



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA**

**Efecto cicatrizante, antimicrobiano e  
hipoglucemiante de extracto etanólico de  
*Coryphantha pycnantha* (Mart.) Lem.**

---

Tesis para obtener en título de: Biólogo  
Presenta: Morales Pérez Luis Fernando  
Director: Dr. Rubén Marroquín Segura  
Asesora: Hortensia Rosas Acevedo

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIIT IG300315

México D.F., 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por aceptarme como estudiante de la carrera de Biología y formar parte de esta gran institución.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, lugar donde recibí formación académica y aprendí a ser mejor persona.

A mi director de tesis, el Dr. Rubén Marroquín Segura que me apoyó desde el principio para realizar este proyecto y guiarme durante el proceso.

A mi asesora de tesis, la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, por su paciencia, tiempo y disposición, que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi revisora de tesis y sinodal, la Mtra. Georgina Cecilia Rosales Rivera, por su tiempo y por sus oportunas observaciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. David Nahum Espinosa Organista, por ser mi sinodal y mostrar disponibilidad para asesorarme y contribuir a mejorar este trabajo.

A mi sinodal, la Dra. Rosalva García Sánchez por su accesibilidad y apoyo para mejorar de manera significativa este trabajo.

## **Dedicatoria**

A mis padres, María Dolores Pérez Cruz y Sergio Morales Flores por todos sus esfuerzos para lograr mis metas, por su motivación a seguir adelante, su paciencia, comprensión y la confianza que ha puesto en mí y que ahora me hacen una mejor persona.

A mis hermanas, Alejandra Morales Pérez y Yamilet Morales Pérez por creer en mí, por mostrarme su apoyo durante todo este tiempo y siempre agradeceré su existencia en mi vida.

A mi abuela, Alejandra Flores Pérez por su apoyo y paciencia en estos últimos años.

A Xochitl Ganados Aguilar, por su ayuda incondicional para realizar este trabajo, por su amistad sincera que con el tiempo y la convivencia se convirtió en una relación sincera que espero trascienda los años y cualquier adversidad que se presente.

En memoria de Juan Carlos Arias Ramírez, por brindarme su amistad, apoyo y cariño durante tantos años y aunque ya no esté con nosotros siempre recordare sus consejos y que debo lograr algo más.

Al Dr. Rubén Marroquín, Dr. José Luis Alfredo Mora y a la Mtra. Yolanda Flores por recibirme de una manera tan agradable en su laboratorio y darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Marco y Odín por brindarme su amistad y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

***“Los ideales que iluminan mi camino y una y otra vez me han dado coraje para enfrentar la vida con alegría han sido: la amabilidad, la belleza y la verdad”***

**Albert Einstein**

<b>Índice</b>	<b>página</b>
<b>1.-Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>2.-Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>3.-Marco teórico.....</b>	<b>13</b>
3.1.-Plantas medicinales de México.....	13
3.2.-Plantas medicinales como fuente de fármacos.....	15
<b>4.-Justificación.....</b>	<b>16</b>
<b>5.-Hipótesis.....</b>	<b>17</b>
<b>6.-Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>7.-Material biológico.....</b>	<b>17</b>
7.1.- <i>Coryphantha pycnantha</i> .....	17
7.2.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
7.3.- <i>Escherichia coli</i> .....	19
7.4.- <i>Candida albicans</i> .....	19
<b>8.-Material y método.....</b>	<b>20</b>
8.1.-Extracto etanólico de <i>Coryphantha pycnantha</i> .....	20
8.1.1.-Preparación de pomada de extracto etanólico de <i>Coryphantha pycnantha</i> .....	22
8.2.-Formación de lesiones cutáneas.....	23
<b>9.-Pruebas cuantitativas.....</b>	<b>24</b>
9.1.-Determinación de hidroxiprolina en piel.....	24
9.2.-Determinación de nitritos.....	26
9.2.1.-Procedimiento de cuantificación de nitritos.....	27
9.3.-Método de micropozos en agar.....	28
9.4.-Método efecto hipoglucemiante.....	30
9.4.1.-Actividad hipoglucemiante y de toxicidad.....	30
9.5.-Análisis estadísticos.....	33
<b>10.-Resultados.....</b>	<b>33</b>
10.1.-Efecto cicatrizante.....	33
10.1.1.-Cuantificación de hidroxiprolina.....	34
10.1.2.-Cuantificación de nitritos.....	35
10.2.-Efecto antimicrobiano.....	36
10.3.-Efecto hipoglucemiante.....	38
10.3.1.-Ensayo de toxicidad.....	39
<b>11.-Análisis de resultados.....</b>	<b>39</b>
11.1.- Efecto cicatrizante.....	39
11.2.-Efecto antimicrobiano.....	40
11.3.- Efecto hipoglucemiante.....	40
<b>12.-Conclusiones.....</b>	<b>41</b>
<b>13.-Referencias citadas.....</b>	<b>42</b>
<b>14.-Anexo.....</b>	<b>46</b>

## 1.-Resumen

Tradicionalmente las plantas se han utilizado por sus efectos benéficos para la salud, tales como incrementar la velocidad de regeneración de tejido, efecto antimicrobiano e hipoglucemiante. Las cactáceas en México representan un endemismo aproximado del 70% en América. Se han realizado estudios en el género *Coryphantha* que demuestran que contiene alcaloides que ayudan a la cicatrización por tener funciones vasoactivas y antimicrobianas.

Con base en esto se generó un extracto etanólico de *Coryphantha pycnantha* para posteriormente someterlo a pruebas experimentales en ratones de la especie *Mus musculus cepa* CD1, formándoles lesiones cutáneas circulares en la región dorsal escapular para aplicarles una pomada al 2% de extracto de *C. pycnantha*. Se comparó su efecto con los grupos control positivo y negativo durante 15 días, en el último día se midió la cantidad de hidroxiprolina en el tejido cicatrizado para evaluar la velocidad y la calidad de la cicatrización. El efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* se evaluó con el método de micropozos en agar, con tres diferentes concentraciones del extracto de *C. pycnantha* utilizando Ciprofloxacino y Terbinafina como control positivo, se midió la inhibición de crecimiento microbiano a las 24 y 48 horas. Por último el efecto hipoglucemiante se evaluó en ratones *Mus musculus cepa* CD1 donde se les administro una dosis diaria durante 15 días de acuerdo al peso del ratón para observar algún efecto toxico y en el día 15 se midieron las glucosas de todos los grupos los cuales son inducidos a la

hiperglucemia para cuantificar a cada hora el descenso de los niveles de glucosa en sangre y comparar entre grupos control y experimentales.

El extracto de *C. pycnantha* mostró mayor actividad regenerativa que el control positivo, no mostro actividad antimicrobiana y mostro actividad hipoglucemiante solo a una concentración.

## **2.-Introducción**

El uso tradicional de las plantas medicinales tiene gran relevancia debido a los efectos benéficos que éstas presentan como actividad contra infecciones y enfermedades inmunológicas. Los extractos de las plantas medicinales pueden aumentar la cicatrización de heridas por el incremento de la tasa de división celular del tejido conectivo, estimulación del crecimiento celular del endotelio y de los fibroblastos, por ciertos efectos sobre la microcirculación, o ejerciendo su acción por vía antibacterial para prevenir infecciones en la piel y poder aumentar su efecto cicatrizante (Carrasco, 2012).

Estudios realizados en *Opuntia ficus indica*, demuestran que los extractos de su fruto, tallo y raíz, aumentan el nivel de cicatrización en ratas *Wistar* hasta en un 30% más rápido que con cremas de uso comercial para extractos etanólicos y metanólicos, mientras que extractos acuosos tan solo demostraban un índice de 10% con respecto a la crema comercial (Terence *et al.*, 1977).

Existe una gran variedad de estudios de plantas, dentro de la familia de las cactáceas se encuentran *Opuntia streptacanthia*, *O. megacantha*, *O. fuliginosa*, *O. lindheimeri* y *Stenocereus sp* las cuales cuentan con actividad hipoglucemiante

por su alto contenido de fibra además de contener un amplio número de alcaloides a la cual se le han atribuido muchos de los efectos fisiológicos que se obtienen al consumir estos productos (Park y Lee, 2013; Latha *et al.*, 2014). Además se tienen reportes de actividad antibacteriana de extractos metanólicos de especies del género *Stenocereus*, sobre el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*; del extracto metanólico de *Lophocereus schottii*, sobre el cultivo de *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocytogenes*. Y también hay estudios de la actividad antifúngica del extracto metanólico de *Stenocereus pruinosus*, sobre el crecimiento de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Microsporum cookei* (Rodríguez *et al.* 2010).

En el género *Coryphantha*, se ha encontrado uno de los alcaloides en grandes cantidades (Batis y Rojas, 2002) la hordenina ha probado que tiene una acción inhibitoria contra un espectro amplio de bacterias resistentes a la penicilina (Batis y Rojas, 2002). Además de tener gran importancia ya que es endémica de la República Mexicana, se distribuye en los estados de Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Distrito Federal (Arias *et al.*, 1997 y Scheinvar, 2004) y por su uso como planta comestible (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2004).

La piel es un órgano complejo cuya función principal es formar una barrera que protege al organismo de su entorno y al mismo tiempo permite la interacción con él, desempeña una gran cantidad de funciones que incluyen:

- Conservación de la integridad del cuerpo
- Protección frente a agresiones externas
- Regulación de la temperatura
- Absorción y excreción de sustancias
- Absorción de radiación ultravioleta
- Producción de vitamina D
- Detección de estímulos sensoriales
- Barrera de protección contra microorganismos
- Reparación de heridas y cicatrización

Estas diversas funciones están mediadas por una o varias de las capas que conforman la piel: la epidermis, dermis y el tejido subcutáneo (Luchas, 2008).

El colágeno es una proteína fibrosa que se encuentra en todos los tejidos y órganos a los que proporciona forma y resistencia estructural, en cada uno de estos tejidos tiene una estructura característica acorde a la función que desempeña; en la piel forma parte de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, siendo el componente principal de la dermis (Garrido,2016).

