wistar

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	36,28
R squared	0,7706

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	18,10
P value	0,0028
P value summary	**
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	37610	5	7522
Residual (within columns)	11200 mg/kg	54	207,3
Total	48810	59	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Vehiculo vs Atropina	56,15	12,33	Yes	***	37.10 to 75.20
Vehiculo vs Atropina +PD-IBUN200 mg/kg	53,89	11,84	Yes	***	34.84 to 72.94
Vehiculo vs PD-IBUN 200 mg/kg	-0,5746	0,1262	No	ns	-19.63 to 18.48
Vehiculo vs PD-IBUN 400 mg/kg	-1,887	0,4143	No	ns	-20.94 to 17.16
Vehiculo vs Aceite de oliva	17,31	3,801	No	ns	-1.744 to 36.36
Atropina vs Atropina +PD-IBUN200 mg/kg	-2,253	0,4947	No	ns	-21.30 to 16.80
Atropina vs PD-IBUN 200 mg/kg	-56,72	12,46	Yes	***	-75.77 to -37.67
Atropina vs PD-IBUN 400 mg/kg	-58,03	12,74	Yes	***	-77.08 to -38.98
Atropina vs Aceite de oliva	-38,84	8,530	Yes	***	-57.89 to -19.79
Atropina +PD-IBUN 200 mg/kg vs PD-IBUN 200 mg/kg	-54,47	11,96	Yes	***	-73.52 to -35.42
Atropina +PD-IBUN 200 mg/kg vs PD-IBUN 400 mg/kg	-55,78	12,25	Yes	***	-74.83 to -36.73
Atropina +PD-IBUN 200 mg/kg vs Aceite de oliva	-36,59	8,035	Yes	***	-55.64 to -17.54
PD-IBUN 200 mg/kg vs PD-IBUN 400 mg/kg	-1,312	0,2881	No	ns	-20.36 to 17.74
PD-IBUN 200 mg/kg vs Aceite de oliva	17,88	3,927	No	ns	-1.170 to 36.93
PD-IBUN 400 mg/kg vs Aceite de oliva	19,19	4,215	Yes	*	0.1424 to 38.24

ANEXO N°10. Efecto del PD-IBUN sobre el tránsito intestinal total en ratones ICR

One-way analysis of variance	
P value	0,0020
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	6,029
R squared	0,3344

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	2,770
P value	0,4284
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	321800	3	107300
Residual (within columns)	640600	36	17790
Total	962400	39	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
Vehículo vs Atropina	20,80	0,4931	No	ns
Vehículo vs PD-IBUN-200	151,3	3,587	No	ns
Vehículo vs PD-IBUN-400	215,4	5,106	Yes	**
Atropina vs PD-IBUN-200	130,5	3,094	No	ns
Atropina vs PD-IBUN-400	194,6	4,613	Yes	*
PD-IBUN-200 vs PD-IBUN-400	64,10	1,520	No	ns