

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGIA

**Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su
evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

Arturo Félix Hernández Díaz
Ingeniero Biotecnólogo

Dirigida por: Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo
Asesor Externo: Dr. Arturo Ortega Soto

México, D. F. Julio de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 16:00 horas del día 30 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de laUPIBI para examinar la tesis titulada:

"Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*"

Presentada por el alumno:

Hernández
Apellido paterno

Díaz
Apellido materno

Arturo Félix
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	9	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

Dr. Arturo Ortega Soto

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Dr. María del Carmen Oliver Salvador

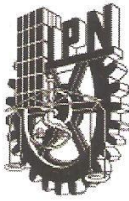
Dr. Jorge Yáñez Fernández



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 25 del mes de julio del año 2011, el que suscribe Arturo Félix Hernández Díaz alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091499, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de : la Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo y el Dr. Arturo Ortega Soto y cede los derechos del trabajo intitulado "Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: mgramirez@ipn.mx e ibt_artherdi@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Arturo Félix Hernández Díaz

DECLARACION DE ORIGINALIDAD

“Yo Arturo Félix Hernández Díaz declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



IBT Arturo Félix Hernández Díaz



Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) constituye uno de los problemas más importantes de salud pública en México y a nivel mundial; su tratamiento farmacológico se realiza con base en la administración de hipoglucemiantes orales y/o insulina. Estos medicamentos, a pesar de su amplio uso y efecto benéfico, no han sido suficientes para lograr un control adecuado y no han podido evitar el desarrollo de las complicaciones agudas y crónicas características de la DM. Entre las alternativas existentes al alcance de la población para el control de la DM se encuentran las plantas medicinales, en México la población utiliza más de 250 plantas como auxiliares en el control de la DM, una de estas plantas es *Ibervillea sonorae* conocida popularmente como “guareque” o “wereke”.

En el presente trabajo se obtuvieron 4 extractos acuosos a partir de *Ibervillea sonorae*, las extracciones se realizaron por medio de 2 métodos (maceración e infusión) y la deshidratación de los extractos se llevo a cabo por 2 procesos, secado por aspersion y liofilización, se realizó el análisis fitoquímico de los cuatro extractos, se determinaron las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) del transporte de glucosa en un modelo *in vitro* (Células Gliales de Bergmann, BGC), así como el efecto del extracto en el transporte de glucosa en BGC. Por otro lado se determinó la dosis letal 50 (LD_{50}) de los extractos en modelo *in vivo*, ratones cepa CD-1 (*Mus musculus*) y el efecto hipoglucémico en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). Los metabolitos secundarios encontrados en los extractos nos indican un gran potencial de esta planta para fines medicinales, los compuestos activos presentes en los extractos tienen un bajo perfil toxicológico. Se caracterizó el transporte de glucosa basal en el modelo *in vitro* mostrando una $K_m \approx 5.828$ mM y una $V_{max} \approx 42.32$ mM.

El estudio del transporte de glucosa en resulta en el desarrollo de nuevas líneas de investigación y los desarrollos recientes pueden aportar conocimientos cruciales sobre el impacto funcional del metabolismo de la glucosa en el transporte y la utilización de las funciones neuronales o tal vez la función que desempeña este transporte en diversas enfermedades crónicas degenerativas como lo es la DM.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is one of the most important issues of public health in Mexico and globally; pharmacological treatment is based in the administration of oral hypoglycemic agents and/or Insulin. These medications, despite its widespread use and beneficial effects have not been sufficient to achieve adequate control could not prevent the development of acute and chronic complications of DM features. Among the alternatives available to the population for the control of DM are medicinal plants, Mexico's population has used more than 250 plants as auxiliaries in the control of the DM, one plant is *Ibervillea sonorae* popularly known as “guareque” or “wereke”.

In the present study were obtained 4 aqueous extracts from *Ibervillea sonorae*, extractions were performed using 2 methods (maceration and infusion) and dehydration of the extracts was carried out by 2 processes, spray drying and lyophilization, phytochemical analysis were performed of the four extracts and were determined kinetic constants (K_m and V_{max}) of glucose transport in an in vitro model (Bergmann glial cells, BGC) and the effect of the extract in glucose transport in BGC. Furthermore we determined the lethal dose 50 (LD_{50}) of the extracts in vivo model, mice strain CD-1 (*Mus musculus*) and the hypoglycemic effect in Wistar rats (*Ratus norvegicus*). Secondary metabolites found in extracts indicate a great potential of this plant for medicinal purposes, the active compounds present in the extracts have a low toxicity profile. The basal glucose transport in vitro model showing a $K_m \approx 5.828$ mM and $V_{max} \approx 42.32$ mM.