Cada molécula de colágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas entrelazadas llamadas cadenas  $\alpha$  que se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. El tamaño de las cadenas polipeptídicas varía entre 600 y 3000 aminoácidos; el colágeno de la piel es rico en glicina (33% de los aminoácidos), prolina (13 %) y en los aminoácidos derivados 4-hidroxiprolina (9%) y 5-hidroxilisina (0.6%), sin la hidroxilación de la prolina y la lisina no pueden formarse

los enlaces de hidrógeno indispensables para alcanzar la estructura definitiva del colágeno (Ross, 2008).

Hasta ahora se han identificado hasta 27 tipos de colágeno teniendo en cuenta las combinaciones de cadena  $\alpha$  que contienen, el colágeno tipo I es el más abundante y está formado por dos cadenas  $\alpha 1(I)$  y una cadena  $\alpha 2(II)$  por lo que su fórmula molecular  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(II)$ , se encuentra en huesos, piel, tendones, tejido cicatrizado, pared intestinal y uterina, cartílago, cornea etc. El colágeno tipo II está compuesto por tres cadenas  $\alpha$  idénticas  $[\alpha 1(II)]_3$  y está presente en los cartílagos y el colágeno tipo III  $[\alpha 1(III)]_3$  se encuentra en los vasos sanguíneos, piel, cicatrices y pared intestinal y uterina (Devlin, 2004).

Una herida es definida como el daño o ruptura de la estructura anatómica y la pérdida de sus funciones normales, esto puede ser desde una simple ruptura de la estructura epitelial de la piel o ser más profundo, extendiéndose hacia el tejido subcutáneo con daño en otras estructuras como tendones, músculos, vasos, nervios, órganos parenquimatosos e incluso huesos (Velnar, 2009).

Las heridas se clasifican:

**Heridas agudas:** Son de corta evolución y se caracterizan por una curación completa dentro de 6 a 12 semanas, el proceso ocurre con pocas complicaciones o ninguna y el resultado es una herida bien sanada; por lo general están causadas por un agente externo traumático.

**Heridas crónicas:** Se definen como las heridas en las que no se ha logrado llevar a cabo un proceso de cicatrización ordenado, la mayoría de las heridas que no han cicatrizado en 3 meses se consideran crónicas. El mecanismo más usual es la desregulación de una de las fases del proceso de cicatrización, esto ocurre con mayor frecuencia en la fase inflamatoria; otros mecanismos importantes en el desarrollo de las heridas crónicas son la hipoxia en el tejido lesionado y errores de reepitelialización debidos a traumas o desecación que puede resultar en una herida con menor espesor y fuerza mecánica.

La resistencia a los antibióticos está llegando a niveles alarmantes, según la OMS esta es una de las amenazas más apremiantes a la salud pública en el mundo actual, considerándolo un problema crítico con severo impacto económico y social que pone en riesgo los adelantos de la medicina moderna, siendo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans* los patógenos humanos más importantes, que se encuentran involucrados en una diversidad de infecciones e intoxicaciones, resistente a los derivados de la penicilina y causantes de infecciones dermatológicas (Tamariz, *et al.* 2014, Musmeci y Lezcano, 2013; Alvarado *et al.*, 2014; Campoverde y Pomaquiza, 2014; Albuquerque *et al.*, 2014).

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más comunes y graves. Es un problema de salud pública que afecta a todas las sociedades, sin importar su estado de desarrollo (Marroquín *et al.*, 2005; Hernández, *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009; Rehman *et al.*, 2011; Park y Lee, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Arif *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Latha *et al.*, 2014), La diabetes es definida como un trastorno del metabolismo de hidratos de

carbono, proteínas y grasa, en el que los azúcares en del cuerpo no se oxidan para producir energía sin variar el grado de resistencia a la insulina. Se caracteriza por el aumento de los niveles de glucosa en la sangre, que resulta de la ausencia o inadecuada actividad de la insulina pancreática o se vuelve progresivamente resistente a su acción. (Rehman *et al.*, 2011; Park y Lee, 2013; Latha *et al.*, 2014).

La DM se encuentra asociada al desarrollo de complicaciones irreversibles e invalidantes que pueden ser agudas y a largo plazo y aún peor mortales con notable afectación de la calidad de vida, si el tratamiento es inadecuado (García *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013).

Existen tres tipos principales de diabetes mellitus: Diabetes tipo 1: También llamada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o diabetes juvenil- sobre la diabetes establecida (Kumar *et al.*, 2014). Representa un trastorno heterogéneo y poligénico, caracterizado por el fracaso para producir insulina debido a la destrucción autoinmune de células  $\beta$  del páncreas (Rehman *et al.*, 2011; Arif *et al.*, 2014). Diabetes tipo 2: También conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) o diabetes del adulto, en donde el organismo no produce suficiente insulina o no la usa adecuadamente, es la forma más común de esta enfermedad en un porcentaje que va del 90 al 95% de los casos. Actualmente esta variante está cerca de alcanzar proporciones epidémicas como resultado de un aumento en el número de personas ancianas y de una gran prevalencia de obesidad y sedentarismo de la población (García *et al.*, 2009, Kumar *et al.*, 2014), (Arif *et al.*, 2014). Diabetes gestacional: Las personas con diabetes tienen 2-4 veces más probabilidades de tener enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular

que las personas sin diabetes. Además, la diabetes mal controlada pueden complicar el embarazo, los defectos de nacimiento son más comunes en los bebés nacidos de mujeres con diabetes (Kumar *et al.*, 2014).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que existen más de 347 millones de personas con diabetes en el mundo y que podría aumentar a 366.000.000 o más para el año 2030; alrededor de dos terceras partes de estos pacientes viven en países en vías de desarrollo (Marroquín *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2013; Arif *et al.*, 2014; Latha *et al.*, 2014). Existe una amplia variedad de medicamentos farmacológicos que están siendo utilizados para el tratamiento de la diabetes (hipoglucemiantes orales -sulfonilureas y biguanidas- y/o insulina). Sin embargo, en la actualidad los fármacos hipoglucemiantes pueden tener efectos secundarios, incluyendo la obesidad, hipoglucemia severa, hiperandrogenemia, acidosis láctica, la lesión celular hepática idiosincrásica, déficit neurológico permanente molestias digestivas, dolor de cabeza, mareos al tiempo que reduce la glucosa en sangre o incluso pueden provocar la muerte (García *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013; Arif *et al.*, 2014; Latha *et al.*, 2014). En México muchas personas han utilizado por años un sin número de plantas y formulas poli-herbales, en la actualidad han sido estudiados como apoyo en el tratamiento del control de la diabetes *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Aloe barbadensis*, *Aloe vera*, *Galega officinalis*, *Gymnema slyvestre*, *Momordica charantia*, *Pterocarpus marsupio*, *Panax quinquefolius*, *Trigonella foenum graecum*, *Silybum marianum*, *Syzigium cumini*, *Vaccinium Mytillus*, considerados menos tóxicos, de bajo costo y

libre de efectos secundarios (Marroquín *et al*, 2005; Hernandez *et al*, 2008; Rehman *et al*, 2011; Park y Lee, 2013; Latha *et al*, 2014).

En el género *Coryphantha*, existen alcaloides que han sido estudiados extensivamente (Ranieri y Lloydia, 1976; Howe *et al*, 1977; Yeary y Keller 1980; Meyer *et al*, 1983; Batis y Rojas, 2002; Bravo *et al*, 2006; Keely *et al*, 2006; Keller *et al*, 2006; Sato *et al*, 2006), la mayoría de ellos con función farmacéutica anti-depresiva, como suplemento alimenticio o psicoactivo, los indígenas usan la planta para limpiarse la piel y como agente antibacteriano, para prevenir la infección y promover la curación.

### **3.-Marco teórico**

#### **3.1.-Plantas medicinales de México**

Todas las culturas han adquirido un conocimiento de las plantas o de los órganos vegetales utilizados en medicina tradicional. Los más antiguos documentos escritos, tienen aproximadamente 6000 años de antigüedad, incluyendo descripciones de las plantas utilizadas en esa época. En un principio este conocimiento era un derecho del brujo de la tribu inclusive se llegaron a establecer ritos y creencias relativas a la recolección. Antes del siglo XVIII se conocían las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y modo de aplicación. No fue posible hasta éste siglo (s. XVIII); que con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de nuevas ciencias como la fitoquímica y de técnicas como el análisis instrumental, el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de

muchas plantas medicinales (Fonnegra y Jiménez, 2007). El primer libro de herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes fuentes bibliográficas históricas en América en medicina, lleva por nombre “Libro de las yerbas medicinales de los indios”, que se conociera cuatro siglos después como Códice Badiano (Códice De la Cruz-Badiano). Esta es una obra en la que se describen más de 150 plantas nativas de México y donde se constata su uso medicinal (Esquivel-Gutiérrez, *et al.*, 2012).

La gran mayoría de los principios activos se han obtenido sintéticamente en el laboratorio y posteriormente ha sido utilizada en la preparación de medicamentos químicos. El consumo de estos medicamentos se incrementó desplazando cada vez más el uso directo de las plantas medicinales de las cuales proceden, alejándose así el hombre de la medicina tradicional (Fonnegra y Jiménez, 2007). Los problemas de salud y la difícil consecución de los medicamentos sintéticos han llevado de nuevo a la humanidad a la búsqueda de la medicina tradicional. De este modo, las plantas medicinales han vuelto a tener un auge acelerado como medicina alternativa garantizando eficacia, seguridad y bajo costos (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico. Un total de 3,000 especies han sido compiladas en un atlas de plantas medicinales empleadas por diversos grupos étnicos. Increíblemente, aproximadamente el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de

elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas (Esquivel-Gutiérrez, *et al.*, 2012).

