



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**Evaluación del efecto hipoglucemiante y
antibacteriano del extracto acuoso
de *Ageratina petiolaris*.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:

Granja Pacheco Habacuc

Número de cuenta: 309100168

Director de tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Asesor de tesis: Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Lugar de desarrollo:

Laboratorio No.1 Primer Piso U.M.I.E.Z Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza, UNAM

Ciudad de México 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice.

1	Introducción.....	1
2	Marco Teórico.....	3
2.1	Epidemiología de la Diabetes.....	3
2.2	Definiciones de Diabetes Mellitus 1 y 2 (DM1, DM2).....	4
2.3	Complicaciones microvasculares y macrovasculares.....	6
2.3.1	Retinopatía.....	7
2.3.2	Nefropatía.....	7
2.3.3	Neuropatía.....	7
2.3.4	Enfermedades cardiovasculares.....	8
2.3.5	Enfermedad cerebral vascular.....	8
2.4	Insulina y su alteración en la Diabetes.....	8
2.5	Tratamiento de la Diabetes.....	9
2.5.1	Modificación de Dieta y ejercicio.....	9
2.5.2	Tratamiento con plantas medicinales.....	10
2.5.3	Componentes activos de plantas en el tratamiento de DM2.....	10

4.4	Uso de hipoglucemiantes orales.....	11
2.6	Agentes antibacterianos.....	13
2.6.1	Quinolonas y ciprofloxacino.....	14
2.7	Modelo para determinar actividad antibacteriana.....	15
2.8	Uso de plantas medicinales.....	16
2.8.1	Características botánicas de <i>Ageratina Petiolaris</i>	18
2.9	Modelo hipoglucemiante en ratones.....	19
2.9.1	Manejo adecuado del material biológico de acuerdo a la NOM 062ZOO.....	20
3	Planteamiento del problema.....	23
4	Hipótesis.....	25
5	Objetivo.....	25
6	Diseño experimental.....	26
7	Material y métodos.....	27
8	Resultados.....	36
9	Discusión.....	45
10	Conclusiones.....	48
11	Referencias.....	49
12	Anexos.....	54

1 Introducción:

En México la diabetes mellitus (DM) es un problema de salud con un crecimiento constante que genera una mala calidad de vida en los pacientes, así como altos costos económicos en el sector salud. Actualmente los tratamientos farmacológicos no tienen alta efectividad debido a diversos factores, como malos hábitos alimenticios y falta de ejercicio. También se encuentran los efectos adversos de los medicamentos (insuficiencia renal, resistencia al medicamento, hipertensión arterial, entre otros) que son un problema de salud al que se debe de prestar atención interdisciplinaria.

En México se encuentra una cantidad importante de remedios en la herbolaria tradicional, en la mayoría de las plantas con usos medicinales prevalece una falta de investigación que corrobore sus propiedades. Entre las especies utilizadas para el tratamiento empírico de la Diabetes Mellitus se encuentran algunas plantas del orden *Asteraceae*. *Ageratina petiolaris* (conocida como hierba del burro, hierba del ángel) pertenece a dicho orden, se utiliza empíricamente en el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y se sabe que algunas especies del orden *Asteraceae* presentan actividad contra bacterias.

En el uso de plantas medicinales se ha observado que algunos extractos generan efectos adversos como: hipertensión arterial, taquicardia, ceguera, casos de embolia, etc. y aún siguen siendo utilizadas con dosis variadas que agravan los problemas de salud. En ocasiones las personas abandonan el tratamiento farmacéutico por uno herbolario debido a sus bajos costos y la consecuencia es que agravan sus padecimientos.

Alrededor del 70% de las plantas que se utilizan tradicionalmente no se han estudiado a profundidad, este es el caso de *Ageratina petiolaris*, primeramente se debe comprobar si presenta efecto terapéutico y después continuar con la investigación para encontrar los efectos adversos que podrían causar en los pacientes que utilizan el extracto sin una posología determinada.

Algunas especies del orden *Asteraceae* también se utilizan empíricamente en el tratamiento de infecciones bacterianas, por lo que es importante que la actividad antibacteriana sea evaluada para su comprobación. Sin embargo, los estudios de la planta *A. petiolaris* son escasos, en esto radica la importancia de la presente investigación, en la cual se evaluará si posee los efectos hipoglucemiante y antimicrobiano, por lo que se evaluará si el extracto acuoso de la planta *Ageratina petiolaris* presenta la actividad hipoglucemiante utilizando un modelo de Diabetes Mellitus tipo 2 con ratones CD1 sanos, a los cuales se les induce una hiperglucemia temporal. A su vez, la actividad antibacteriana se determinará utilizando *S. aureus* y *E. coli* como una muestra de bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente,

Es importante que el estudio se profundice, ya que en caso de encontrar la propiedad terapéutica en el extracto acuoso de *A. petiolaris*, podría servir como ayuda en el tratamiento de DM2 y con un probable uso en el tratamiento infecciones bacterianas; en el caso contrario se deberá establecer que el uso de la planta como tratamiento alternativo no es apropiado.

2 Marco Teórico.

2.1 Epidemiología de la Diabetes en México.

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes, esto es más de 285 millones de personas con diabetes. La Federación Internacional de Diabetes informa que los países con mayor población de diabéticos son: China, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México. La diabetes tiene causas múltiples y es de carácter crónico, en su etapa inicial no produce síntomas, cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. En México la esperanza de vida en el 2010 fue de 77 años, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años. ¹

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es un problema de salud a nivel mundial que se presenta en mayor proporción en los países en vías de desarrollo. En México se ha observado un aumento continuo del padecimiento desde hace más de 30 años. Si bien actualmente la DM tipo 2 es uno de los principales problemas epidemiológicos y emergentes en nuestro país, existen estimaciones que para el año 2025 se podría llegar a triplicar el número de casos. ²

Se ha estimado que para 2025 en México habrá unos 11.7 millones de diabéticos, cifra que continuaría en aumento debido al envejecimiento, la urbanización y la

alta prevalencia de obesidad e inactividad física que caracterizan a la población mexicana. Se ha estimado que para el año 2030 el costo en atención médica llegara a US\$ 14 695 229 000 que representan el 15% del gasto en salud;, lo que a su vez generará un impacto negativo. En México la DM debe ser considerada como una prioridad de salud pública, cuyo manejo requiere informar a la sociedad en su conjunto acerca de la magnitud y la complejidad del problema.

Dado la complejidad del problema de salud se necesita investigación interdisciplinaria que permita establecer un modelo preventivo y de tratamiento que pueda hacer frente a los retos de tratamiento individual del paciente, ya que existe baja adherencia al tratamiento, desapego a la dieta recomendada, baja actividad física y baja disponibilidad de servicios y medicamentos asociados con el tratamiento glicémico. ³

2.2 Diabetes Mellitus tipo 1 y 2

Se denomina diabetes mellitus al grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con complicaciones a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, especialmente de los ojos, riñones, nervios, vasos sanguíneos y corazón.

DM tipo 1 (destrucción de células beta).

La diabetes tipo 1, se caracteriza por la destrucción de los islotes pancreáticos de las células beta y posterior deficiencia absoluta de insulina, por lo que los individuos presentan la tendencia hacia la cetosis en condiciones basales.

La forma de diabetes autoinmune representa del 5% al 10% de los pacientes diabéticos y es la resultante de la destrucción autoinmune de las células beta

pancreáticas, del 85% al 90% de estos individuos presenta uno o más tipos de autoanticuerpos que dañan el páncreas, además, esta enfermedad tiene una fuerte asociación con el sistema de histocompatibilidad HLA. ⁴

La velocidad de destrucción de las células beta pancreáticas es variable, en algunos sujetos es rápida (bebés y niños) y algo más lenta en otros (adultos). La primera manifestación de la enfermedad, especialmente en el primer grupo, puede ser la cetoacidosis. Otros pueden presentar hiperglucemia moderada en ayunas, capaz de cambiar rápidamente a hiperglucemia grave o a cetoacidosis, en presencia de causas desencadenantes. La destrucción autoinmune de las células beta tiene múltiples factores de predisposición y también se relaciona con factores ambientales. Algunos pacientes presentan DM1 idiopática y cursan su enfermedad con insulinopenia y propensión a la cetoacidosis, sin evidencias de daño autoinmune. ⁵

La diabetes mellitus tipo 2 (desde resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa, hasta un defecto secretor de la insulina con resistencia).

La diabetes tipo 2 es la forma más común de diabetes, el cuerpo no produce suficiente insulina o las células no hacen uso de la insulina; esto se conoce como resistencia a la insulina, al principio, el páncreas produce más insulina de lo debido para cubrir la falta de insulina, pero con el tiempo, el páncreas no puede mantener ese ritmo y no puede producir suficiente insulina para mantener sus niveles de glucosa normales.

Cuando la glucosa se acumula en la sangre en vez de ingresar a las células, puede producir dos problemas: primeramente, las células pueden quedarse sin

energía y con el tiempo, los altos niveles de glucosa pueden causarle daño en los ojos, riñones, sistema nervioso y corazón.⁶

La diabetes tipo 2 representa el 90% al 95% de la población diabética y abarca a los sujetos que presentan resistencia a la insulina acompañada por deficiencia relativa. Los pacientes no requieren de insulina en las primeras etapas de la enfermedad y no se observan lesiones autoinmunes en el páncreas.

En la mayoría de los casos presentan obesidad, y esta provoca cierto grado de resistencia a la insulina, la cetoacidosis raramente aparece de forma espontánea; su presencia se asocia con el estrés o con otra enfermedad. Dado que la DM2 cursa sin diagnóstico por varios años, existe el riesgo de problemas tanto macrovasculares como microvasculares, la secreción de insulina es deficiente y no alcanza a compensar la resistencia a la insulina. El envejecimiento, la obesidad y el sedentarismo aumentan el riesgo de padecer la enfermedad.⁷

2.3 Complicaciones microvasculares y macrovasculares.

Las complicaciones microvasculares son causadas por el daño a los vasos sanguíneos pequeños, las lesiones que se generan en vasos sanguíneos que tienen un mayor calibre se definen como daños macrovasculares. Entre los daños microvasculares se encuentran la retinopatía (daños oculares), las afecciones renales (nefropatía) que causan insuficiencia renal y lesiones de nervios que generan el pie diabético, lo cual contribuye a infecciones muy graves.

Las complicaciones macrovasculares generan enfermedades como la cardiovasculares, generando ataques cardiacos, afecciones cerebrovasculares e

insuficiencia circulatoria de miembros inferiores; un tratamiento adecuado puede retrasar la evolución de ambas complicaciones.

2.3.1 Retinopatía

El daño de los vasos sanguíneos de la capa posterior del ojo, capilares de la retina y de la membrana basal capilar ocasiona una pérdida progresiva de la visión y esta afección es de carácter irreversible; a este daño se le conoce como retinopatía y es una causa fuerte de discapacidad visual y de la ceguera.

La detección temprana y el tratamiento integral con un buen control metabólico pueden llegar a prevenir la retinopatía o incluso su prevención, para esto se debe de realizar exámenes oculares e intervenciones en el tiempo preciso.