The study of glucose transport in the brain results in the development of new research and recent developments can provide crucial insight into the functional impact of glucose metabolism in the transport and use of neural functions or maybe the function this transport plays in several chronic degenerative diseases such as DM.

DEDICATORIA

A mi familia nuclear, padres, hermanos y sobrinos por todo el amor y el apoyo que siempre me han brindado, hoy se que siempre estarán conmigo, a pesar de que los momentos difíciles nos hemos mantenido unidos, esta meta es por y para ustedes, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero dar las gracias a Dios por permitir que siga viviendo y cumpla una más de mis metas profesionales, la fuerza que me das día con día es la única que me ha dado la oportunidad de culminar este trabajo, gracias por tanto amor sin merecerlo.

Nuevamente le agradezco a mis padres y hermanos por todo el apoyo que me han brindado y porque siempre se han encargado de impulsarme en la búsqueda de mis metas, no sin dejar de mencionar a nuestro angel que nos cuida y que se que es feliz de ver que cumplimos nuestras metas y aun mas de vernos unidos.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. María Guadalupe por sus consejos, paciencia y tolerancia en la realización de este trabajo, porque más que una asesora la he llegado a apreciar como una consejera en todos los aspectos, gracias en verdad por impulsarme en momentos difíciles.

Al Dr. Arturo Ortega que me brindo el espacio para poder realizar parte de esta investigación, además de su flexibilidad en los tiempos y mucha paciencia.

A todos y cada uno de los miembros del laboratorio 23 del departamento de Genética y Biología molecular del CINVESTAV, gracias por las explicaciones y la tolerancia, en verdad que guardo recuerdos buenos con ustedes.

Al Instituto Politécnico Nacional y en especial a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

A todos mis amigos y compañeros de maestría que compartieron momentos más buenos que malos, disculpen la lata que les doy, los aprecio a todos.

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer, algunas se encuentran aún conmigo, otras solo en mis recuerdos, pero de algún modo han tenido que ver para que hoy sea una mejor persona, de cualquier forma mil gracias.

El trabajo de investigación intitulado “**Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*”** se realizó en el laboratorio de Bioprocesos de la Planta Piloto de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional así como también en el laboratorio N° 23 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo y el Dr. Arturo Ortega Soto, con el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI).

ÍNDICE GENERAL

DECLARACION DE ORIGINALIDAD	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GENERAL	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
ABREVIATURAS	xv
1. Introducción	1
1.1. Glucosa y su transporte	1
1.2. Definición de la diabetes mellitus (DM)	5
1.3. Importancia, síntomas y complicaciones de la DM	6
1.4. Clasificación de la DM	8
1.5. DM en el Sistema Nervioso Central	9
1.6. Células gliales	10
1.7. Tratamientos actuales de la DM	11
1.7.1. Insulina	12
1.7.2. Sulfonilureas	13
1.7.3. Meglitinidas	14
1.7.4. Biguanidas	15
1.7.5. Tiazolidinedionas	15
1.7.6. Inhibidores de la alfa-glucosidasa	16
1.8. Alternativas en el control de la DM	17
1.9. Plantas medicinales y DM	17
1.10. Generalidades de <i>Ibervillea sonora</i>	18
2. ANTECEDENTES	19
3. JUSTIFICACIÓN	22

3.1. Justificación del modelo	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Protocolo experimental	24
5.2. Material biológico	24
5.3. Extractos	25
5.3.1. Extracción por maceración e infusión	25
5.3.2. Deshidratación (Secado por aspersion y liofilización)	25
5.4. Análisis fitoquímico de los extractos	26
5.4.1. Alcaloides	27
5.4.2. Azúcares reductores	27
5.4.3. Cumarinas	27
5.4.4. Flavonoides	27
5.4.5. Glicósidos cianogénicos	27
5.4.6. Quinonas	28
5.4.7. Saponinas	28
5.4.8. Sesquiterpenlactonas	28
5.4.9. Taninos	28
5.5. Experimentos en modelo <i>in vivo</i>	29
5.5.3. Animales de experimentación	29
5.5.4. Dosis Letal 50 (LD ₅₀)	29
5.5.5. Efecto hipoglucémico	30
5.6. Experimentos en modelo <i>in vitro</i>	30
5.6.3. Cultivo celular	30
5.6.4. Caracterización del transporte de glucosa basal	31
5.6.5. Efecto de los extractos en la captura de glucosa en BGC	31
5.7. Análisis Estadístico	32