Aunque los reportes indican un sinnúmero de plantas medicinales utilizadas en nuestro país, las más nombradas por sus usos son: Gordolobo (*Gnaphalium sp.*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Hierbabuena (*Menta sp.*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Nopal (*Opuntia ficus-indica*), Árnica mexicana (*Heterotheca spp.*), Guarumbo (*Cecropia obtusifolia*), Verbena (*Verbena carolina*), Saúco amarillo (*Tecoma stans*), Epazote (*Chenopodium ambrosioides*), Sábila (*Aloe vera*), Ruda (*Ruta graveolens*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*), entre otras (Esquivel-Gutiérrez, *et al.*, 2012).

Algunos estudios sugieren que es necesario un estudio más exhaustivo de este tipo de plantas medicinales (Alarcón *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2002; Prabhakar y Doble, 2008, Hernández *et al.*, 2002; Andrade y Henrich, 2005).

### **3.2.-Plantas medicinales como fuente de fármacos**

Actualmente, se tiene el conocimiento de que muchos compuestos derivados de plantas, cuya actividad farmacológica es importante, se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario ((Esquivel-Gutiérrez, *et al.*, 2012), por lo que dichos compuestos son llamados metabolitos secundarios. Ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el humano, además de que es su mayoría son utilizados como materias primas de la

industria farmacéutica, alimentaria, textil, agroquímica, perfumería y cosmetología (Esquivel-Gutiérrez, *et al.*, 2012).

La distribución de los metabolitos secundarios en el reino vegetal se infiere que es amplia. Se estima que cerca de 50,000 especies vegetales que son utilizadas medicinalmente, solo una pequeña cantidad se ha investigado para la obtención de medicamentos. De todas, aproximadamente del 15 al 20 % de las plantas terrestres han sido evaluadas sobre el resto de las especies vegetales, además de que se desconoce si sus metabolitos poseen algún efecto farmacológico, por lo que el conocimiento en este campo queda restringido a grupos taxonómicos particulares, por lo que queda mucho por estudiar (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2012).

#### **4.-Justificación**

Debido a que la familia de las cactáceas es endémica de América y está poco estudiada en cuanto al uso medicinal, se quieren realizar estudios que confirmen su uso medicinal, principalmente como cicatrizante.

En el género *Opuntia* se encuentran especies con actividad hipoglucemiante por su alto contenido de fibra, además de contener un amplio número de alcaloides a la cual se le han atribuido muchos de los efectos fisiológicos que se obtienen al consumir estos productos (Park y Lee, 2013; Latha *et al.*, 2014). Por ello se estudiará a la especie *Coryphantha pycnantha*, ya que puede tener un gran número de alcaloides, según estudios anteriores en el mismo género.

## **5.-Hipótesis**

Varias especies del género *Coryphantha* sintetizan hordenina, tiramina y metanefrina, alcaloides que poseen propiedades cicatrizantes, hipoglucemiantes y antimicrobianas, por lo cual se esperaría que *Coryphantha pycnantha* presente propiedades similares, debido a que se encuentra en el mismo género.

## **6.-Objetivos**

Generar un extracto etanólico que pueda ser aplicado de forma dérmica para comprobar la efectividad de *Coryphantha pycnantha* en la cicatrización, usando como modelo a ratones de la especie *Mus musculus* cepa CD1.

Evaluar el efecto antimicótico del extracto etanólico de *Coryphantha pycnantha* sobre *Candida albicans*.

Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Coryphantha pycnantha* y sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Coryphantha pycnantha* en ratones de la especie *Mus musculus* cepa CD1.

## **7.-Material biológico**

### **7.1.-*Coryphantha pycnantha***

Especie de la familia Cactaceae, planta suculenta globosa o cilíndrica que crece por separado o juntas formando un grupo. Los tallos de color azul-verde a verde opaco, alcanzan los 5-7 cm de altura y 5-9 cm de diámetro. Las areolas son

cónicas, de 2.5 centímetros de largo con la base romboidal. Tienen de 2 a 4 espinas centrales ligeramente curvadas, aciculares, de color blanco o amarillo con la cabeza más oscura y gris, con la edad, de 1,3 a 1,9 centímetros de largo. Las 8 a 15 espinas radiales son curvas, de 8 a 18 milímetros de largo, de color blanco a amarillo y que se vuelven grises con la edad. Las flores en forma de campana, son de color amarillo brillante, tienen un tamaño de hasta 4 cm de largo y 5 cm de diámetro. Los frutos son alargados, verdes y jugosos, de 2.4 cm de largo (Dicht, 2003).

Los ejemplares ocupados en este proyecto fueron proporcionados por la empresa mexicana cactus la unión, que es la encargada de conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de las especies endémicas en alguna categoría de riesgo (UMA) con registro. SEMARNAT No.MX/VIV-CO-087-MEX.

## **7.2.-*Staphylococcus aureus***

Es una bacteria inmóvil, esférica en forma de cocos, gram-positiva, de 0.8 a 1 micras de diámetro, pertenece a la familia Micrococcaceae, crece en grupos similares a racimos de uvas. Es una bacteria ampliamente distribuida por todo el mundo, entre el 20% y el 40% de los adultos sanos son portadores asintomáticos de *S. aureus*, su contagio se produce mayormente de persona a persona. La mayor parte del tiempo habita en el cuerpo sin causar daño (flora normal). Ésta suele estar principalmente en la piel y en las membranas mucosas, pero cuando penetra en los tejidos, puede ocasionar una amplia gama de infecciones, debido a la producción de toxinas. En ocasiones, puede entrar en el torrente sanguíneo

desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes (Campoverde y Pomaquiza, 2014).

### **7.3.-*Escherichia coli***

Es un bacilo gram negativo que mide de 0,5 a 1 micra de ancho y 3 a 5 micras de largo, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacteria no esporulada y móvil que presenta una compleja estructura antigénica. Forma parte de la microflora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Su contagio se da mediante transmisión oro-fecal o hídrico-fecal, y es un importante agente nosocomial. *E. coli* es una de las principales bacterias causantes de diarrea en todo el mundo, puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía gram-negativa (Campoverde y Pomaquiza, 2014).

### **7.4.-*Candida albicans***

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ ). Asimilan y fermentan azúcares. Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16  $\mu\text{m}$  de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas, cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. *Candida albicans* está

asociada a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Se encuentra en los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina). Estos son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas. En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad, se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa. *C. albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade. Los factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto y que determinan el fenotipo y virulencia de cada aislamiento (Castrillón *et al.*, 2005).

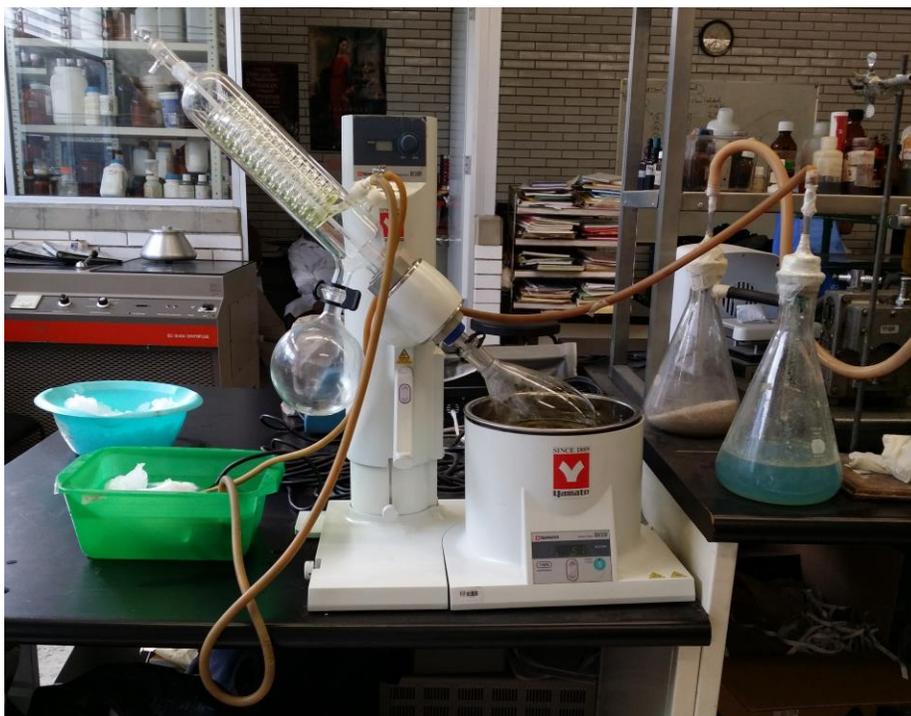
## **8.-Material y método**

### **8.1.-Extracto etanólico de *Coryphantha pycnantha***

Se ocuparon un aproximado de seis ejemplares de *Coryphantha pycnantha* (*Cactaceae*) que contengan raíz y tallo, a los cuales se les quitaron las espinas con la ayuda de unas pinzas. Posteriormente se lavaron a chorro de agua de llave para quitar la tierra y se trituraron en un molino.

Se pesaron 400 g de *Coryphantha pycnantha* seco y molido, se colocan en un matraz Erlenmeyer con 1L de etanol y se deja reposar por 8 días; posteriormente se filtró a vacío utilizando papel Whatman del No. 2.

Una vez filtrado, se colocó en un matraz balón de 1L (antes pesado), para eliminar el disolvente en un rotavapor (Figura1) a una temperatura de 50 °C bajo vacío. Una vez obtenido el concentrado del extracto etanólico se pesó para obtener el rendimiento. Se dejó secar por dos días a temperatura ambiente, posteriormente se mantuvo en un frasco ámbar en refrigeración hasta su utilización (Figura 2).



**Figura 1. Concentración en rotavapor de extracto de *Coryphantha pycnantha*.**

### 8.1.1.-Preparación de pomada de extracto etanólico de *Coryphantha pycnanantha*

En un vaso de precipitado de 100 mL, se colocan 10 g de vaselina, fundiéndose en un horno de microondas a ciclos de 10 segundos. En otro vaso precipitado de 10 mL, se disuelven 0.2 g de extracto etanólico de *Coryphantha pycnanantha* en un 1 mL de solución salina (para que quede al 2%), el extracto disuelto se vierte en la vaselina fundida, y con un agitador de vidrio se incorporará perfectamente el extracto en la vaselina.