2.3.2 Nefropatía.

Las lesiones que causa la hiperglucemia en el glomérulo renal, el daño a la célula mesangial y las afecciones a vasos sanguíneos de calibre pequeño, son los causantes de la nefropatía diabética. Esto origina la insuficiencia renal, siendo esta una de las principales causas de diálisis, necesidad de trasplante y conlleva a la muerte.⁸

2.3.3 Neuropatía.

En pacientes con diabetes mellitus es la complicación más frecuente siendo causante de amputaciones y lesiones; dicha patología afecta fibras motoras, sensitivas y autónomas del sistema nervioso periférico en extremidades inferiores. El daño a los pequeños vasos sanguíneos genera una afección a los nervios y por

lo tanto la enfermedad se puede manifestar por pérdida sensorial, impotencia sexual y lesiones en miembros inferiores.⁹

2.3.4 Enfermedades cardiovasculares.

El daño que se genera debido a la hiperglucemia en los vasos sanguíneos es la aterosclerosis, obstruyendo y endureciendo las arterias, si se reduce el flujo de sangre al musculo cardiaco se genera el riesgo de infarto al miocardio, cuando se obstaculiza el flujo hacia el encéfalo se puede generar un accidente cerebrovascular.¹⁰

2.3.5 Enfermedad cerebral vascular.

Es la afección de tipo vascular generada por la hiperplasia en la capa muscular de las arterias, este daño es generado cuando hay una disminución en la cantidad de sangre que debe llegar al cerebro, cuando hay una ruptura o desgarre de las arterias cerebrales debido al aumento de la presión arterial que puede llevar a una hemorragia cerebral.¹¹

2.4 Insulina y su alteración en la Diabetes.

La insulina ejerce su actividad sobre el funcionamiento del endotelio vascular, fisiológicamente tiene efecto vasodilatador y antiinflamatorio y dicha actividad esta mediada por la liberación de óxido nítrico así como con la inhibición del factor de transcripción nuclear.

La distribución de la insulina es regulada por mecanismos coordinados: la secreción de la insulina, la estimulación de captación de glucosa en músculo e

hígado y la cancelación de producción de glucosa hepática; cuando uno de estos factores tiene alteraciones pueden ser causantes de la resistencia a la insulina.

Cuando el organismo responde de manera subnormal a una determinada concentración de insulina debido a un estado patológico se genera una condición patológica conocida como resistencia insulínica; dicha resistencia genera primeramente hiperinsulinemia con euglucemia, después hiperinsulinemia con hiperglucemia.¹²

2.5 Tratamiento de la diabetes.

Actualmente existen diversos tratamientos para la DM2 que incluyen medicamentos (hipoglucemiantes orales), uso de insulina con metformina en pacientes con DM2 avanzada, sin embargo, todo tratamiento con medicamentos debe ser utilizado con una dieta adecuada, hábitos de ejercicio y apego total al tratamiento farmacéutico.^{13, 14}

2.5.1 Modificación de dieta y ejercicio.

Una correcta intervención en el estilo de vida de las personas hace que la incidencia de personas con riesgo de DM2 disminuya de manera considerable; en tanto que en el tratamiento de personas con DM2 hace que los medicamentos hipoglucemiantes alcancen una buena eficiencia y reduce las complicaciones que pueden desarrollarse con la enfermedad.

Dentro de la actividad física para el control de la glucemia se encuentran ejercicio de carácter aeróbico con la finalidad de que la vía metabólica oxidativa sea activada y así se favorezca el uso de glucosa por el organismo; en tanto que el ejercicio de fuerza (para incrementar la potencia, resistencia y fuerza muscular) se

utiliza como entrenamiento anaeróbico; la combinación de ambos tipos de ejercicio con sesiones alternas; muestran eficacia en la glucemia de pacientes diabéticos a largo plazo y en 24-48 horas después del entrenamiento.

De manera general, un entrenamiento por semana de al menos 150 minutos, en intensidad moderada, en intervalos no mayores a 48 horas entre un tratamiento y otro ayuda a obtener un control glucémico adecuado. ¹⁵

2.5.2 Tratamiento con plantas medicinales.

Los tratamientos con medicamentos se encuentran con la problemática creciente de los efectos adversos, es por esa razón que la creciente búsqueda de solución a la enfermedad en la herbolaria, permite que las plantas sean una alternativa a la cual se le debe prestar atención e investigar de manera exhaustiva para encontrar los posibles beneficios. Dado que los tratamientos herbolarios en su mayoría no están estandarizados y regularizados presentan un riesgo de salud si se consumen en exceso; o en el peor de los casos pueden causar diversos efectos adversos lo que aumenta la necesidad de su investigación.

2.5.3 Componentes activos de plantas en el tratamiento de DM2

Actualmente se sabe que algunos compuestos extraídos de plantas presentan actividad para tratar la diabetes; entre las moléculas activas se encuentran saponinas, flavonoides, derivados de inositol, cumarinas, alcaloides, entre otros.

Existen otros compuestos diversos, sobre los cuales hay información valiosa, por ejemplo, la molécula D-chiro-inositol junto a sus dos galactoderivados extraídos de *Mucuna pruriens* (*Fabaceae*) posee actividad hipoglucemiante en animales de

experimentación; otro ejemplo es el ácido clorogénico, un compuesto aislado de *Cichorium intybus* que manifiesta un efecto sobre la insulina estimulando la captación de glucosa a través de la sensibilización de la insulina en los adipocitos en un modelo in vitro.^{16, 17}

A continuación se aborda el uso de hipoglucemiantes orales (HO) en el tratamiento de DM2.

2.5.4 Uso de hipoglucemiantes orales en el tratamiento de DM2.

La Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) en su Norma Oficial Mexicana (NOM-015-SSA2-2010) para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus especifica las recomendaciones para la prescripción de las sulfonilureas (SU) y las biguanidas. La NOM-015-SSA2-2010 menciona que las SU, como la glibenclamida y la glimepirida, son los fármacos de primera línea para el tratamiento del paciente no obeso con DM2, en tanto que las biguanidas, como la metformina, son los fármacos de elección para el tratamiento del paciente obeso y con diagnóstico de DM2, así como los que presentan fallos primarios y secundarios en el tratamiento con SU.¹⁸ En la tabla 1 se presentan algunos de los HO más comunes, así como los efectos adversos que causan:

Tabla 1 Hipoglucemiantes orales y efectos adversos

Fármaco hipoglucemiante	Mecanismo de acción	Efectividad	Efectos adversos
Sulfonilureas primera generación (tolbutamida) y segunda generación (glibenclamida)	Estimulan la liberación de insulina de las células β del páncreas, al unirse al receptor para sulfonilurea se cierra el canal de K^+ sensible al ATP, disminuye la salida de K^+ . Se despolariza la membrana abriendo los canales de Ca^{2+} , con posterior translocación de los gránulos secretores de insulina a la superficie de la célula.	Más del 60% de personas con DM2 responden a las sulfonilureas. Del 5 al 20% de los pacientes sufren falla secundaria debido a la exposición prolongada que inhibe la síntesis de proinsulina.	Puede causar insuficiencia renal, generar una hipoglucemia intensa, alteraciones dermatológicas, reacciones de hipersensibilidad, molestias gastrointestinales y trastornos hematológicos.
Meglitinidas (rapaglinida y nateglinida)	Se unen a un lugar adyacente en el receptor de sulfonilurea de los canales de potasio sensibles al ATP e inician las reacciones que provocan la liberación de insulina de las células β del páncreas.	Se usan como tratamiento único o en combinación. Estos fármacos pueden usarse en personas que no se alimentan con una dieta regular.	Pueden causar hipoglucemia excesiva, cefaleas y aumento de infecciones en vías respiratorias superiores. También pueden presentar aumento de peso. ¹⁹
Biguanidinas (Metformina) Es un fármaco antihiper glucémico que requiere de insulina pero no promueve la liberación de está en las células pancreáticas.	Reduce la gluconeogénesis, incrementa la captación y utilización de la glucosa al mejorar el transporte a través de la membrana celular e incrementar el número de transportadores del musculo esquelético y disminuye la absorción de los azúcares en el intestino.	Reduce las concentraciones de glucosa en ayuno en 60 a 80 mg/dL Hace decrecer la concentración de lipoproteínas de baja densidad, triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad y colesterol.	Se presenta malestar digestivo: náusea y vómito, malestar estomacal, flatulencia, y diarrea. Los efectos adversos se atenúan al ajustar la dosis y administrar el fármaco con alimentos. ²⁰

Los efectos adversos de los medicamentos y desapego al tratamiento, en ocasiones agravan el problema de salud, también existe una disposición en la población a buscar alternativas en la herbolaria tradicional, lo que hace necesaria la investigación de los extractos naturales para comprobar su actividad terapéutica. Existen plantas con diversas actividades farmacológicas, algunas plantas poseen propiedades antibacterianas, este es el caso de *A. petiolaris* que es usada como agente hipoglucemiante y probablemente posee actividad antibacteriana dado que algunas especies de su Orden presentan dichas características; es por lo que en el siguiente tema se abordará la temática de los antibióticos y la importancia de la búsqueda de compuestos naturales con actividad terapéutica.

2.6 Agentes antibacterianos.

Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica.

2.6.1 Quinolonas, ciprofloxacino.

Son antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos, el genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos.

Cuando la bacteria se divide, la información del ADN debe duplicarse con el fin de transmitir esta información a la descendencia; la replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos.

A continuación, se presenta un resumen de las características de las quinolonas; dentro de este grupo se encuentra el ciprofloxacino que será utilizado como testigo positivo frente al cual se evaluará si el extracto acuoso de *A. petiolaris* posee efecto antibacteriano.

Tabla 2. Quinolonas, ventajas y desventajas.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Clasificación de quinolonas	Usos, ventajas y desventajas
Quinolonas y rifamicinas (ambos presentan el mismo mecanismo de acción). ²¹	Actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, su interferencia detiene el proceso infeccioso. ²²	Primera generación (ácido nalidíxico)	Tienen un espectro limitado a bacilos gramnegativos y sólo se utilizan para infecciones de tracto urinario
		Segunda generación (norfloxacino)	Aumentan su actividad frente a gramnegativos, presentan alguna actividad frente a Gram positivos, pero no frente a anaerobios.
		Tercera generación (ciprofloxacino,	Tienen mejor actividad frente a Gram positivos y organismos fastidiosos y por sus

		levofloxacino)	propiedades farmacocinéticas permiten su empleo sistémico.
		Cuarta generación (moxifloxacino, gemifloxacino)	Son muy activas frente a Gram positivos. ²³

Actualmente los agentes antibióticos se enfrentan a la resistencia generada por un mal uso y a la resistencia intrínseca de los microorganismos, generando una creciente búsqueda de tratamientos alternativos en compuestos antimicrobianos provenientes de plantas. Es por esto que la investigación de compuestos en las especies vegetales es una fuente importante para nuevos fármacos.