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Obtención del extracto y rendimientos	33
6.2. Análisis Fitoquímico	35
6.3. Experimentos en modelo <i>in vivo</i>	36
6.3.1. LD ₅₀	36
6.3.1.1. Infusión secado por aspersión (ISPA)	37
6.3.1.2. Infusión Liofilizado (IL)	38
6.3.1.3. Maceración secado por aspersión (MSPA)	38
6.3.1.4. Maceración Liofilizado (ML)	39
6.3.2. Efecto hipoglucémico	40
6.4. Experimentos en modelo <i>in vitro</i>	44
6.4.1. Caracterización del transporte de glucosa basal	44
6.4.2. Efecto de los extractos en la captura de glucosa en BGC	46
6.4.2.1. Efecto del extracto MSPA en la captura de glucosa de BGC	47
6.4.2.2. Efecto del extracto ISPA en la captura de glucosa de BGC	48
6.4.2.3. Efecto del extracto ML en la captura de glucosa de BGC	49
6.4.2.4. Efecto del extracto IL en la captura de glucosa de BGC	50
7. CONCLUSIONES	53
8. PERSPECTIVAS	55
9. REFERENCIAS	56
10. ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proyecciones mundiales de las personas con diabetes	7
Figura 2. Imagen de <i>Ibervillea sonorae</i>	18
Figura 3. Diagrama de bloques del protocolo experimental	24
Figura 4. Equipo BÜCHI Mini spray dryer B-290	25
Figura 5. Equipo Free Zone 6 Liter Console Freeze Dry Systems	26
Figura 6. Animales de experimentación	29
Figura 7. Cinética de Glucemia	43
Figura 8. Diagrama de velocidad de reacción y constante de Michaelis-Menten	44
Figura 9. Regresión no lineal para obtener constantes del transporte de glucosa basal	46
Figura 10. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto MSPA	47
Figura 11. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto ISPA	48
Figura 12. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto ML	49
Figura 13. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto IL	50
Figura 14. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con los diferentes extractos a la mayor concentración que presentaron la mayor captura los diferentes extractos	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales causas de mortalidad general en México, 2008	6
Cuadro 2. Formas de Insulina disponibles	13
Cuadro 3. Pruebas realizadas en el análisis fitoquímico.	26
Cuadro 4. Denominación de los extractos obtenidos y rendimiento	33
Cuadro 5. Densidades compactas de los extractos obtenidos	34
Cuadro 6. Resultados de análisis fitoquímico preliminar	35
Cuadro 7. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto ISPA	37
Cuadro 8. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto IL	38
Cuadro 9. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto MSPA	38
Cuadro 10. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto ML	39
Cuadro 11. LD₅₀ obtenidas mediante análisis PROBIT para cada uno de los extractos.	39
Cuadro 12. Clasificación de Tóxicos CYTED	40
Cuadro 13. Glucemia presentada por las ratas al ser administradas vía IP	41
Cuadro 14. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto MSPA	47
Cuadro 15. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto ISPA	48
Cuadro 16. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto ML	49
Cuadro 17. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto IL	50
Cuadro 18. Porcentajes de captura de glucosa en BGC al ser estimulados con los diferentes extractos a la mayor concentración que presentaron la mayor captura sobre el control	51

ABREVIATURAS

dl	Decilitro
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DPP-4	Dipeptidil Peptidasa IV
GLUT	Transportadores de glucose
GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
IL	Infusión Liofilizado
IP	Intraperitoneal
ISPA	Infusión Secado por Aspersión
kDa	Kilodaltones
Km	Constante de Michaelis-Menten
LD₅₀	Dosis Letal 50
mCi	Milicuries
ML	Maceración Liofilizado
MSPA	Maceración Secado por Aspersión
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa
NED	Desviación Estandar Normal
SGLT	Transportadores de Glucosa dependientes de Sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución Salina Isotónica
V_{max}	Velocidad Máxima
³H	Tritio

1. Introducción

1.1. Glucosa y su transporte

La glucosa es una fuente de energía y es un importante sustrato para la síntesis de proteínas y lípidos en células mamíferas. Proporciona energía bajo la forma de ATP a través de la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico, y la energía de reducción bajo la forma de NADPH. Es también utilizada en la síntesis del glicerol y proporciona los intermedios para la síntesis de aminoácidos no esenciales. La membrana plasmática de todas las células mamíferas posee uno o más sistemas de transporte para permitir el movimiento de la glucosa en o las células. Este transporte lo realizan dos grupos de proteínas: los transportadores SGLT (sodium-glucose transporters) y los transportadores GLUT (glucose transporters). Los transportadores GLUT están encargados del ingreso de los monosacáridos a todas las células del organismo (Sokoloff, 1973).