Una vez mezclada se lleva a sonicación por un minuto para homogenizar, se continúa la agitación con varilla de vidrio hasta que solidifique la mezcla (Figura 3)



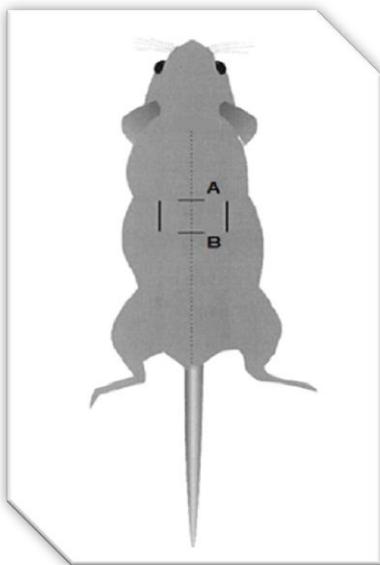
Figura 2. Extracto de *Coryphantha pycnanantha*. Figura 3. Pomada al 2% de *Coryphantha pycnanantha*.

## 8.2.-Formación de lesiones cutáneas

Se utilizaron 3 grupos de 6 ratones cada uno, de la especie *Mus musculus* cepa CD1, un grupo se utilizó como control positivo (madecassol), otro como negativo (vaselina) y el último, el grupo experimental al cual se le administra pomada al 2% de *Coryphantha pycnacantha*, los 18 ratones se mantienen a temperatura ambiente, a luz y oscuridad con libre acceso a alimento y agua; en jaulas con tres divisiones (uno por cada división) para evitar que se lesionen entre ellos.

Cada uno de los seis ratones de los tres grupos se anestesian en cámara de éter, practicándosele una incisión circular en la región dorsal interescapular con un sacabocado estéril de acero inoxidable de 1 cm de diámetro, (Figura 4) posteriormente se deja que los ratones se recuperen durante 20 min.

Pasado el tiempo de recuperación se midió la lesión en largo y ancho, posteriormente se administra a cada ratón de forma cutánea las preparaciones correspondientes cubriendo con una capa fina toda la lesión, diariamente durante 15 días.



**Figura 4. Diagrama donde se realizaron las lesiones cutáneas en la región dorsal interescapular del ratón.**

## **9.-Pruebas cuantitativas**

Se tomó una muestra de 0.4 g de tejido cicatrizado de cada uno de los ratones en el estudio, se ponen en tubos eppendorf y se mantienen en congelación hasta la cuantificación de hidroxiprolina. También se tomaron muestras sanguíneas de cada ratón para realizar una prueba de nitritos presentes en el suero sanguíneo.

### **9.1.-Determinación de hidroxiprolina en piel**

1.- Pesar las muestras de las escisiones de cada ratón y colocarlas en tubos Eppendorf (Figura 5).

2.- Adicionar 500µl de NaOH 2N a cada tubo.

3.- Colocar los tubos en autoclave a 120°C por 20 min.

4.- Una vez enfriadas las muestras, centrifugar a 5000 rpm.

5.- Traspasar 50µl de sobrenadante de cada tubo a uno diferente respectivamente.

6.- Adicionar 450µl de Cloramina-T y dejar oxidar por 20min a temperatura ambiente.

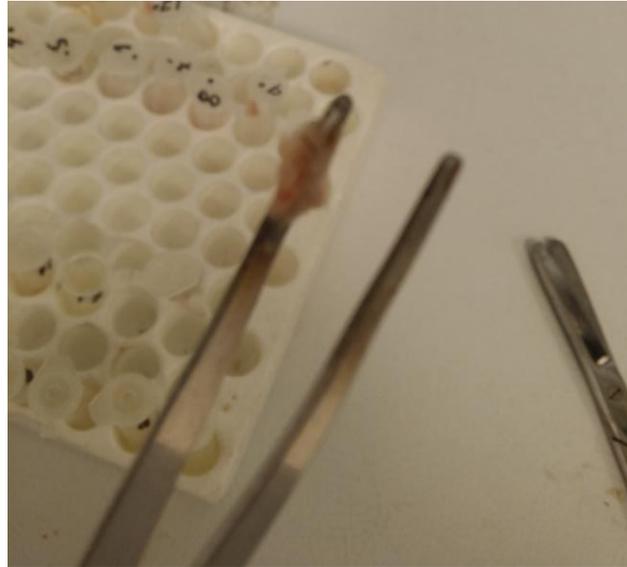
7.- Adicionar 450µl de ácido perclórico (3.15M) a cada tubo y dejar reposar durante 5min.

8.- Adicionar 500µl del reactivo de Ehrlich a cada tubo e incubar en baño María a 60°C por 25min.

9.- Enfriar las muestras en baño de agua fría.

10.- Centrifugar las muestras a 5000rpm durante 5min (Figura 6).

11.- Leer la absorbancia de cada muestra a 557nm en microespectrofotometro.



**Figura 5. Muestra de tejido cicatrizado para cuantificar hidroxiprolina.**



**Figura 6. Curva patrón de hidroxiprolina.**

## 9.2.-Determinación de nitritos

Nota: Este análisis reduce los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) mediante cadmio metálico plateado con sulfato de cobre.

Reducción con cadmio.

Se coloca en tubos de 13X100 limpios, 0.500 g de cadmio metálico en la campana de extracción. El cadmio se platea con una solución acuosa de  $\text{CuSO}_4$  al 5% (2mL), se agita en un rocker durante 10 minutos aproximadamente hasta que el cadmio se platea. Lavar exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre, 3 lavados con el tubo lleno y después lavar con  $\text{HCl}$  0.1N, usar 2 volúmenes con el tubo lleno para remover todo el  $\text{Cd}(\text{OH})_2$ . Después se lava el Cadmio con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (solución acuosa al 5%) ajustando el pH a 9 con borato de sodio.

Nota: el cadmio se puede guardar en esta solución hasta el ensayo y se puede volver a reutilizar lavando sin platear el cadmio.

Preparación de reactivos:

Sulfato de cinc para desproteinizar: Preparar una solución de  $\text{ZnSO}_4$  pesando 300 g/L o 30 g/dL.

Solución acuosa de ácido acético al 15% (V/V).

Reactivo de sulfanilamida: Disolver 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15%. Etiquetarlo y guardarlo en un frasco protegido de la luz.

Reactivo de NED: Disolver 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato en 150 mL de ácido acético al 15%. Etiquetarlo y guardarlo en un frasco protegido de la luz.

Solución estándar de nitrito de sodio: Debe prepararse una solución de nitrito de sodio 2  $\mu\text{L}/\text{ml}$ .

### **9.2.1.-Procedimiento de cuantificación de nitritos**

Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada a 100  $\mu\text{L}$  de plasma (la dilución es 1:4)

Retirar 20  $\mu\text{L}$  y adicionar 20  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{ZnSO}_4$

Mezclar bien y centrifugar a 10,000 g por 5 minutos para separar el precipitado

A un tubo con cadmio activado retirar el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y adicionarle todo el sobrenadante de la muestra. Dejar en agitación en un rocker durante 15 minutos cubierto con parafilm,

Centrifugar los tubos a 3500 g durante 5 minutos

Tomar 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante\* para el ensayo.

### Curva estándar

Tubo	Estándar (µL)	Agua destilada (µL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestra	200 (sobrenadante*)	700

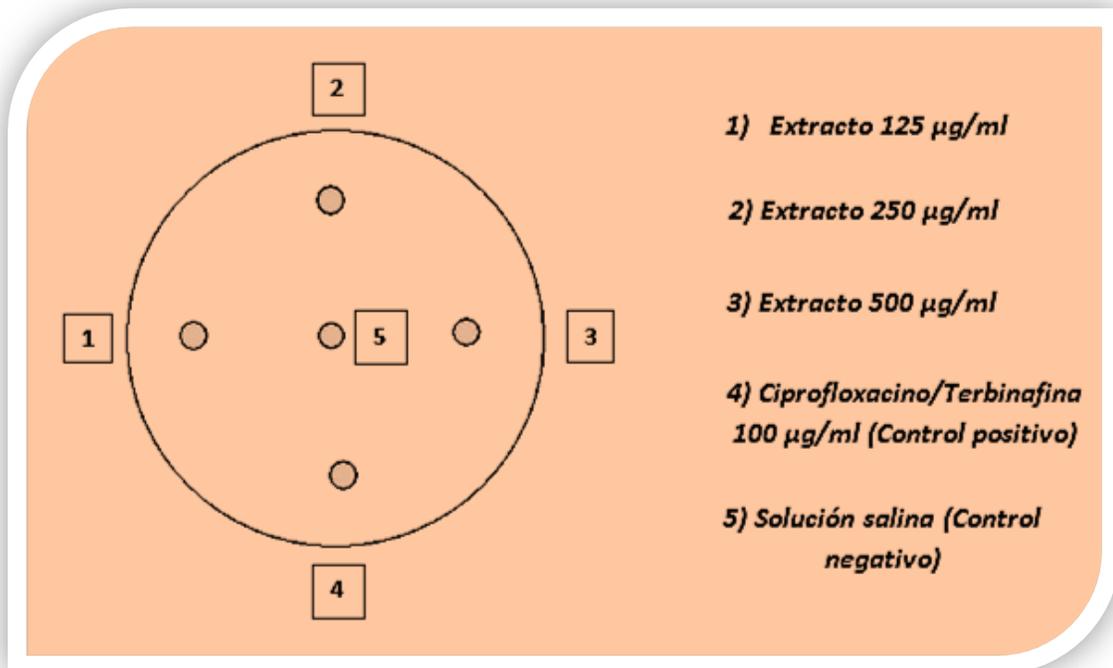
**Adicionar 50 µL de sulfanilamida, incubar 10 minutos a temperatura ambiente**

**Adicionar 50 µL del reactivo de NED, mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente**

### 9.3.-Método de micropozos en agar

Los microorganismos se mantienen en agar nutritivo incubado a 37 °C durante 24 horas. El cultivo madre se diluye en serie por diez veces con agua peptona estéril y 0.1 ml de dilución se incuba durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se prepararon las cajas Petri para los microorganismos dejando solidificar y se agregaron 100 µl del cultivo acondicionado de las cepas, se distribuye por la superficie del agar (método del hisopado) en las cajas. Después se realizaron los pozos (de 10 mm de diámetro) en donde se coloca 0.1 ml del extracto al 125, 250

y 500 µg/ml en los pozos, 100 µg/µl de Ciprofloxacino para bacterias y Terbinafina para levaduras (control positivo), y solución salina (grupo control negativo) en el orden mostrado en la Figura 7. Se deja incubar en la estufa a 37°C y posteriormente se observó el halo de inhibición a 24 y 48 horas después de hacer el cultivo.