Las plantas medicinales han sido usadas de manera tradicional para el cuidado de la salud y actualmente lo hace más del 80% de la población mundial, con una tendencia creciente en los países industrializados. Este significativo aumento en la utilización de las plantas medicinales constituye una importante alternativa terapéutica y también se ve influenciado por el elevado costo de los fármacos.²⁴

El creciente grado de afección por enfermedades bacterianas y la resistencia que acompaña a los antibióticos, ha conducido a la búsqueda de compuestos bioactivos. Las plantas constituyen una importante fuente para nuevas alternativas.

Los estudios que demuestran las características terapéuticas en plantas con actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral; promueven la ampliación del área de investigación en las plantas medicinales.^{25, 26}

2.7 Modelo para determinar actividad antibacteriana.

En el área de investigación, el desarrollo de fármacos comienza con la identificación de los principios activos, para después, utilizando diversos ensayos

biológicos obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, obteniendo la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima bactericida. Para determinar su correcta evaluación existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad (en especial la antimicrobiana) a través de diferentes métodos in vitro principalmente desarrollados en el laboratorio y así establecer frente a qué microorganismos son activos ya sea a bacterias, hongos y protozoos.²⁷

Para la evaluación de la actividad antibacteriana en extractos crudos se realiza un ensayo de difusión en agar, el cual consiste en hacer estría uniforme en un medio estéril, se realizan pozos equidistantes con un perforador de corcho esterilizado con un diámetro conocido (6 mm) y se vierte el extracto a concentraciones graduales en el ensayo se utiliza un control positivo y un control negativo.²⁵

Además se deben considerar diversos ensayos de toxicidad para asegurar su consumo. Es así como el uso de plantas medicinales además de ser un hecho evidente, también puede aportar información valiosa para el tratamiento de infecciones bacterianas y DM2.²⁸

2.8 Uso de plantas medicinales con actividad hipoglucemiante

Existen varias revisiones valiosas sobre el uso etnobotánico de las plantas en México. (Martínez, 1954; Diaz, 1976; Aguilar y otros, 1994; Argueta, 1994; Aguilar y Xolalapa, 2002). Se encuentran datos de plantas con actividad farmacológica en tesis o artículos sobre regiones específicas, en México se han documentado al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias usadas como agentes hipoglucemiantes. De acuerdo al estudio de Andrade-Cetto, se estima que al menos se encuentran en México 500 especies utilizadas para tratar DM tipo 2. Las

especies más mencionadas pertenecen a: Asteraceae (47 especies), Fabaceae, (27 especies), Cactaceae (16 especies), Solanaceae y Euphor-Biaceae (10 especies) y Laminaceae (9 especies).²⁹ El género *Ageratina* presenta diversos compuestos entre ellos sesquiterpenos, dipertenos, cromenos, flavonoides y derivados del timol, algunos de estos compuestos pueden presentar actividad terapéutica.

El 50% de los fármacos que se prescriben hoy en día se ha desarrollado a partir de productos naturales y sus derivados; las plantas han desempeñado una labor importante en el tratamiento de la diabetes y es por ello que la planta “hierba del burro” que se analiza en este estudio presenta características importantes dentro del área de investigación.

En la planta *A. petiolaris* se han encontrado compuestos que posiblemente podrían estar asociados con el efecto hipoglucemiante, entre dichos componentes se encuentran el ácido colorogénico, ácido 2 α -iso-valeroiloxieperúico y un isómero del inositol; *A. petiolaris* es usada tradicionalmente en extracto acuoso por lo que en esta investigación se evaluará el extracto crudo de la planta.³⁰

El estudio químico de este género tiene importancia taxonómica y de carácter biológico por la posible actividad que pueden tener en contra de agentes infecciosos tales como bacterias y hongos. Por ejemplo, la planta *Ageratina arbutifolia* (relacionándola con *A. petiolaris* por su similitud biológica) presenta un ácido Kaurénico que tiene actividad contra *S. aureus* y *Candida albicans*. Es importante que la evaluación del extracto frente a microorganismos para determinar si posee la actividad antibacteriana encontrada en plantas similares al Orden taxonómico.^{31, 32}

A continuación se presentan las características generales de la planta en estudio.

2.8.1 Características botánicas de la planta *Ageratina petiolaris*.

Es una planta endémica de México, ampliamente distribuida en la parte central y sur del país, arbusto de hasta 2 m de altura, cilíndrico, con tallos leñosos blanco-amarillentos, hojas opuestas con forma ovalada dispuestas en corimbos, y flores blancas.³³

Reino: Plantae

Phylum o división: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: *Asteraceae*

Familia: *Compositae*

Género: *Ageratina*

Especie: *Ageratina petiolaris*



Imagen 1 *A. petiolaris*, Departamento de Botánica, Instituto de Biología

Nombre científico: *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M.King & H.Rob.

Para poder llevar a cabo la evaluación del efecto hipoglucemiante es necesario un modelo experimental adecuado, por lo que se utilizará un modelo animal.

2.9 Modelo hipoglucemiante en ratones.

La mayoría de la investigación desarrollada en diabetes ha sido realizada mediante el uso de modelos animales. Los abordajes in vitro y modelos animales son probablemente la mejor estrategia para mejorar el entendimiento de los mecanismos de la enfermedad aún subyacentes y, en este sentido, la elección del modelo que más se ajuste a dichos objetivos es determinante. Clasificados tradicionalmente en función de su patogénesis, en espontáneos o inducidos, cada modelo ofrece sus propias ventajas y desventajas.³⁴

Los ratones CD₁ son ampliamente utilizados en el estudio de la actividad hipoglucemiante de extractos de plantas, esto se debe a la respuesta metabólica de la glucosa en sangre y a su adecuada medición con una pequeña muestra de



Imagen 2. Ratón macho CD 1

sangre que se obtiene por un pequeño corte en la cola del ratón.^{35, 36} El estudio en ratones sanos CD₁ a los cuales se les induce una hiperglucemia temporal con la inmediata administración de la sustancia a estudiar; corresponde a un modelo de diabetes mellitus tipo 2.³⁷

Considerando el uso de *A. petiolaris* de manera empírica en el tratamiento de DM2 y la probabilidad de que sus componentes sean activos, es importante que se compruebe la actividad hipoglucemiante mediante un modelo experimental. De la misma forma, dado la relación existente con el orden *Asteraceae* (en el cual existe la actividad antibacteriana en algunas especies similares) se debe evaluar el extracto acuoso para probar su posible efecto antibacteriano.

2.9.1 Manejo adecuado del material biológico de acuerdo a la NOM 062ZOO.

En la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; se encuentran las disposiciones para el manejo adecuado del modelo experimental.

Tras la evaluación en el modelo animal, se debe buscar la inducción de la muerte de los animales de manera humanitaria con la finalidad de eliminar o disminuir al mínimo dolor, estrés previo y durante el procedimiento, la técnica utilizada debe lograr: rápida inconsciencia, paro cardiaco, paro respiratorio y pérdida de la función cerebral; también debe reducir al mínimo la perturbación emocional, la incomodidad y el sufrimiento experimentado por la persona que lleve a cabo el procedimiento.

El método que se debe llevar a cabo para la eutanasia depende de la especie utilizada, dentro de los criterios de selección se debe considerar: compatibilidad con el protocolo experimental, la capacidad de producir inconsciencia y muerte rápida, confiabilidad y seguridad para el personal. A su vez se debe cumplir con la inducción de la muerte sin producir pánico y ansiedad en los animales, que sea un método confiable y reproducible, tener un impacto ambiental mínimo, a prueba de fallas y localizado en un sitio apartado de los cuartos de animales.

En caso de que el proceso necesite inducir una inmovilización del animal (debido a que por la naturaleza del sujeto se puedan generar lesiones o ansiedad en el animal o poner en peligro al operario) se debe considerar el uso de tranquilizantes, analgésicos o fármacos inmovilizantes. Después de aplicar la eutanasia se debe

verificar la muerte del animal confirmando la cesación de los signos vitales de acuerdo a la especie y al método de eutanasia empleado.

Cuando el método de eutanasia causa una interrupción física de la actividad cerebral por conmoción, destrucción directa del cerebro o despolarización eléctrica de las neuronas se induce inconsciencia, pero se debe causar la muerte del animal por destrucción del tallo cerebral donde se localizan los centros de control de la actividad respiratoria y cardiaca. El personal debe estar entrenado para realizar la eutanasia conociendo la conducta de la especie utilizada, el manejo, la inmovilización y comprensión de la técnica de inconsciencia y la muerte.³⁸

La utilización del bióxido de carbono es el método más recomendable para la eutanasia de varias especies de mamíferos tales como: ratas, ratones, cobayos, perros, hámsteres, conejos y gatos debido a su rápido efecto depresivo y anestésico que conduce a la muerte por hipoxia en pocos minutos, a que está fácilmente disponible en cilindros de gas comprimido, a que es barato, no inflamable, no explosivo, seguro de operación para el personal, no se acumula en los tejidos y no deforma la arquitectura celular.

Los métodos físicos de eutanasia que se incluyen son: dislocación cervical, decapitación, perno cautivo penetrante y se pueden aplicar en las siguientes circunstancias: en animales pequeños de fácil manejo y con características anatómicas compatibles con el método seleccionado, en animales grandes de granja, zoológico o silvestres y cuando otros métodos puedan invalidar los

resultados experimentales o interferir con el uso posterior de tejidos o fluidos corporales.

La dislocación cervical manual ejecutada apropiadamente induce inconsciencia rápidamente, se aplica porque no contamina los tejidos con sustancias químicas, se acepta su aplicación en: ratones, ratas que pesen menos de 200 g; en la rata y ratón, se toma al animal por la base de la cola con una mano para su acomodo y se coloca sobre una superficie donde el animal se sostenga, con los dedos índice y pulgar de la otra mano o bien en su defecto un instrumento delgado pero rígido, se colocan sobre la base del cráneo y se ejerce tracción hacia atrás del animal a través de la base de la cola, para ocasionar la dislocación cervical.

3 Planteamiento del problema.

En México la incidencia de personas con Diabetes mellitus tipo 2 se encuentra en crecimiento y se estima su triplicación para el año 2025. El costo del tratamiento aumenta ocasionando graves complicaciones en el sistema de salud por lo que las personas están en búsqueda de tratamientos alternos en la herbolaria tradicional, utilizando remedios que en bajo costo proporcionen bienestar.³

Los hipoglucemiantes orales de uso común como glibenclamida, la combinación de glibenclamida y/o metformina con acarbosa o insulina, muestran su eficiencia con altos costos y tienen la dificultad que en pacientes que no hacen ejercicio y cuidan su dieta no alcanzan a presentar efectos favorables.¹⁸

La búsqueda de tratamientos alternos en la comunidad Mexicana lleva al uso de plantas medicinales. En México existen más de 500 plantas medicinales que se han caracterizado y de manera empírica o con una aprobación experimental se utilizan en el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2. El extracto acuoso de la planta *Ageratina Petiolaris* es utilizada empíricamente por pacientes diabéticos debido a su supuesta actividad hipoglucemiante en los estados de Puebla, Oaxaca, Estado de México.²⁹

La actividad hipoglucemiante de *Ageratina petiolaris* no se ha comprobado experimentalmente mediante un modelo de Diabetes Mellitus tipo 2, por lo que el uso de la planta es solo de carácter empírico, esto expone a los pacientes a un uso excesivo y no se conocen los efectos adversos que podría causar en dosis elevadas.