**Figura 7. Contenido y orden en el que se realizan los pozos en la técnica.**

#### **9.4.-Método efecto hipoglucemiante**

Los reactivos se prepararán el mismo día que el ensayo biológico.

Se realizó una dilución 1:10 de una solución inicial de glucosa al 50% (dosis de 2 mg/Kg) para administrar en dos cargas (dosis de 4 mg/Kg), una al tiempo cero (t<sub>i</sub>) y a los 60 minutos (t<sub>1</sub>) durante el ensayo biológico para inducir hiperglucemia.

Así mismo para el grupo control se utilizó solución salina como tratamiento.

Se prepara una suspensión de goma Ghatti al 1%, calentándolo en ciclos de 10 segundos. La suspensión inicial del extracto de *Coryphantha pycnantha*, se preparó en agua para una dosis de 100 mg/Kg, realizando una diluciones, para obtener concentraciones de 50 mg/Kg y 25 mg/Kg, conformando las dosis de los grupos de experimento.

En cuanto a los grupos testigo positivos, se preparan suspensiones en goma Ghatti al 1% utilizando como estándares de referencia dos fármacos hipoglucemiantes: Glibenclamida y Tolbutamida con dosis 0.8 mg/Kg y 40mg/Kg respectivamente.

##### **9.4.1.-Actividad hipoglucemiante y de toxicidad**

Los ratones se dividieron en 6 grupos de 6 ratones 3 para las concentraciones experimentales y 3 para los controles positivo y negativo. Se sometieron a un periodo de 15 días de administración vía oral (Figura 8) de extracto de *Coryphantha pycnantha* a los grupos correspondientes de (25,50y 100 mg/Kg)

y al día 15 se realizó el ensayo hipoglucemiante sometiendo a los ratones a un periodo de ayuno de 16 horas.



**Figura 8. Administración oral de extracto de *Coryphantha pycnanantha*.**

Se utilizaron 36 ratones de la cepa CD-1, los cuales se pesaron y distribuyeron al azar en 6 grupos, como se muestra en la siguiente tabla:

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/Kg de peso)
1 – Control	Solución salina	
2 – Experimental	Extracto	25
3 – Experimental	Extracto	50
4 – Experimental	Extracto	100
5 - Testigo Positivo	Tolbutamida	40
6 - Testigo Positivo	Glibenclamida	0.8

Se midió la glucosa al tiempo cero (t<sub>i</sub>), por un corte distal de la cola para la obtención de la muestra de todos los grupos, utilizando un glucómetro (Figura 9).



**Figura 9. Medición de glucosa con accu-chek.**

Inmediatamente se administraran vía oral los distintos tratamientos: Para el grupo1 se le administra un volumen contante de 0.2 ml de solución salina. Para los grupos experimentales se administran los volúmenes previamente calculados del extracto etanólico de *Coryphantha pycnacantha* para las dosis 25, 50 y 100 mg/Kg de peso, a los grupos 2, 3 y a respectivamente. Posteriormente se administran los volúmenes previamente calculados de Tolbutamida (40 mg/Kg de peso) al grupo 5, y Glibenclamida (0.8 mg/Kg de peso) al grupo 6.

Una vez administrados los tratamientos, se administra la primera carga de glucosa de una solución al 50% diluida 1:10 vía subcutánea, con una dosis de 4 mg/Kg de peso repartida en dos dosis con un intervalo de tiempo de 1 hora, a todos los grupos al tiempo cero (ti) para inducir a la hiperglucemia.

Posteriormente se mide la glucosa al tiempo 1 (60 minutos) de todos los grupos después de la primera carga e inmediatamente se administra una segunda carga de glucosa a todos los grupos. Midiendo la glucosa a los tiempos 2, 3 y 4 (120,180 y 240 minutos respectivamente) posteriores a la segunda carga de ésta en todos los grupos.

### 9.5.-Análisis estadísticos

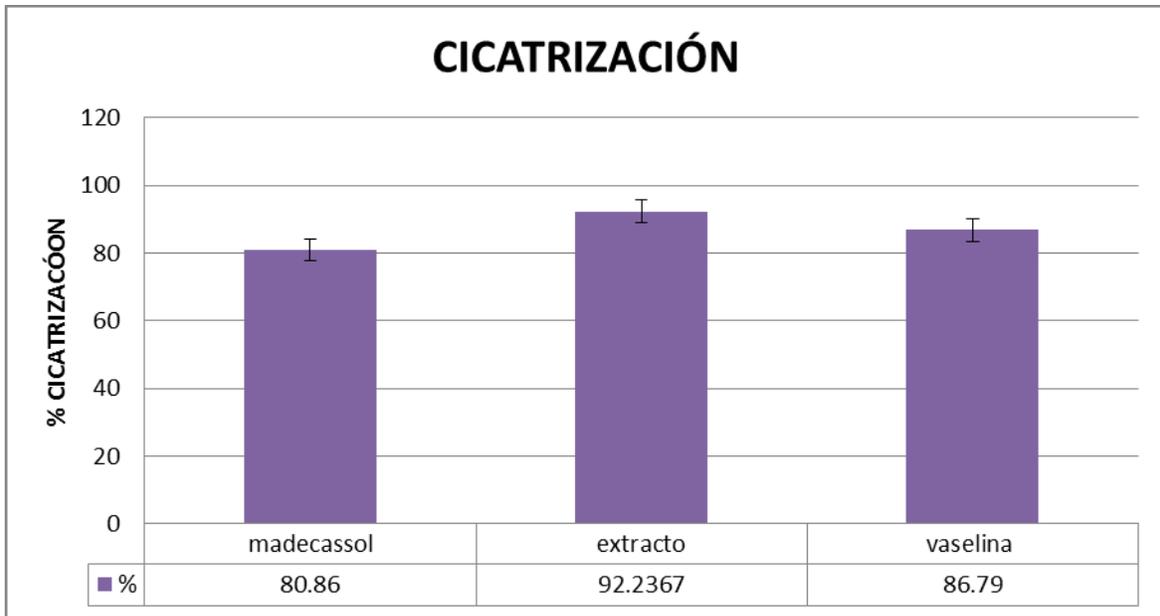
Se realizó una prueba ANOVA y tukey con el programa SPSS versión 21, para identificar si hay diferencias significativas los grupos control y experimentales.

## 10.-Resultados

### 10.1.-Efecto cicatrizante

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	388.519	2	194.260	3.860	0.044
Intra-grupos	754.975	15	50.332		
Total	1143.494	17			

**Tabla 1. Anova del porcentaje de cicatrización: donde se comparó el porcentaje de cicatrización de cada grupo para identificar si es significativo con respecto a los grupos control.**

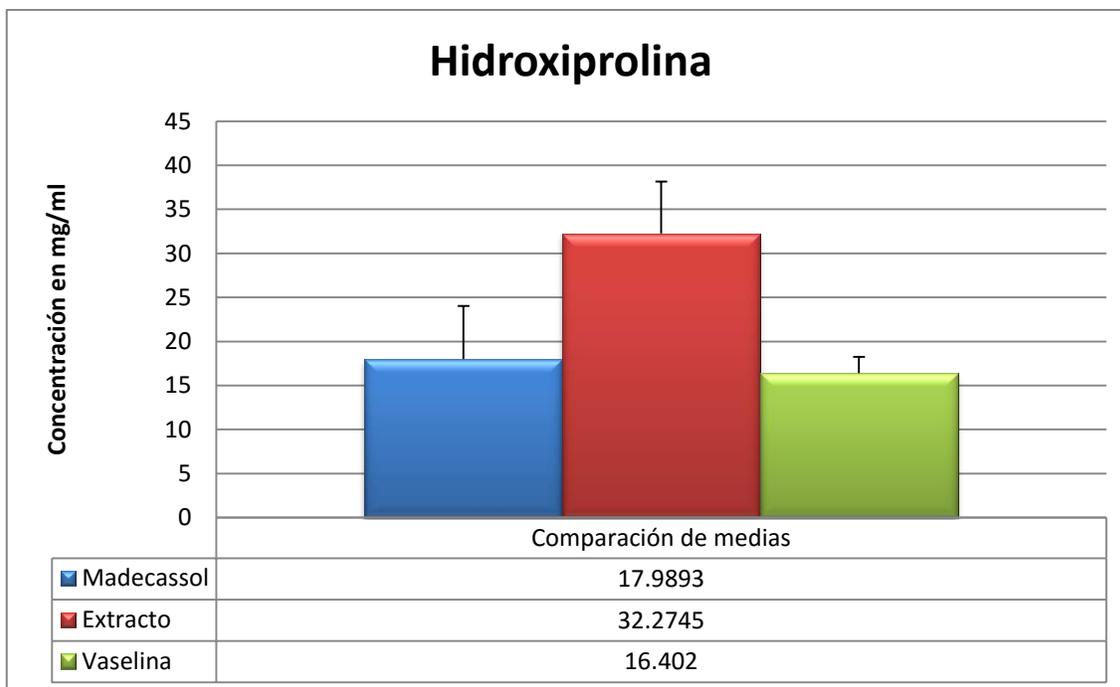


**Grafica 1. Comparación de resultados de la cicatrización, como podemos observar el extracto muestra una diferencia significativa en comparación con los controles positivo y negativo, el cual es visiblemente más efectivo que los controles.**

### 10.1.1.-Cuantificación de hidroxiprolina

	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	917.045	2	458.523	3.070	.076
Intra-grupos	2240.691	15	149.379		
Total	3157.736	17			

**Tabla 2. Anova de las concentraciones de hidroxiprolina donde el análisis arrojo que no es significativo.**

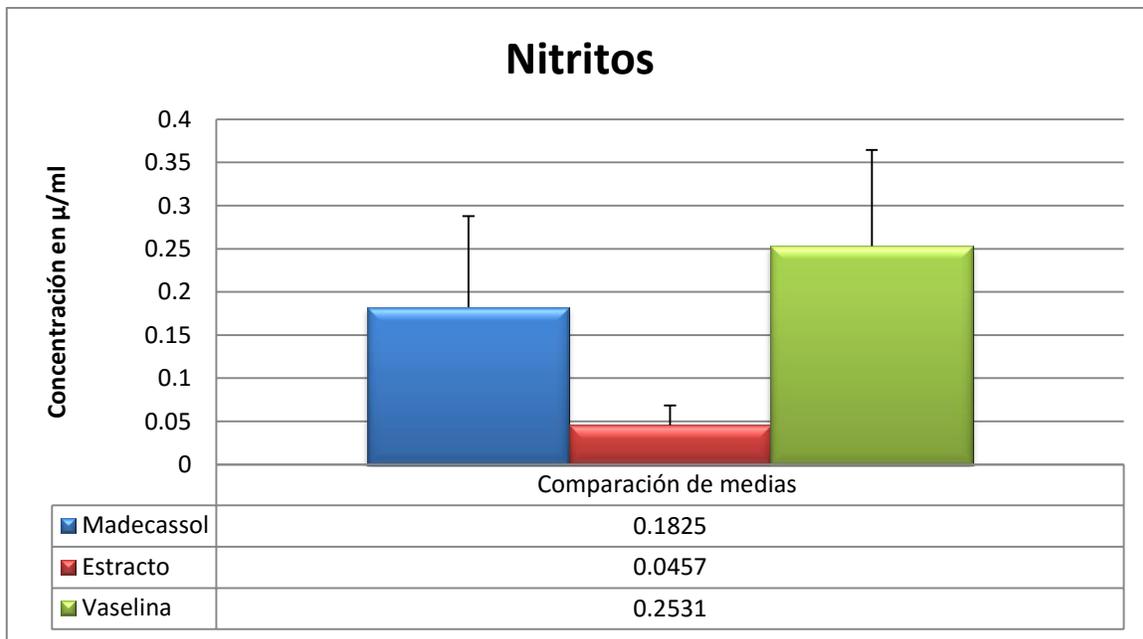


**Grafica 3. Comparación de las medias de concentración de hidroxiprolina, donde se observa que la media del grupo extracto es superior a los otros dos.**

#### 10.1.2.-Cuantificación de nitritos

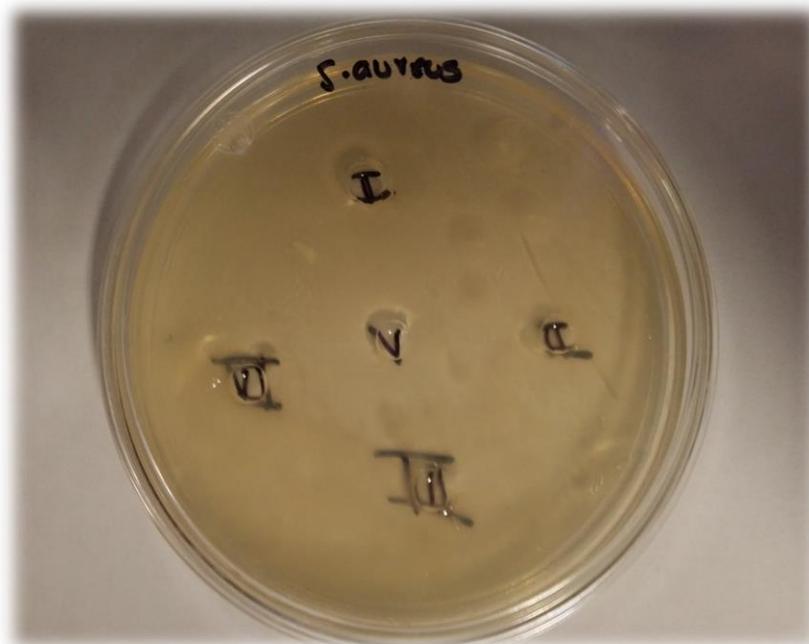
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	.133	2	.067	1.390	.079
Intra- grupos	.720	15	.048		
Total	.854	17			

**Tabla 3. Anova de concentraciones de nitritos, donde el análisis arrojo que no es significativo entre grupos.**

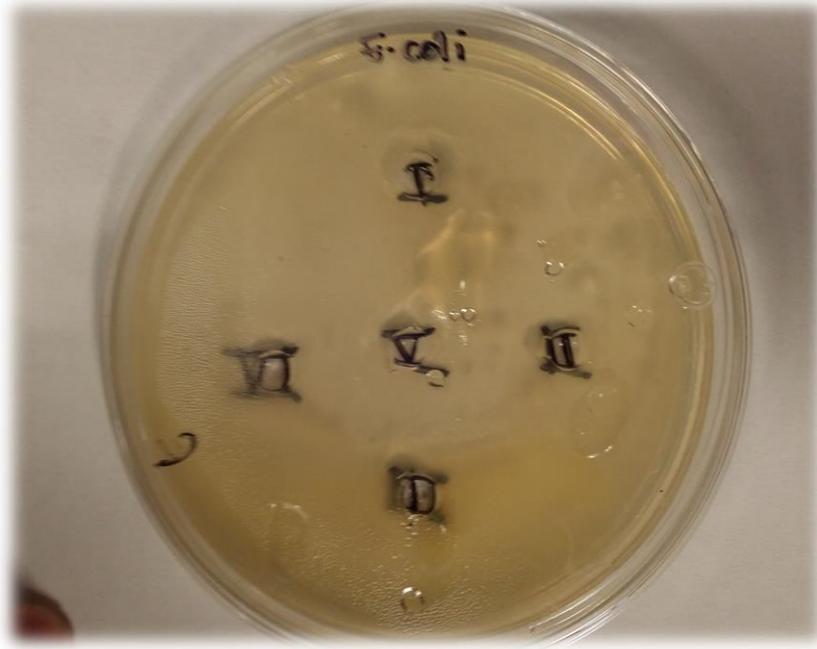


**Grafica 3. Comparación de las medias de concentración de nitritos donde se muestra que la media de extracto es menor a las otras dos.**