Ageratina petiolaris pertenece al orden *Asteraceae*, algunas especies de este orden son utilizadas empíricamente en el tratamiento de infecciones

antibacterianas, sin embargo, en la especie *A. petiolaris* aún no se ha comprobado la actividad antibacteriana. Es importante que esta posible propiedad en el uso de la planta se investigue completando así, el análisis experimental de las características terapéuticas de *A. petiolaris*.³¹

En el caso del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* la posología es incierta y su uso se debe regular mediante la evaluación experimental de los efectos hipoglucemiantes y antibacterianos que actualmente se aplican de manera empírica, cuya única comprobación es la de los testimonios que expresan personas que han buscado alternativas para sus tratamientos.

Debido a esto, en caso de que se demuestre la actividad hipoglucemiante y antibacteriana serían una buena alternativa en el control de la diabetes mellitus tipo 2 y en el padecimiento de infecciones bacterianas. En caso de que presente actividad farmacológica, su estudio deberá llevar a comprobar si presenta efectos adversos, si la actividad no se encuentra se recomendará la cancelación del uso de *Ageratina petiolaris* con fines terapéuticos hipoglucemiantes y antibacterianos.

Por lo que la pregunta a resolver con esta investigación es:

¿El extracto acuoso de *A. petiolaris* presenta actividad hipoglucemiante y antibacteriana?

4 Hipótesis:

De acuerdo a las evidencias teóricas, se ha señalado que en el Orden *Ageratina* se encuentran compuestos como el ácido clorogénico y un isómero del inositol a los cuales se les ha atribuido una actividad hipoglucemiante, por lo que suponemos que el extracto acuoso de *A. petiolaris* podría presentar una actividad hipoglucemiante en un modelo de ratones CD1 a los que se les inducirá hiperglucemia temporal.

Algunos estudios del orden *Ageratina* muestran que tiene actividad antibacteriana; al ser parte de dicho orden, el extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* puede llegar a presentar actividad antibacteriana al probarlo frente a bacterias Gram positivo o Gram negativo en condiciones in vitro.

5 Objetivo:

Evaluar la actividad hipoglucemiante del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* utilizando un modelo en ratones CD1, además de evaluar la actividad antimicrobiana frente a las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

6 Diseño experimental:

6.1 Tipo de estudio: experimental.

6.2 Población de estudio:

6.2.1; 30 Ratones CD₁

6.2.2 Bacterias *E. coli* y *S. aureus*

6.3 A Criterios de Inclusión y eliminación (modelo hipoglucemiante, ratones):

6.3.1 A Criterios de Inclusión:

Ratones CD₁ machos, sanos, 3 a 4 meses de edad, que desarrollen la hiperglucemia temporal Glucosa >140 mg/dL.

6.3.3 A Eliminación

Ratones lesionados.

6.3.1 B Criterios de Inclusión y eliminación, bacterias (efecto antibacteriano):

6.3.2 B Criterios de Inclusión:

Bacterias en cepas puras con 24 horas de incubación.

6.3.3 B Eliminación

Cepas resistentes a ciprofloxacino.

6.4 Variables

6.4.1 Variable independiente:

Ensayo hipoglucemiante: Tratamiento del extracto de *Ageratina petiolaris* en dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg, control positivo: glibenclamida 0.8 mg/kg y control negativo: solución salina.

Para el ensayo antibacteriano: Dosis del extracto a 125, 250 y 500 µg/mL, control positivo: ciprofloxacino 100 µg / 50 µL y control negativo: solución salina.

6.4.2 Variable dependiente:

Concentración de glucosa en la sangre del ratón

Inhibición bacteriana (medida a través del diámetro del halo de inhibición)

7 Material y métodos:

7.1 Material biológico:

30 ratones CD 1 machos.

Cepas puras de *S. aureus* y *E. coli*.

7.2 Material:

Cajas Petri.

Asa bacteriológica.

Tubos estériles Falcon 5 mL.

Filtro millipore.

Vasos de precipitados 10, 50 y 100 mL PYREX

Tubos de ensayo 13X180.

Tubos de ensayo 13X100.

Pipetas automáticas, 50, 200 y 100 μ L

Sacabocados (6 mm)

Pinzas de disección.

Plumones indelebles.

Tijeras de disección.

Sujetador de ratones.

Jeringas de insulina.

Jeringas de 3mL.

Sonda gástrica.

Celdas de espectrofotómetro

Bisturí.

7.3 Equipos:

Rotary Evaporator RE 300 Yamahto.

Equipo para lecturas: Glucómetro Accu Check Performa.

Báscula mecánica automática S-100.

Espectrofotómetro Spectronic 20+ Thermo Scientific.

Sonicador S&M 0603 Ultrasonic Processor, SONICS Vibra-Cell

Balanza analítica ADAM.

Autoclave a vapor.

7.4 Reactivos:

Extracto acuoso de *Ageratina petiolaris*.

Glibenclamida.

Goma Ghatti.

Agua destilada.

Solución salina isotónica estéril PISA.

Glucosa solución inyectable 50% PISA.

7.5 Técnicas:

7.5.1 Recolección de la planta.

La planta *Ageratina petiolaris* fue recolectada el 19 de noviembre de 2017 y se mantuvo a temperatura ambiente para su secado por dos semanas. La extracción se realizó utilizando solamente las hojas de la planta. Para la autenticación de la planta se recolectó un espécimen (proveniente de la misma planta que se utilizó en la prueba) el 30 de marzo del 2018, dicho espécimen se recolectó en prensa botánica y se mantuvo en secado por 15 días. Se esperó a esa fecha ya que en ese mes del año *Ageratina petiolaris* se mantuvo en periodo de floración lo cual fue necesario para su autenticación; la cual se llevó a cabo en el herbario de la FES Zaragoza por la Mtra. Magdalena Ayala Hernández.

7.5.1 Extracción de la Planta.

Para evaluar la actividad hipoglucemiante y antimicrobiana se realizó la extracción usando 42 gramos de hojas de la planta *Ageratina Petiolaris* y agua destilada como disolvente. Se trituraron las hojas de la planta y se agregaron 880 mL de

agua. La planta triturada y mezclada con agua se ingresó en la cámara fría por 72 horas; posteriormente se filtró con vacío obteniendo 600 mL de filtrado el cual se mantuvo en cámara fría por 48 horas.

La extracción se realizó en rotavapor con destilación a presión reducida 70 °C a 70 rpm por 3:30 horas obteniendo como concentrado una pasta color café que se introdujo a secado a una temperatura de 37 °C (atmósfera normal) por 7 días hasta obtener un compuesto sólido.

7.5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante

Se realizó el tratamiento a cinco grupos de ratones, cada grupo de 6 ratones.

Los grupos se conformaron de la siguiente manera: un control negativo (0.2 mL solución salina), un grupo control positivo (glibenclamida) 0.8 mg/kg de peso y 3 grupos experimentales con dosis del extracto a 25, 50 y 100 mg/Kg.³⁹

Se separaron los grupos y se mantuvieron en ayuno de 18 horas.

Se tomó y registró la lectura de glucosa basal al tiempo 0

Se indujo la hiperglucemia a todos los grupos vía subcutánea a partir de una solución de glucosa al 50% diluida 1:10 con una dosis de 2 g/kg Tiempo =0

Los tratamientos se administraron por sonda gástrica de la siguiente manera:⁴⁰

1, Control negativo 0.2 mL SS

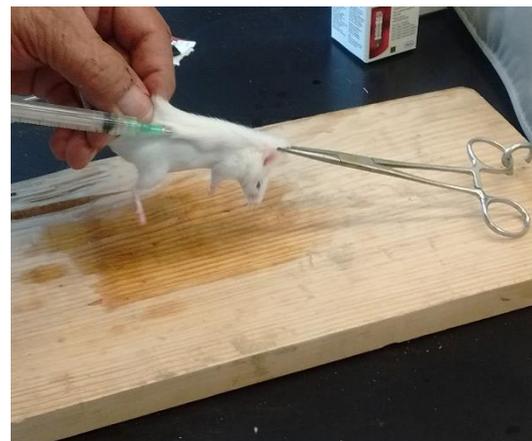


Imagen 3. Administración de glucosa vía subcutánea 1

2, Grupo control positivo Glibenclamida.

3, Dosis 25 mg/kg

4, Dosis 50 mg/Kg

5, Dosis 100 mg/kg

Se administraron los volúmenes calculados de los tratamientos del extracto en dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg.

Se administraron los volúmenes calculados del grupo control positivo glibenclamida con dosis de 0.8 mg/kg de peso.

Se realizaron las lecturas de glucosa en los siguientes tiempos:

Se hizo la lectura a los 60 minutos después de la primera carga de glucosa.

Se administró una segunda carga de glucosa con una dosis de 2 g/kg.

Se midió la glucosa a todos los grupos a los 120 y 180 minutos posteriores a la segunda carga.



Imagen 4. Administración de tratamientos con sonda gástrica.



Imagen 5. Lectura de glucosa en sangre.

7.5.3 Evaluación del efecto antibacteriano:

Para realizar la evaluación del efecto antimicrobiano se comenzó por la preparación de una curva estándar de la escala de McFarland utilizando la capacidad de precipitación del cloruro de bario con el ácido sulfúrico. La curva se realizó utilizando las siguientes proporciones:

Tubo		BaCl ₂ 1%	H ₂ SO ₄ 1%
1	3.0X10 ⁸ UFC	0.1	9.9
2	6.0X10 ⁸ UFC	0.2	9.8
3	9.0X10 ⁸ UFC	0.3	9.7
4	1.2X10 ⁹ UFC	0.4	9.6
5	1.3X10 ⁹ UFC	0.5	9.5
6	1.8X10 ⁹ UFC	0.6	9.4
7	2.1X10 ⁹ UFC	0.7	9.3
8	2.4X10 ⁹ UFC	0.8	9.2
9	2.7X10 ⁹ UFC	0.9	9.1
10	3.0X10 ⁹ UFC	1	9.0

La evaluación del efecto antimicrobiano consistió en probar la actividad del extracto ante los microorganismos: *S. aureus* (Gram positivo) y *E. coli* (Gram negativo) utilizando un testigo positivo (ciprofloxacino 100 µg/µL) y un testigo negativo de solución salina. El extracto se preparó en concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL.

Para probar la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* se realizó un cultivo de la cepa pura en agar soya tripticaseina, incubando durante 24 horas realizando todo el proceso en condiciones de esterilidad. Se utilizó el tubo 1 de la escala de

McFarland 3X10⁸ UFC realizando una lectura mediante el espectrofotómetro y así poder hacer una comparación preparando una suspensión de bacterias igualando a la transmitancia del tubo 1. Se registró una lectura de 59% de transmitancia en el tubo 1 de Mc Farland y la suspensión de bacterias se igualó a 56% de transmitancia. Para alcanzar la concentración de bacterias adecuada se utilizaron las siguientes diluciones:

Concentración final de la suspensión	Suspensión en mL	Solución salina
3X10 ⁶ (suspensión B)	0.1 mL de la suspensión 3X10 ⁸ (A)	9.9 mL solución salina
3X10 ⁵ (suspensión C)	0.1 mL de la suspensión 3X10 ⁶ (B)	0.9 mL de solución salina
1X10 ⁵ (suspensión D)	1 mL de la suspensión 3X10 ⁵ (C)	2 mL de solución salina

Se realizó la suspensión A) con una suspensión de bacterias *S. aureus* y otra de *E.coli*. Se utilizó el tubo 1 de la escala de McFarland 3X10⁸ UFC/mL para comparar mediante la medición espectrofotométrica de modo que la suspensión de bacterias se igualó a la transmitancia del tubo 1 McFarland.

Para la suspensión B; se tomó de A 0.1 mL y se agregan 9.9 mL de solución salina estéril (SS) obteniendo una concentración de 3X10⁶ UFC/mL.

Para la suspensión C: de B, se tomó 0.1 mL, se agregan 0.9 mL de SS estéril para obtener 3X10⁵ UFC/mL

Para la suspensión D; de la suspensión C se utilizó 1 mL y se agregaron 2 mL de SS estéril para obtener 1X10⁵ UFC/mL.

La disolución de ciprofloxacino se preparó a una concentración de 200 µg/100 µL. Para lo cual se pesó 20 mg del principio activo en 10 mL de H₂O, dado que la forma farmacéutica contenía 500 mg de ciprofloxacino en 880 mg de la capsula, se utilizó el siguiente factor de conversión:

$$(20 \text{ mg de ciprofloxacino}) \frac{880 \text{ mg de preparado farmacéutico}}{500 \text{ mg de ciprofloxacino}} \\ = 35.2 \text{ mg de preparado farmacéutico}$$

La cantidad pesada (35.2 mg) de ciprofloxacino se disolvió en matraz aforado a 10 mL con agua destilada. Esta disolución fue filtrada con la finalidad de alcanzar la esterilidad utilizando filtro milipore (0.45 µm) en condiciones de esterilidad y se conservó en tubos Falcon estériles a 4 °C.

La preparación del extracto se realizó pesando 50 mg del polvo y se disolvió llevando al aforo a 10 mL de agua destilada, se utilizó un sonicador para realizar la disolución. Esta disolución fue filtrada con la finalidad de alcanzar la esterilidad utilizando filtro milipore (0.45 µm) y se conservó en tubos Falcon estériles a 4 °C. De esta solución se obtuvieron 3 diluciones a concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL que se realizaron de la siguiente forma:

Solución	Extracto	Agua destilada	[concentración del extracto]
Solución madre	50 mg de extracto	10 mL	5000 µg/mL
Dilución 1	0.5 mL de Disolución	4.5 mL	500 µg/mL

	1		
Dilución 2	2.5mL de Dilución 2	2.5mL	250 µg/mL
Dilución 3	2 mL de la Dilución 2	2 mL	125 µg/mL

Se prepararon seis cajas Petri con 25 mL de agar soya tripticaseina.

Para la determinación de susceptibilidad se inoculó masivamente por triplicado la suspensión D con bacterias *S.aureus* y las bacterias *E. coli* en agar soya tripticaseina.

Utilizando un sacabocados se realizaron cinco pozos de 5 mm en la caja con agar inoculado con las bacterias. En cada pozo se adicionaron 50 µL de la disolución del extracto problema, solución salina estéril y el ciprofloxacino.

Las cajas se incubaron a 37 °C, midiendo el tamaño de la inhibición de crecimiento a las 24 y 48 horas y se registraron los resultados. ⁴¹

7.5.4 Análisis estadístico.

El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS por medio de un análisis de comparación de medias mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor y posteriormente se realizó la prueba de Post-Hoc para determinar si alguno de los grupos de tratamientos y controles presenta diferencias estadísticamente significativas.

8 Resultados:

8.1 Caracterización taxonómica de la Planta.

La autenticación de la planta utilizada fue llevada a cabo por la Mtra. Magdalena Ayala Hernández en el mes de Abril de 2018 identificándola como: *Asteraceae*, *Ageratina petiolaris* (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rolo.

En cuanto al rendimiento del extracto; usando 42 gramos de hojas de la planta *Ageratina petiolaris* se obtuvieron 9.0016 g de extracto seco, lo que representa el 21.43% de rendimiento.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{9.0016 \text{ g de extracto}}{42 \text{ g de hojas}} \times 100 = 21.43\%$$

8. 2 Resultados del efecto hipoglucemiante:

Tras la realización del ensayo se procedió con el análisis estadístico, los resultados se concentran en la siguiente tabla:

Tabla 3 Efecto hipoglucemiante respecto al tiempo.

	Control		Extracto 25	Extracto 50	Extracto 100
Tiempo	negativo	Glibenclamida	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	n=6	n=6	n=6	n=6	
Tiempo 0	62.66 ± 4.18	62 ± 6.4	55 ± 9.3	57 ± 7.1	56 ± 12
60 minutos	124 ± 8.7	130 ± 29.99	135 ± 3.35	145 ± 3.06	133 ± 20.14
120 minutos	125.83 ± 26.11	99.5 ± 24.28	104.16 ± 19.00	126.83 ± 9.56	130.66 ± 28.46
180 minutos	68.66 ± 8.71	58.16 ± 8.79	^a 74.33 ± 4.84	^a 82.00 ± 12.18	^b 72.16 ± 5.71

Se muestran las medias de los grupos ± desviación estándar; los valores corresponden a la prueba de ANOVA de un factor con nivel de significancia al 95%

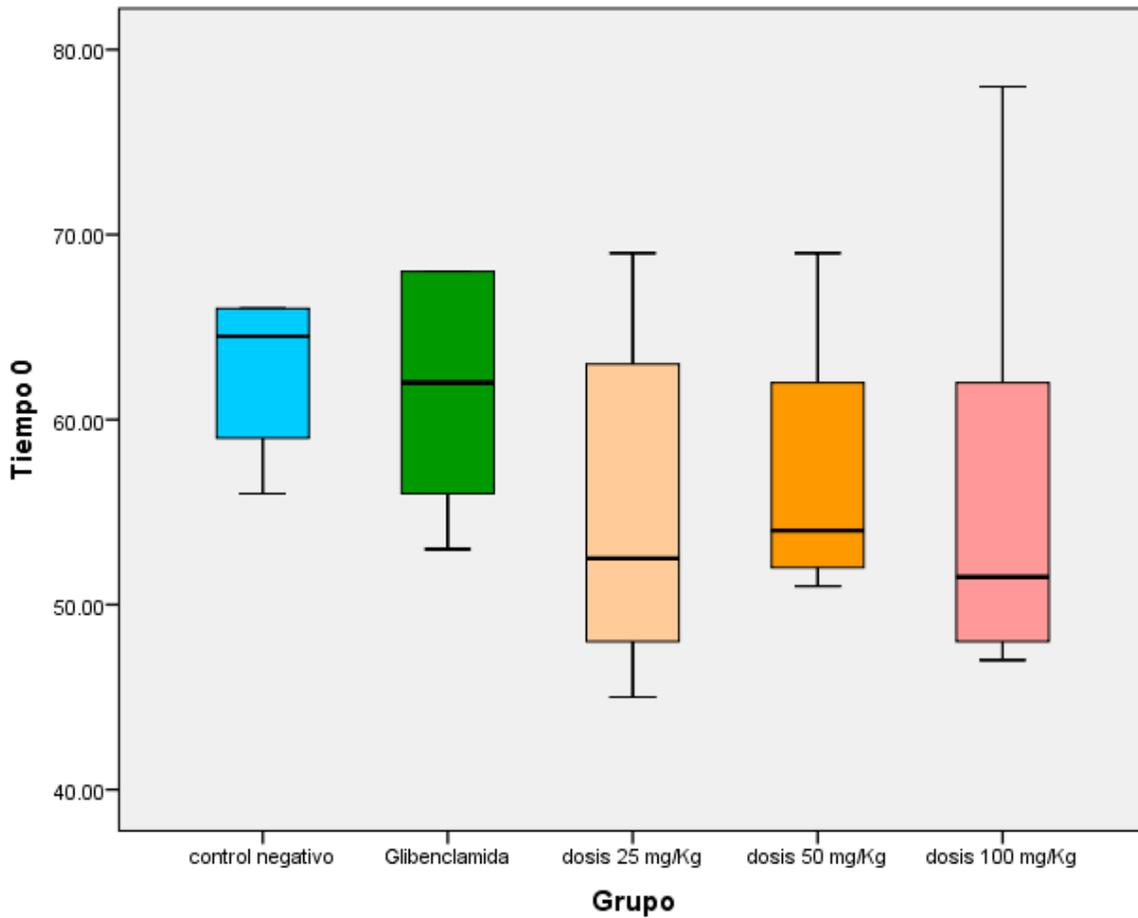
^a p= 0.001 vs grupo control positivo

^b Post Hoc p= 0.058 vs control negativo

En el análisis de varianza solo se encontró significancia a los 180 minutos. Por lo que se procedió a realizar la prueba de Post Hoc en la que se observó que el valor de p es mayor a 0.05 por lo que no existe efecto hipoglucemiante en el extracto acuoso de *Ageratina petiolaris*. Sólo en el grupo de glibenclamida se observó el efecto hipoglucemiante.

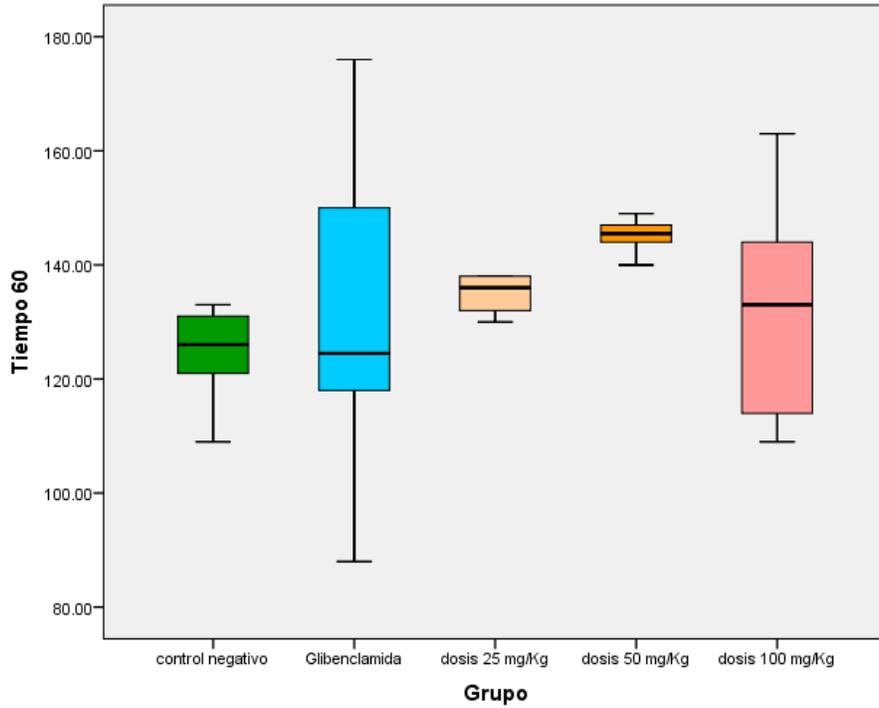
Al realizar el ensayo del efecto hipoglucemiante se observó que los grupos de tratamiento así como el grupo control negativo (al que se le administró solución salina) presentan un comportamiento similar y respecto al control positivo (glibenclamida) las medias de las pruebas son diferentes, por lo que el efecto hipoglucemiante no se presentó en el extracto.