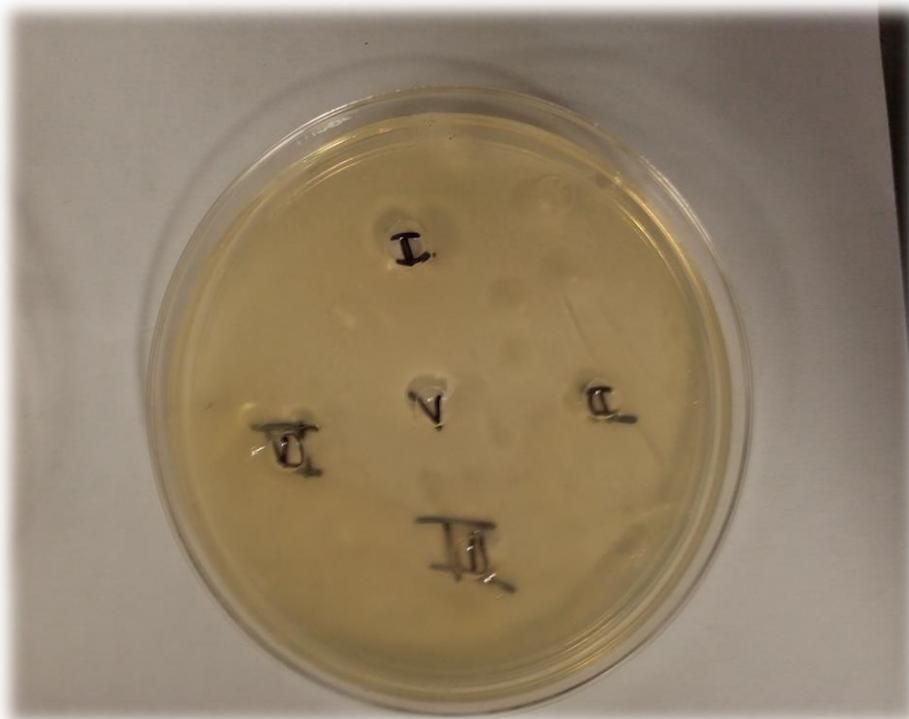
#### 10.2.-Efecto antimicrobiano



**Figura 10. *Staphylococcus aureus*.**



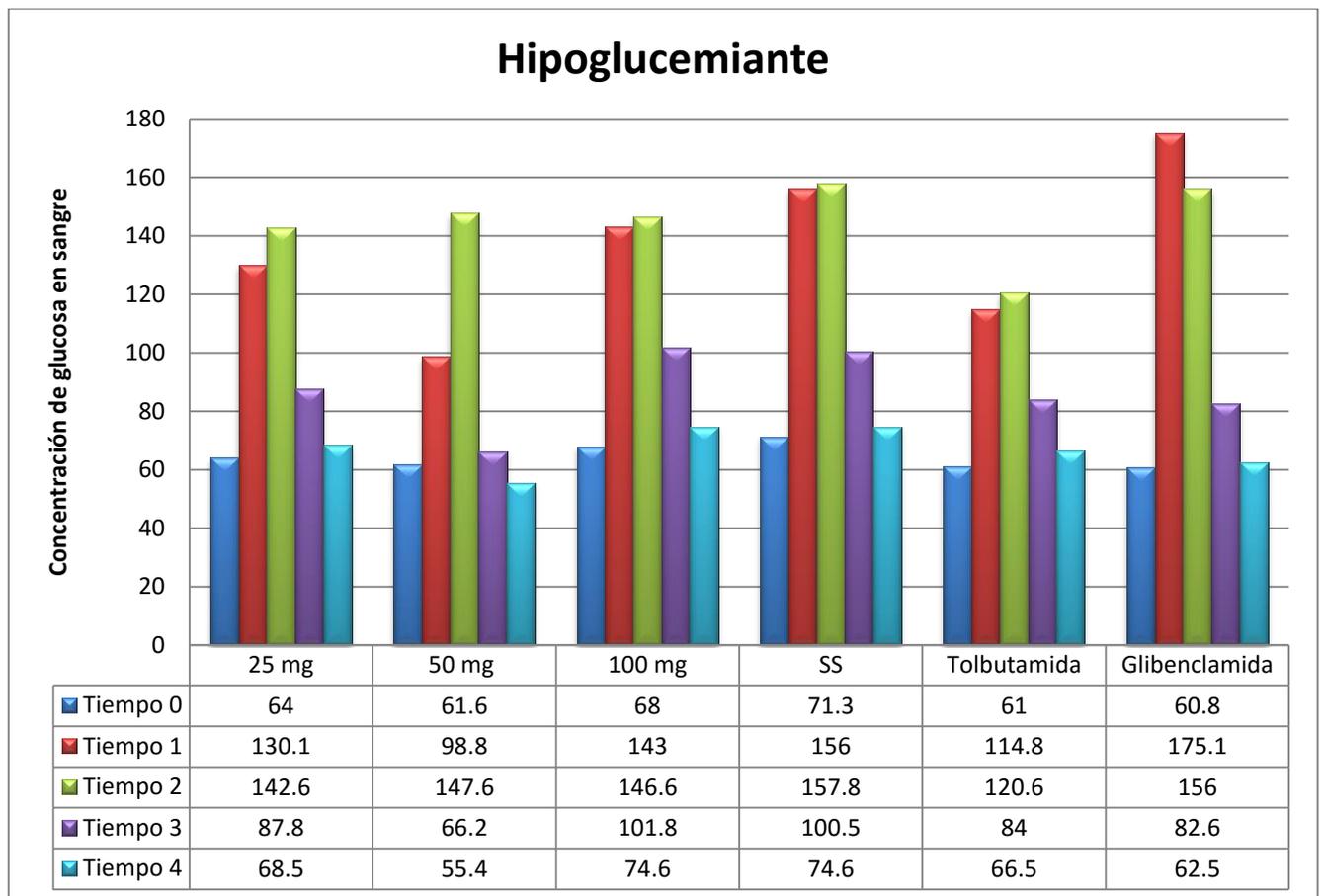
**Figura 11. Escherichia coli.**



**Figura 12. Candida albicans.**

Figura 10, 11 y 12. Cajas Petri método micro-pozos en agar, donde no se observa inhibición en los grupos experimentales, salvo el control positivo el cual fue tratado con un antibiótico y antimicótico correspondiente a la cepa sembrada.

### 10.3.-Efecto hipoglucemiante



**Grafica 4. Comparación de medias de todos los tratamientos y tiempos del ensayo donde estadísticamente la concentración de 50 mg es un resultado significativo ya que permanece en niveles bajos en la mayoría de los tiempos medidos.**

### **10.3.1.-Ensayo de toxicidad**

El análisis estadístico arrojó que no hay diferencia significativa en el peso relativo de cada órgano de cada ratón por grupo.

## **11.-Análisis de resultados**

### **11.1.- Efecto cicatrizante**

Estadísticamente el porcentaje de cicatrización es significativamente diferente en comparación con el grupo vaselina y Madecassol (Tabla 1) ya que en el grupo extracto hay datos donde la cicatrización al día 15 es total es decir del 100% esto es apreciable en la comparación de medias (Grafica 1).

Estadísticamente los resultados de hidroxiprolina no son significativos a una  $P=0.05$  (Tabla 2), pero al tener una media más alta que los demás grupos (Grafica 2) se puede decir que existe una mayor cantidad de hidroxiprolina en el grupo de extracto, la cual es un ingrediente fundamental en la síntesis de colágeno, la hidroxiprolina se ha descrito como factor de reparación de la epidermis, en particular como agente cicatrizante lo que indica una mayor calidad de cicatrización (Zhang, 2009).

Los resultados de nitritos arrojaron que no hay una evidencia significativa a una  $P=0.05$  (Tabla 3), pero la comparación de medias (Grafica 3) sugiere que el grupo extracto a diferencia de los otros dos por tener una media menor indica que no hay inflamación presente en ese grupo (Clancy, 1998).

### **11.2.-Efecto antimicrobiano**

En las cajas no se observó inhibición a ninguna concentración, tanto para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* entonces el extracto de *C. pycnantha* no tiene un efecto sobre las bacterias Gram positivas, negativas y para hongos levaduriformes utilizadas en este ensayo. Esto posiblemente a que los ejemplares de *C. pycnantha* que se utilizaron son de cultivo y a diferencia de los ejemplares silvestres no tuvieron las condiciones necesarias para desarrollar los alcaloides que cumplen con la función antimicrobiana (Calzada-Flores, 2001)

### **11.3.- Efecto hipoglucemiante**

Estadísticamente el extracto de *C. pycnantha* a una concentración de 50 mg/kg demostró ser efectivo para reducir los niveles de glucosa en sangre como se observa en la Grafica 4 donde los niveles de glucosa en sangre no son tan cambiantes como en los demás grupos ya que tiene un efecto hipoglucemiante rápido y prolongado que en análisis de tukey lo agrupa junto con Tolbutamida y Glibenclamida que son medicamentos de acción rápida y de acción prolongada (Davis, 2001).

El análisis toxicológico arrojó que no hay evidencia de daños en los sujetos experimentales al ser tratados durante 15 días con dosis de acuerdo a su peso de extracto de *C. pycnantha*, aunque habría que hacer pruebas químicas para descartar daños más alojados.

## 12.-Conclusiones

El ensayo de efecto cicatrizante obtuvo resultados favorables, ya que se demostró que el extracto etanólico de *C. pycnantha* tiene niveles altos de hidroxiprolina lo cual promueve la síntesis de colágeno y así se logra un tiempo de curación más corto ya que al día 15 ya había ratones con la herida totalmente cerrada, además de la ausencia de inflamación debido a los niveles bajos en nitritos, así podríamos decir que el extracto obtenido en este ensayo potencialmente contiene tiramira y la metanefrina (Batis y Rojas, 2002) los cuales tienen funciones vasoactivas y simpaticomimético respectivamente.

El ensayo del efecto antimicrobiano, tuvo un resultado negativo muy probablemente por ser un ejemplar de cultivado, que no desarrollo los alcaloides necesarios a diferencia de los ejemplares silvestres, sin embargo no se descarta su potencial debido a la variedad de formas y mecanismos de los microorganismos.

El ensayo mostro que el extracto de *C. pycnantha* tiene efecto hipoglucemiante a una concentración de 50 mg/kg y que es estadísticamente significativo, tiene un efecto rápido y prolongado como los fármacos usados como control positivo y el análisis toxicológico no mostro ningún efecto negativo al tratar a los ratones con el extracto de *C. pycnantha*.

### 13.-Referencias citadas

1. Alarcón, F.; Román, R. y Flores, J. 1993. Plantas medicinales usadas en el control de la diabetes mellitus. *Ciencia*. 44(3): 363-381. Consultada en: Ibarra, M.; Cantu, P.; Verde, M. y Oranday, A. 2009. Caracterización Fitoquímica y Efecto Hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su Relación con la Presencia del Cromo como Factor de Tolerancia a la Glucosa. *Información Tecnológica*. 20(5): 55-64.
2. Albuquerque, P.; Da Rocha T.; Fernandes, A.; De Araújo, J.; Leite, I. y De Assi, M. 2014. Evaluación del extracto de la *Zeyheria tuberculosa* en la perspectiva de un producto para cicatrización de heridas. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 22(1):165-72
3. Alvarado, R.; Solera, F.; Vega–Baudrit, J. 2014. Síntesis Sonoquímica de Nanopartículas de Óxido de Cinc y de Plata Estabilizadas con Quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 15(2), 134-148
4. Arif , T.; Sharma, B.; Gahlaut, A.; Kumar, V. y Dabur, R. 2014. Anti- diabetic agents from medicinal plants: A review. *Chemical Biology LETTERS*. 1(1): 1-13.
5. Arias, S., Gama, S., Guzmán Cruz, L. 1997. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 14. Cactaceae A.L. Juss. Instituto de Biología UNAM. México.
6. Andrade, C. y Henrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 99(3): 325-348. Consultada en: Ibarra, M.; Cantu, P.; Verde, M. y Oranday, A. 2009. Caracterización Fitoquímica y Efecto Hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su Relación con la Presencia del Cromo como Factor de Tolerancia a la Glucosa. *Información Tecnológica*. 20(5): 55-64.
7. Batis, A. y Rojas, M. 2002. El peyote y otros cactus alucinógenos de México. *CONABIO. Biodiversitas*. México. 40:12-17.
8. Bravo, H., Bruhn, J., Agurell, S. 2006. Cactaceae alkaloids XVIII: Two new alkaloids from *Coryphantha calipensis*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 63. Issue 4. Pages 574–576.
9. Calzada-Flores, C.C., 2001. “Determinación de la actividad de la *Castela texana* (Torr & Gray) Rose en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento de *Entamoeba in vitro*”. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. México. 75 pp.
10. Campoverde, M. y Pomaquiza, G. 2014. Tesis: Determinación de la Actividad Antibacteriana de *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp* sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador.