Gráficas que muestran la respuesta hipoglucemiante respecto al tiempo.



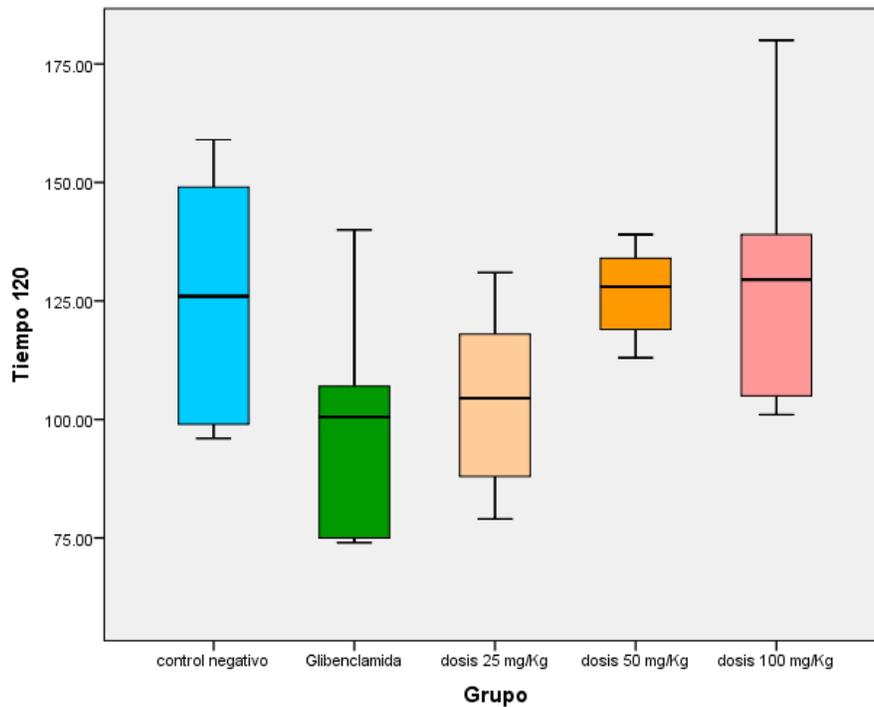
Grafica 1. Concentración de glucosa al inicio del tratamiento.

Al inicio del tratamiento los histogramas muestran valores de glucosa ligeramente altos en el grupo testigo y en el grupo de glibenclamida, mientras que en los grupos en donde se administró el extracto presentan concentraciones de glucosa ligeramente menores que los grupos control. A pesar de esto hay homogeneidad dentro de los grupos.



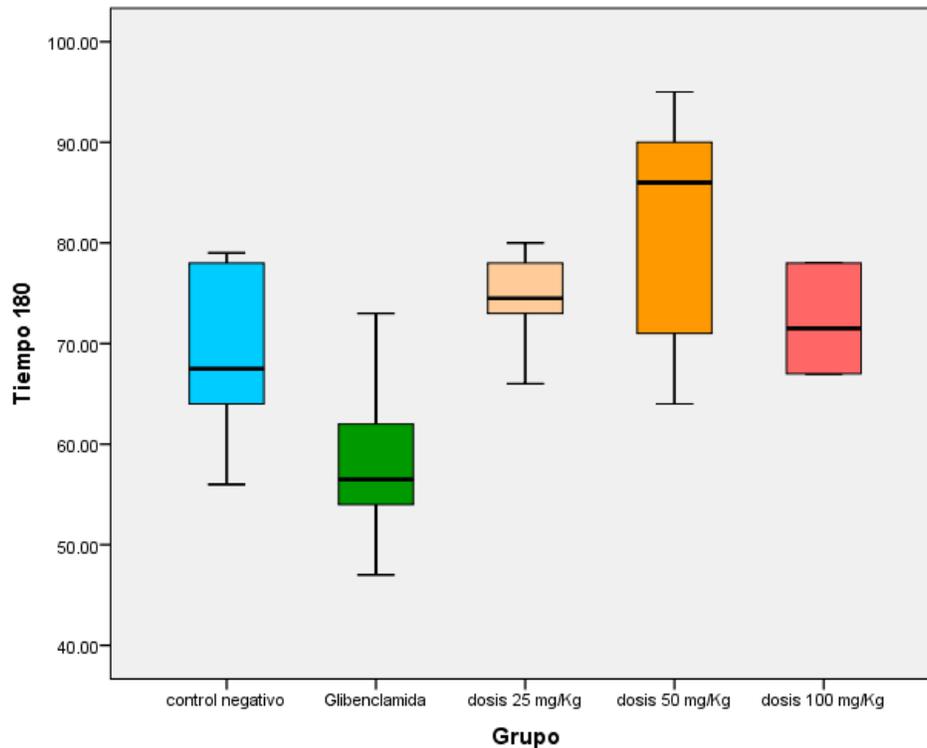
Grafica 2. Concentración de glucosa a los 60 minutos de la prueba.

El grupo al que se administra glibenclamida y el grupo control negativo presentan concentración de glucosa menor a los grupos que se aplica el tratamiento.



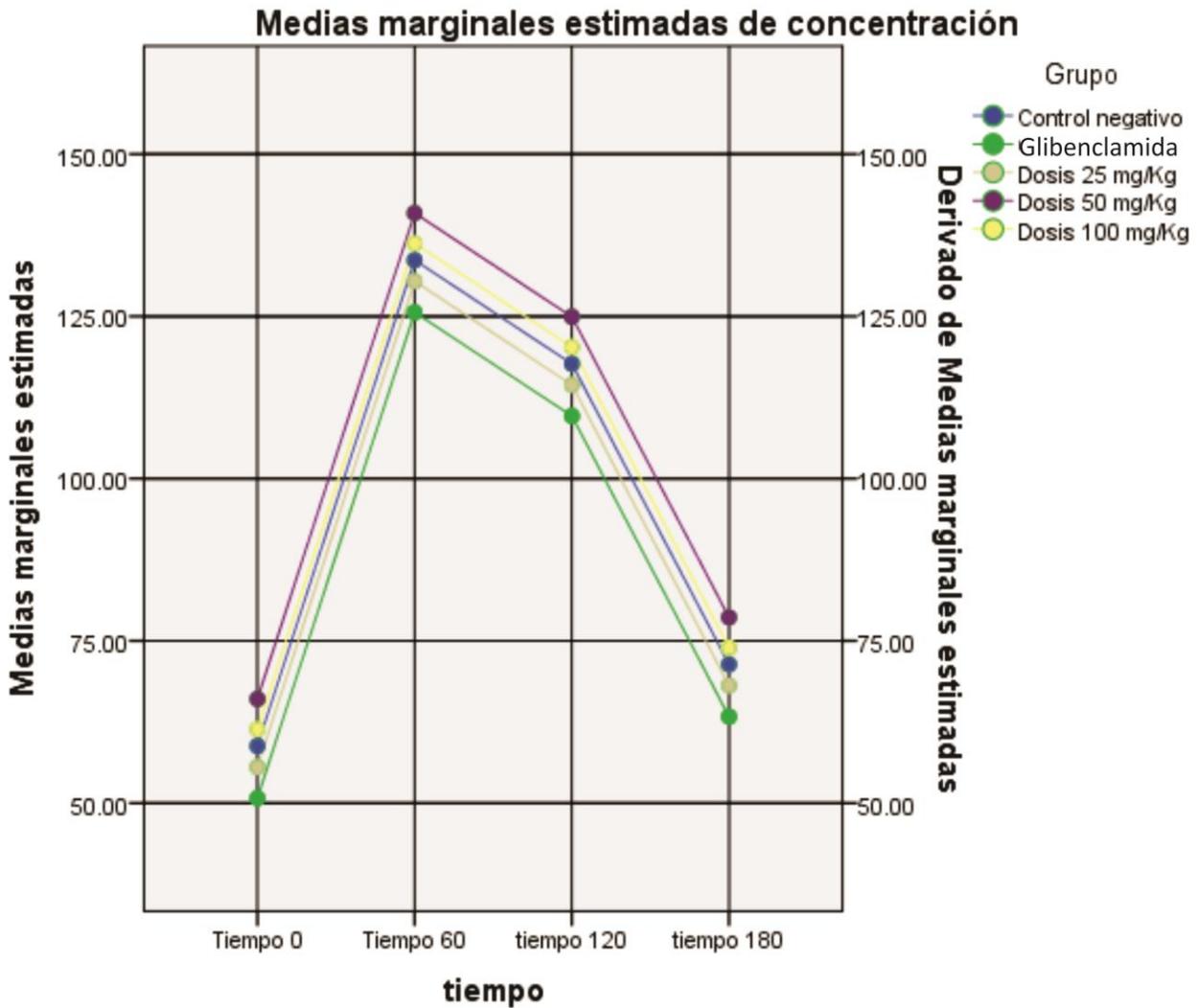
Grafica 3. Concentración de glucosa a los 120 minutos de la prueba.

El grupo al que se le administra glibenclamida presenta la menor concentración de glucosa; en tanto el tratamiento con dosis de 25 mg/kg presenta concentraciones similares a dicho control positivo. Los tratamientos restantes así como el control negativo presentan concentraciones de glucosa mayores a los 125 mg/dL



Grafica 4. Concentración de glucosa a los 180 minutos de la prueba.

A partir de los 180 minutos, la respuesta hipoglucemiante se observa en los ratones a los que se administró glibenclamida. El grupo con tratamiento de 25 mg/Kg presenta concentraciones de glucosa similares al control negativo; el grupo de tratamiento con 50 mg/Kg presenta una concentración de glucosa mayor a la del grupo control negativo en tanto que el grupo con dosis de 100 mg/Kg presenta valores similares al control negativo pero a su vez este comportamiento no es suficientemente potente para igualar el efecto hipoglucemiante de la glibenclamida.



Grafica 5. Prueba de ANCOVA $p= 0.016$ en el que se observa el comportamiento de la glicemia de todos los grupos experimentales respecto al tiempo.

Al realizar el análisis estadístico se encontró que el valor de “p” es mayor a 0.5 en la prueba de Post Hoc, por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa; esto implica que no existe efecto hipoglucemiante en el extracto acuoso de la planta. Solo en el grupo control positivo con glibenclamida se observó el efecto

hipoglucemiante. No obstante se observó en el histograma que la dosis de 25 mg/kg presenta una tendencia al comportamiento de la glibenclamida.

8. 3 Resultados del efecto antibacteriano:

Se observó que en la prueba realizada por triplicado *S. aureus* creció en toda placa de agar AST excepto en el pozo donde se colocó la solución de Ciprofloxacino 100 µg/ 50 µL. El extracto a las concentraciones de 125, 250 y 500 µg/µL no presentó inhibición del crecimiento bacteriano.



Imagen 6. Inhibición del crecimiento de *S. aureus*.

En la imagen 7 se observa que *E. coli* creció en toda placa de agar AST excepto en el pozo donde se colocó la solución de ciprofloxacino 100 µg/ 50 µL. El extracto a las concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL no presentó inhibición del crecimiento bacteriano, con lo cual se confirma que no existe actividad contra las bacterias probadas.

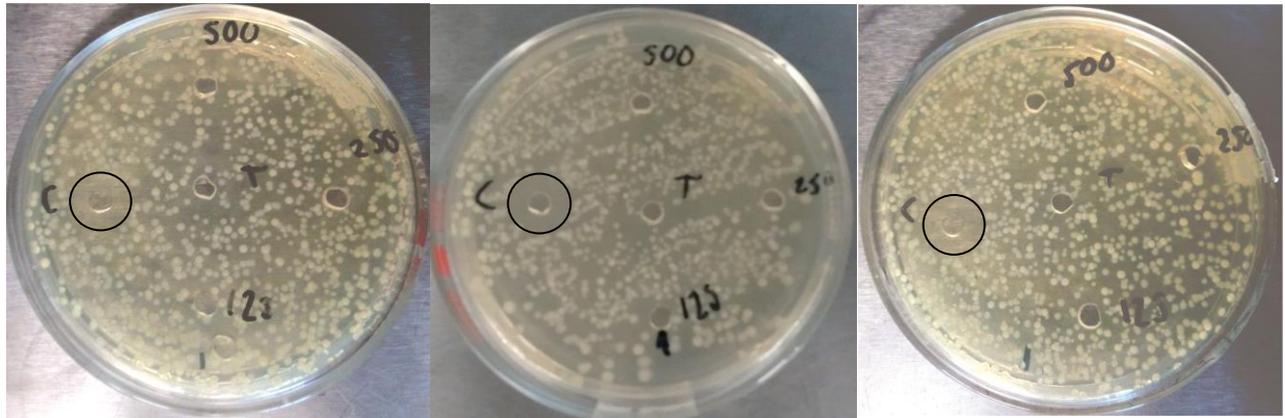


Imagen 7. Inhibición del crecimiento de *E.coli*.

Se observa en la tabla 4 que el extracto no produjo inhibición del crecimiento bacteriano en el caso de bacterias *S. aureus* y *E. coli*, el testigo positivo (ciprofloxacino) presentó una inhibición del crecimiento bacteriano; el control negativo (solución salina) no presentó inhibición por lo que la prueba se realizó de manera correcta.

Tabla 4. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano frente al ciproloxacino, solución salina y el extracto.

Actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>						
Concentración del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	Halo de inhibición (mm)					
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	1	2	3	1	2	3
125	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0
Control positivo	27	23	24	14	15	14
Control negativo	0	0	0	0	0	0

Discusión

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante en el grupo control positivo se utilizó Glibenclamida, hipoglucemiante de absorción oral rápida que mantiene un efecto prolongado, en dicho tratamiento se observó el efecto hipoglucemiante tal como está reportado en la literatura ^{39, 39} obteniendo hipoglucemia mayor que la lectura basal a los 180 minutos de iniciada la prueba, esta variación de la glucemia en las muestras de sangre del grupo de estudio, manifiesta que el modelo experimental funciona para evaluar el efecto hipoglucemiante y se puede aplicar para determinar si una sustancia tiene el efecto o no; por lo tanto los resultados obtenidos presentan confiabilidad en la determinación del efecto hipoglucemiante en el extracto evaluado.

De acuerdo a diversas investigaciones *A. petiolaris* posee componentes tales como L-chiro inositol ¹⁶, así como ácido colorogénico ¹⁷ y ácido 2 α -isovaleroiloxieperúico ³⁰ a los cuales se atribuye efecto hipoglucemiante, sin embargo durante la prueba se encontró que en las concentraciones del extracto a 25, 50 y 100 mg/kg no hay efecto hipoglucemiante.

Como se observa en la tabla 3, al inicio del tratamiento la concentración de glucosa se encuentra en condiciones similares en todos los grupos, condición necesaria para poder realizar la comparación entre los grupos.

A los 60 y 120 minutos no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, lo que puede explicarse por el tiempo necesario para tener la respuesta fisiológica,

en tanto que en el grupo al que se aplicó la glibenclamida no se observó el efecto farmacológico dado que la diferencia no fue significativa.

A los 180 minutos, el grupo con tratamiento de 50 mg/kg presentó la mayor concentración de glucosa, en el grupo al que se aplicó la dosis de 100 mg/kg se pudo apreciar una variación similar al grupo control, pero a su vez este efecto no tuvo la intensidad esperada para alcanzar producir hipoglucemia, lo cual implica que en ninguna de las dosis se alcanzó la disminución de la glucosa respecto al tiempo; esto contrasta con el efecto esperado debido a la presencia de los componentes reportados en otras investigaciones,^{29, 40} ya que se esperaba una disminución de la concentración de glucosa.

La grafica 5 muestra que la dosis de 25 mg/kg tiene una disminución de la hiperglucemia mayor que el control negativo, con tendencias al comportamiento del grupo control positivo (glibenclamida) pero no lo suficientemente potente para alcanzar el efecto hipoglucemiante; de manera que probablemente en el extracto se encuentren componentes activos que no alcanzan una dosis terapéutica en el extracto crudo.

Para llevar a cabo la determinación del efecto antibacteriano del extracto crudo se utilizó un modelo en condiciones in vitro, utilizando ciprofloxacino como control positivo. El uso de este antibiótico en el modelo experimental permite establecer que el resultado obtenido al probarlo frente a *E. coli* y *S. aureus* es confiable ya que en el pozo donde se aplicó el control positivo ciprofloxacino (100 µL/50µL) se alcanzó la inhibición que se ha observado en diversas investigaciones⁴¹.

Se conoce que el ácido kaurenico se encuentra presente en el orden asterácea, al cual pertenece *Ageratina petiolaris*, dicho componente puede inhibir el crecimiento bacteriano en bacterias Gram positivo y también presenta actividad antifúngica en condiciones in vitro ³¹; sin embargo, en el estudio realizado se observó que el extracto de *A. petiolaris* en las concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL no logró un efecto de inhibición antibacteriana.

Esta investigación respecto al efecto antibacteriano muestra que debido a la ausencia de la inhibición bacteriana en el tratamiento a diferentes dosis, se evidencia la ausencia de componentes activos o podría ser que estos se encontraran en una cantidad muy escasa por ello no se alcanza a generar el efecto de inhibición bacteriana; por otra parte, debido a la actividad reportada contra hongos, también es importante verificar si en el extracto de la planta se encuentra algún componente antimicótico.

Conclusiones:

- En la evaluación del efecto hipoglucemiante se comprobó que el extracto crudo de *A. petiolaris* no presenta dicha actividad en ratones hiperglucémicos.
- Tras realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana se encontró que el extracto no es activo frente a *S. aureus* y *E. coli* ya que no presentó inhibición del crecimiento bacteriano en condiciones in vitro.

Perspectivas.

Debido a que no se evidenció respuesta hipoglucemiante se puede considerar que no hay presencia de compuestos o se encuentran en concentraciones escasas, por esta razón se recomienda en otra etapa de la investigación realizar separación, concentración y evaluación de componentes.

Respecto a la actividad antibacteriana, podría ser útil evaluar la actividad antimicótica, dado que en el orden *asteráceas* hay reportes de que algunos de sus componentes pueden tener dicha actividad.

10 Referencias.

- 1) Hernández AM, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia, Salud Publica Méx. 2013; 55(2) Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/spm/2013.v55suppl2/s129-s136/es>
- 2) Vázquez CJL, Panduro CA, Diabetes mellitus tipo 2: un problema epidemiológico y de emergencia en México. *Investigación en Salud*, 2001; volumen III(99):18-26. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14239904>
- 3) Rodríguez BRA, Reynales SLM, Jiménez RJA, Juárez MSA, Hernández ÁM, Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo, Rev Panam Salud Publica. 2010; 28(6):412–420.
- 4) Hayes Dorado JP, Diabetes mellitus tipo 1 Type 1 diabetes mellitus Rev Soc Bol Ped. 2008; 47 (2): 90-6.
Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbp/v47n2/v47n2a06.pdf>
- 5) Holmes HN, Robinson JM, Tscheschloy BA, Diabetes Mellitus Guía Para el Manejo del Paciente, España, Lippincott Williams & Wilkings, 2007, Pg. 10-15
- 6) American Diabetes Association, Diabetes care diagnosis and classification of diabetes mellitus. 2008; 31(Supplement 1): 55-60. Disponible en: <https://doi.org/10.2337/dc08-S055>
- 7) Richard SB. Joslin's Diabetes Deskbook A Guide For Primary Care. Second Edition, EE.UU. Joslin Diabetes Center, 2010 pg. 10-22
- 8) Olmos P, Araya A, González C, Lasoa P, Irribarra V, Rubio L. Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas, Rev Méd Chile 2009; 137: 1375-1384
- 9) Velasco M, Cervell D, Rodríguez A, Jiménez S, Fernández I. Actualización en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neuropatía diabética periférica, Angiología. 2017; 69(3): 174-181
- 10) Who.int [Internet]. Ginebra: OMS; [actualizado 2016 citado 23 mar 2018]. Disponible en: http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index3.html

- 11) Velázquez O, Aldatz F, Rubio A, Verdejo J, Méndez M, Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México, 2007; 77(1): 31-39
- 12) Briceño, Soledad G, Silva, Eglé. Insulina, hipertensión y diabetes, Revista Latinoamericana de Hipertensión, 2007; 2(2): 65-69 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=170216985006>
- 13) Alcántara V, Pérez A. Tratamiento de la diabetes mellitus (I), Medicine. 2016;12(18):1001-12
- 14) Gómez F, Abreu C. ¿Necesitamos nuevos tratamientos para la diabetes tipo 2?, Endocrinol Nutr. 2014; 61(6): 323-328 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.10.013>
- 15) Quílez P, García M. Control glucémico a través del ejercicio físico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2; revisión sistemática, Nutr Hosp. 2015;31(4):1465-1472
- 16) Ostlund E, McJill B, Herskowitz I, Kipnis J, Santiago J, Sherman W. D-chiro-Inositol metabolism in diabetes mellitus, Proc. Natl. Cd. Sci. USA 1993; 90: 9988-9992
- 17) Sangeetha K, Sujatha S, Shanmuganathan V, Anand S, Shilpa K, Posa Jyothi P, et al. Current trends in small molecule discovery targeting key cellular signaling events towards the combined management of diabetes and obesity, Bioinformation 2017; 13(12): 394-399
- 18) Gómez GA, Soto PJG, Álvarez AC. Uso de hipoglucemiantes orales en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *ORIGINALES Aten Primaria*. 2005; 35(7):348-52 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656705703681>
- 19) Balderas I. Diabetes, Obesidad y Síndrome Metabólico: un Abordaje Multidisciplinario, México, D.F. Editorial El Manual Moderno; 2015.