11. Carrasco, J. 2012. Evaluación del efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Kalanchoe crenata* y el extracto acuoso *Kalanchoe crenata* en lesiones cutáneas en ratones. Tesis. Fes Zaragoza. México, D.F.
12. Castrillón, L.; Palma, A. y Padilla, C. 2005. Factores de virulencia en *Candida sp.* Revista Mexicana de Dermatología. 49:12-27
13. Clancy RM, AR Amin, SB Abramson. 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis Rheum 2, 1141-1151.
14. Davis Stephen N and Granner Daryl K. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In The pharmacological basis of therapeutics. Goodman & Gilman's. 2001. Tenth edition.
15. Devlin TM. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínica. 4ª ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
16. DICHT, R. F., A.D. Lüthy. 2003. *Coryphantha* Cacti of Mexico and Southern USA. Springer. Germany.
17. Esquivel-Gutiérrez, E.; Noriega-Cisneros, R.; Bello-González, M.; Saavedra-Molina, A. y Salgado-Garciglia, R. 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. Biológicas. 14(1): 45 – 52. México.
18. Fonnegra, R. y Jiménez, S. 2007. Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.
19. García, C.; Pérez, B.; Martínez, A. y Castro F. 2009. Uso de Plantas Medicinales y Suplementos Dietéticos para el Control Glucémico de la Diabetes. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas. 8(3): 229-239.
20. Garrido PA, Teijón JR, Blanco GD, et al. Fundamentos de bioquímica estructural. 2ª ed. Madrid: Tébar; 2006.
21. Hernandez, G.; Camacho, R.; Castro, J. y Gomez, C. 2008. Evaluacion del Efecto antihiper glucemico del Bagazo de Naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia) en Estudios in vitro. Revista Salud Pública y Nutrición. 2007(12): 722-729.
22. Kannan P, Ramadevi SR, Hopper W. Antibacterial activity of *Terminalia chebula* fruit extract. Afr J Microbiol Res . 2009;3:180–184.
23. Keely, K., Neal, J., McLaughlin, J. 2006. Cactus alkaloids XII:  $\beta$ -Phenethylamine alkaloids of the genus *Coryphanta*. Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 61. Issue 1. Pages 41–45.
24. Keller, W., McLaughlin, J., Brady, L. 2006. Cactus alkaloids XV:  $\beta$ -phenethylamine derivatives from *Coryphantha macromeris* var. *runyonii*. Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 62. Issue 3. Pages 408–411.
25. Kottakkal AVS. Indian Medicinal Plants. Kottakal: Orient Longman Ltd; 1995.

26. Kumar, M.; Shashi, A.; Jain, S. y Verma, A. 2014. Anti diabetic activity of plants with their phytoconstituents: A review. *Internacional Journal of Pharmacognosy*. 1(1): 9-22.
27. Latha, S.; Rajaram, K. y Suresh, K. 2014. Hepatoprotective and Antidiabetic Effect of Methanol Extract of *Caralluma fimbriata* in Streptozocin Induced Diabetic Albino Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(1): 665-668.
28. Luchas FV, Muñoz MV, Fornes PB. La cicatrización de las heridas. *Anedidic*. 2008;2(3):8-15.
29. Marroquín-Segura, R.; Flores, M.; García, M.; Mora, J.; Sánchez, J. y Aguilar, A. 2005. Efecto Antihiper glucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 36(3): 27-32.
30. Mensa J. Guía Terapéutica antimicrobiana. 20th edición. Molins del Rei, Barcelona, 2012.
31. Musmeci, R. y Lezcano, M. 2013. Acción antimicrobiana del gel de aloe vera sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. *Revista sobre Estudios e Investigaciones del Saber Académico* 7 (7): 23-27
32. Park, C. y Lee, J. 2013. Natural ingredients for diabetes which are approved by Korean FDA. *Biomedical Research*. 24(1): 164-169.
33. Prabhakar P.K., Doble M. (2008a) Mechanism of action of medicinal plants towards diabetes mellitus: A review, In: Govil J. N., Singh V. K., Bhardwaj R., editors. (eds). *Recent Progress in Medicinal Plants*, Vol. 22, Studium Press: LLC, USA
34. Ramachandra YL, Ravi Shankara BE, Sujana Ganapathy S, Sundar Rajan S. In-vitro antimicrobial activity of *Pistacia integerrima* leaf gall extracts. *Pharmacophore*. 2010;1:149–154.
35. Rehman, S.; Jafri, S.; Hassan, S.; Ahmed, I. y Naim, M. 2011. Study on Antidiabetic Effect of Aloe vera Extract on Alloxan Induced Diabetic Rats. *Libyan Agriculture Research Center Journal International*. 2(1): 29-32.
36. Ranieri, R. y Lloydia, L. 1976. Cactus alkaloids. XXIX. Isolation of beta-phenethylamines from *Coryphantha greenwoodii*. McLaughlin JL.
37. Rodríguez, R.; Morales, M.; Verde, M.; Oranday, A.; Rivas, C.; Núñez, M.; González, G. y Treviño, J. 2010. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41 (1): 55-59
38. Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana; 2008.

39. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2004. Principios y directrices de Addis Abeba para la utilización sostenible de la diversidad biológica, ISBN 92-9225-009-4
40. Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro. Diversidad y riqueza. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 390 p.
41. Sharma, B.; Siddiqui, S.; Ram, G.; Chaudhary, M. y Sharma, G. 2013. Hypoglycemic and Hepatoprotective Effects of Processed Aloe vera Gel in a Mice Model of Alloxan Induced Diabetes Mellitus. J Diabetes Metab. 4(9): 1-6.
42. Tamariz, J.; Lezameta, L.; Guerra, H. 2014. Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 31(1):69-77.
43. Terence A., Smith, Ashton, L. 1977, Phenethylamine and related compounds in plants Research Station. University of Bristol. England Phytochemistry. Volume 16. Issue 1. Pages 9-18.
44. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J Int Med Res. 2009;37(5):1528-1542.
45. Yeary R. y Keller, W. 1980. Catecholamine metabolism in a psychoactive cactus. ClinToxicol.
46. Zhang, M., W. Liu, et al. (2009). "Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*)." Food Chemistry **115**: 826-831.

## 14.-Anexo

Preparación de reactivos de cuantificación de hidroxiprolina

Buffer

1.- Disolver 120 g de acetato de sodio, 46 g de ácido cítrico, 12 mL de ácido acético y 34 g de hidróxido de sodio en agua destilada.

2.- Ajustar el pH a 6.5 y aforar a un litro de agua destilada.

Cloramina-T

Se prepara diariamente disolviendo 1.41g de cloramina-T en 20 mL de agua destilada, posteriormente añadir 30 ml de metilcelosolve y 50 mL del buffer anterior.

Ácido perclórico 3.15M

Diluir 27ml de ácido perclórico al 70% en 100 ml de agua destilada.

27 ml ---- 100 ml agua

2.7 ml --- x= 10 ml

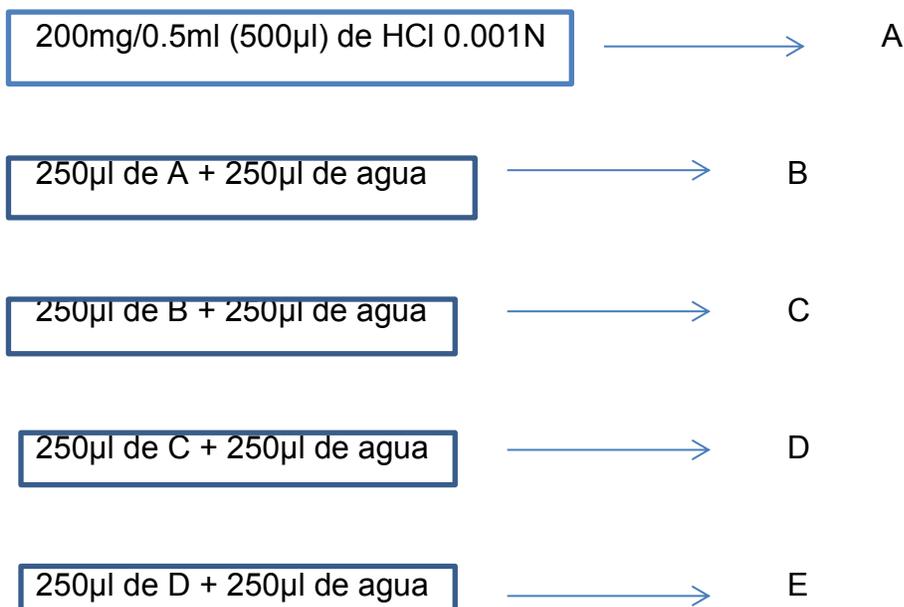
p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich)

Una solución al 20% se prepara poco antes del ensayo mediante la adición de 100ml de metilcelosolve a 20g de p-dimetilaminobenzaldehído. Si no se solubilizara fácilmente, se puede colocar en baño María a 60°C durante 1 o 2 minutos.

## Stock

1.- Pesar 0.2 g de Hyp STD y diluirla en 0.5 ml de HCL 0.001N. Si no se disolviera, se puede calentar en baño María a 60°C hasta que se disuelva.

A partir de aquí se realizan las diluciones, tomando como tubo A este primero, es decir:



2.- Tomar 50µl de cada dilución y pasarlo a nuevos tubos Eppendorf respectivamente.

3.- Adicionar 450µl de Cloramina-T a cada tubo y dejar oxidar por 20min a temperatura ambiente.

7.- Adicionar 450µl de ácido perclórico (3.15M) y dejar reposar durante 5min.

8.- Adicionar 500µl del reactivo de Ehrlich a cada tubo e incubar en baño María a 60°C por 25min.

9.- Enfriar las muestras en baño de agua fría.

10.- Centrifugar a 5000rpm durante 5 min.

11.- Leer la absorbancias a 557nm en microespectrofotometro.

## Solución Blanco

- 1.- Colocar 50µl de agua destilada en un tubo Eppendorf.
- 2.- Adicionar 450µl de Cloramina-T y dejar oxidar por 20min a temperatura ambiente.
- 7.- Adicionar 450µl de ácido perclórico (3.15M) y dejar reposar durante 5min.
- 8.- Adicionar 500µl del reactivo de Ehrlich a cada tubo e incubar en baño María a 60°C por 25min.
- 9.- Enfriar la muestra en baño de agua fría.
- 10.- Centrifugar a 5000rpm durante 5min.
- 11.- Leer la absorbancia a 557nm en microespectrofotometro.