- 20) Dods RF. Understanding Diabetes A Biochemical Perspective, United States of America New Jersey, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken; 2013 pg. 332-337.
- 21) Calvo J, Martínez L, Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27(1):44–52.
- 22) Axelsen PH, Essentials of Antimicrobial Pharmacology, A guide to Fundamental For Practice. New Jersey: Humana Press Totowa, 2002 pg. 48-50.
- 23) Bryskier AMD. Antimicrobial Agents; Antibacterials and Antifunguts. Washington DC, ASM PRESS, 2005.
- 24) VIVOT EP. et al, Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Cienc. docencia tecnol.* 2012; 45:131-146, Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162012000200008&lng=es&nrm=iso>
- 25) Mummed B, Abraha A, Feyera T, Nigusse A, Assefa S. In vitro antibacterial activity of selected medicinal plants in the traditional treatment of skin and wound Infections in eastern Ethiopia, *BioMed Research International*; 2018
Disponible en <https://doi.org/10.1155/2018/1862401>
- 26) Zheng G, Luo S, Li S, Hua J, Li W. Specialized metabolites from *Ageratina adenophora* and their inhibitory activities against pathogenic fungi, *Phytochemistry* 2018; 148 : 57-62 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.01.013>
- 27) Sánchez E, Castillo S, García P. Actividad antimicrobiana, *Investigación en plantas de importancia médica*, Barcelona, España: OmniaScience; 2016 pg. 77-100.
- 28) Sánchez GE, Castillo HSL, García PP. *Actividad Antimicrobiana, Investigación en Plantas de Importancia Médica*. Barcelona España, OmniaScience. 2016, 77-100.
- 29) Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; Vol. (99) pg. 325–348.

- 30) Calderón J, Quijano L, Garduño M, Gomez F, Rios T. 2 α -ISO-valeroyloxyeperuic acid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*, *Phytochemistry* 1983; 22(11) 2617-2619
- 31) Espitia C, Concunubo J. Constituyentes de ageratina artributolia (Benth) King and Robinson (compositae). *Revista Colombiana de Química*, 1989; Vol. 18 (1-2)
- 32) Gaitan R, Gómez H, Tapia S, Villadiego A, Méndez D. ácido-11-hidroxi kaur-16-en-oico, un nuevo kaureno aislado de *Aristolochia anguicida*, *Revista Latinoamericana de Química*; 2002
- 33) Rzedowski-Calderón GJ. Flora Fanerogámica De México. *CONABIO-INECOL*, 2001, p. 797.
- 34) Brito-Casillas Y, Meliánb C, Wägnera A. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. *Endocrinol Nutr.*, 2016; 63(7):345-353.
- 35) Hugués B, Rodríguez J, Marrero M. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2, *Rev Cubana Endocrinol* 2002; 13(2):160-8
- 36) Arias J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2, *Nutr Hosp.* 2007;22(2):160-68
- 37) Shafrir E. *Animals Models of Diabetes*, *Frontiers in Reseach*. Second Edition, United States of America, CRC Press Taylor & Frands Group, Hiroshi Ikegami, 2007, pp 41-50.
- 38) NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*, 22 de agosto de 2001 http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001 (último acceso 5 de noviembre 2018)
- 39) Carreón R, Marroquín-Segura R, Mora-Guevara JL, Valadez-Sánchez C, Flores-Cabrera Y, Pimentel MF, Estudio del extracto etanólico de *Eryngium*

heterophyllum (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2013; 44(2):41-45.

40) Marroquín-Segura R, Flores M, García MB, Mora GJ, et al. Efecto Antihiper glucémico de un extracto acuoso de colubrina elíptica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2005; 36(3): 27-32.

41) Ge Q, Chen L, Tang M, Zhang S, Liu L, Gao L, et al. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 2018; 833: 50–62 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.021>

42) Shrestha S, Subaramaihha S, Subbaiah S, Eshwarappa R, Lakkappa D. Evaluating the antimicrobial activity of methanolic extract of *Rhus Sucedanea* Leaf Gall. *BioImpacts*, 2013; 3(4): 195-198.

Anexo 1 Preparación de los tratamientos con el extracto y estándares.

Preparación del extracto.

Dosis 25 mg/Kg

Peso promedio de los ratones = 25 g

$$mg \text{ del extracto} = \frac{25 \text{ g de peso del ratón}}{1000 \text{ g}} \times 25 \text{ mg de la dosis} = 0.625 \text{ mg}$$

Volumen mínimo 0.2 mL

$$mg \text{ del extracto} = \frac{5 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}} \times 0.625 \text{ mg de la dosis} = 15.625 \text{ mg}$$

Se prepara la dosis pesando 31.25 mg del extracto en 10 mL

Concentración de la solución 3.125 mg/mL

Dosis de 50 mg/kg

$$mg \text{ del extracto} = \frac{25 \text{ g de peso del ratón}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg de la dosis} = 1.25 \text{ mg}$$

Volumen mínimo 0.2 mL

$$mg \text{ del extracto} = \frac{5 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}} \times 1.25 \text{ mg de la dosis} = 31.25 \text{ mg}$$

Concentración de la solución 6.25 mg/mL

Dosis de 100 mg/kg

$$mg \text{ del extracto} = \frac{25 \text{ g de peso del ratón}}{1000 \text{ g}} \times 100 \text{ mg de la dosis} = 2.5 \text{ mg}$$

Volumen mínimo 0.2 mL

$$mg \text{ del extracto} = \frac{10 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}} \times 2.5 \text{ mg de la dosis} = 125 \text{ mg}$$

Concentración de la solución 12.5 mg/mL

Preparación del extracto:

Se pesaron 125 mg del extracto y se disolvieron en 10 mL de agua destilada.

Se realizaron las diluciones 1:2 a partir de la solución del extracto con dosis de 100 mg/Kg (12.5 mg/mL), obteniendo diluciones acuosas del extracto con dosis de 50 mg/Kg (6.25 mg/mL) y 25 mg/Kg (3.125 mg/mL).

Se calcularon los volúmenes a ocupar por ratón para pesos de 25 g a 50 g a partir de la dosis de cada solución y el peso de cada ratón.

Solución glucosada.

Se preparó la solución inyectable de glucosa al 50% y se obtuvo un volumen total de 150 mL

Se preparó utilizando 15 mL de solución inyectable de glucosa más 135 mL de SS.

La solución al 50% contiene 0.5 g/mL la dilución 1:10 mantuvo una concentración final de 0.051 g/mL

Los gramos necesarios de glucosa de acuerdo a la dosis por el peso del ratón.

dosis: 2 g/kg

$$g \text{ de glucosa} = \frac{25 \text{ g de peso del ratón}}{1000 \text{ g}} \times 2 \text{ g de la dosis} = 0.05 \text{ g}$$

Se obtuvo el volumen a utilizar considerando el peso en gramos de los ratones. Se elaboró una tabla con el peso en gramos de 25 a 50 g.

$$mL \text{ de solución de glucosa} = \frac{0.05 \text{ g}}{0.051 \text{ g}} \times 1 \text{ mL} = 0.98 \text{ mL}$$

Preparación del estándar de glibenclamida:

Se preparó una solución de Goma Gatti al 1%, se prepararon 200mL

$$g \text{ de goma gatti} = \frac{1\% \text{ solución}}{100\% \text{ solución}} \times 200\text{mL del preparado} = 2 \text{ g}$$

2 g de goma gatti que se disolvieron en 110 mL de agua.

Se calentó la solución en ciclos de 10 segundos hasta que se alcanzó la homogeneidad.

Se calcularon los gramos de glibenclamida a utilizar, con la dosis y el peso promedio de los ratones.

Dosis de glibenclamida: 0.8 mg/kg de peso, el peso promedio de los ratones es de 25 g.

$$mg \text{ de glibenclamida} = \frac{25 \text{ g de peso del ratón}}{1000 \text{ g}} \times 0.8 \text{ mg de la dosis} = 0.02 \text{ mg}$$

Volumen mínimo 0.2 mL

$$mg \text{ del extracto} = \frac{1 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}} \times 0.02 \text{ mg de glibenclamida} = 0.1 \text{ mg}$$

Se pesaron 10 mg (0.01 g) de glibenclamida y se disolvieron en 100 mL de goma Gatti, previamente preparada.

Se calcularon los volúmenes de Glibenclamida a ocupar por ratón para pesos de 20 a 30 g, a partir de un volumen mínimo de 0.2 mL y el peso promedio de 25 g.

$$\begin{aligned} mL \text{ de glibenclamida} &= \frac{26 \text{ g de peso del ratón}}{25 \text{ g de eso promedio}} \times 0.02\text{mL de glibenclamida} \\ &= 0.208 \text{ mL} \end{aligned}$$

Anexo 2

Funcionamiento del glucómetro Accu Check Performance.

La lectura de Glucosa en sangre se realiza obteniendo una gota de sangre capilar la cual se aplicará rosando el borde amarillo de la tira reactiva.

Las tiras reactivas utilizadas muestran concentraciones de glucosa en el plasma de acuerdo a la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio; por lo que la medición se refiere a la glucemia del plasma, aunque se aplica sangre total sobre la tira reactiva. Las tiras reactivas contienen los diversos reactivos en el extremo de la tira los cuales se añaden a la tira por medio de un proceso en capas; la superficie posee una membrana para separar los componentes macromoleculares y productos de coagulación sanguínea, de modo que el analito se difunda sobre las distintas capas dando lugar a una secuencia de reacciones que generarán una ligera corriente eléctrica.

El fundamento de la medición se basa en la reacción de la glucosa oxidasa; esta es una enzima específica sobre la glucosa que realiza la oxidación con una actividad óptima a los 20 y 45 °C a un pH de 3.0 a 6.0 y se inactiva a temperaturas superiores a 60 °C.

La Glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa en ácido glucónico utilizando el oxígeno como aceptor de electrones formando peróxido.



Rango de medición del sistema: 60-600 mg/dL

Tamaño de muestra: 0,6 µL

Tiempo de medición: 5 segundos

Condiciones de operación del sistema 6 °C a 44 °C

Anexo 3

Tabla de ANOVA de un Factor.

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo 0	Inter-grupos	273.333	4	68.333	1.008	0.422
	Intra-grupos	1694.167	25	67.767		
	Total	1967.500	29			
Tiempo 60	Inter-grupos	1405.133	4	351.283	1.253	0.315
	Intra-grupos	7008.333	25	280.333		
	Total	8413.467	29			
Tiempo 120	Inter-grupos	4989.867	4	1247.467	2.461	0.071
	Intra-grupos	12671.333	25	506.853		
	Total	17661.200	29			
Tiempo 180	Inter-grupos	1821.533	4	455.383	6.366	0.001
	Intra-grupos	1788.333	25	71.533		
	Total	3609.867	29			

Resultado de la prueba de post-Hoc a los 180 minutos de iniciada la prueba.

Post Hoc a los 180 minutos.				
	Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Glibenclamida	6	58.1667	
	control negativo	6	68.6667	68.6667
	dosis 100mg/Kg	6	72.1667	72.1667
	dosis 25mg/Kg	6		74.3333
	dosis 50mg/Kg	6		82.0000
	Sig.			.058