La familia de proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT) es responsable de la entrada de glucosa a las células a lo largo de la periferia y el cerebro (Maher et al., 1994; Vannucci et al., 1997). La expresión, regulación y actividad de los transportadores de glucosa juega un papel esencial en la homeostasis neuronal, ya que la glucosa representa la fuente primaria de energía para el cerebro (Lund-Anderen, 1979; Pardridge, 1983). Si bien muchas isoformas de GLUT se han identificado y caracterizado, una minoría de estos transportadores se expresa en el sistema nervioso central (SNC). Debido a el estudio de la familia GLUT se han añadido a varios miembros nuevos que se están investigando enérgicamente, algunos de los cuales se expresan en el SNC.

Dado que algunos GLUTs fueron aislados y caracterizados por varios equipos de investigación diferentes, ha habido cierta confusión con respecto a la nomenclatura del transportador. La nomenclatura de la familia GLUT se ha aclarado y arreglado en tres clases diferentes en base a su similitud de secuencias (Joost et al., 2002).

Los GLUTs cerebrales están representados en la categoría I (GLUTs 1-4) y Clase II (GLUT5). Las isoformas de GLUT se agrupan en la clase III y tres de estas isoformas se expresan en el cerebro, GLUT6, GLUT8 y GLUT10. Los GLUTs cerebrales presentan mismo tipo celular y localizaciones en regiones específicas que sugieren que el transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica está estrechamente regulado y compartimentado. Por ejemplo, algunas isoformas de GLUT se expresan ampliamente en el SNC (las isoformas de 45 y 55 kDa GLUT1; GLUT3) y parecen ser responsables de la mayoría de la captación de glucosa y su utilización en el cerebro (Duelli y Kuschinsky, 2001). Se han identificado trece de ellos, enumerados desde GLUT 1 hasta GLUT 13. Los GLUT presentan una conformación proteica similar; son glicoproteínas de 45 a 55 kDa.

El GLUT 1 es una proteína de 664 aminoácidos, codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 22. Tiene una Km para la glucosa de 1,6 mM y transporta, además, galactosa. Se expresa en los eritrocitos, los astrocitos, las células endoteliales, las células de la retina y las barreras hematoencefálica y placentaria. Durante el desarrollo fetal hay expresión de GLUT 1 en los estadios de oocito y blastocisto y luego en los diferentes tejidos fetales. La expresión en el músculo esquelético depende, al parecer, del estado de desarrollo; su mayor expresión se encuentra durante la gestación y disminuye luego del nacimiento. Se expresa en muy poca cantidad en el músculo del adulto (Ibberson et al., 2000). En el riñón se ha encontrado en prácticamente todos los segmentos de la nefrona. En la membrana basolateral de las células ubicadas en la porción contorneada y recta de la nefrona proximal, se asocia con el proceso de reabsorción de la glucosa; en el resto de la nefrona se asocia con el aporte nutritivo a la célula (Moe et al., 2004).

El GLUT 2 es una proteína de 522 aminoácidos, codificada por un gen ubicado en el cromosoma 3. A diferencia de los otros GLUT su afinidad por la glucosa es baja (Km=17 mM). Transporta además galactosa y fructosa. Se expresa en células β pancreáticas, en hepatocitos, en enterocitos y en células tubulares renales. En células β pancreáticas y en hepatocitos facilita el ingreso de la glucosa como respuesta al incremento de la glicemia (Guerre-Millo, 1995). Debido a su elevado valor de Km, funciona en condiciones cinéticas

de primer orden; esto quiere decir que es muy sensible a los cambios de glicemia e incrementa su actividad cuando se aumenta la glucosa en la sangre. Las características mencionadas permiten que la entrada de glucosa sea el primer paso en el estímulo para la secreción de insulina en las células β del páncreas y en el proceso de glucogenogénesis en el hígado. En el enterocito se localiza tanto en la membrana luminal como en la basolateral; en la membrana luminal es el responsable de la absorción intestinal de glucosa por difusión facilitada (Kellet y Helliwell, 2000); en la membrana basolateral permite el paso de glucosa al espacio extracelular. En el riñón se localiza en la membrana vasolateral del túbulo proximal, donde también permite el paso de glucosa al espacio extracelular.

El GLUT 3 es una proteína de 596 aminoácidos, codificada por un gen localizado en el cromosoma 12, con una K_m para la glucosa de 2 mM; transporta además galactosa. Se ha localizado en los humanos, preferentemente en neuronas del sistema nervioso central; también está presente en la placenta, el hígado, el riñón y el corazón (Guerre-Millo, 1995). En el tejido muscular humano su expresión comienza a las 18 semanas de gestación y desaparece luego del nacimiento (Gaster et al., 2000). En el tejido cerebral funciona en secuencia con el GLUT 1 (ubicado en la barrera hematoencefálica), lo que permite un transporte de glucosa en forma vectorial desde la sangre hasta la neurona (Guerre-Millo, 1995).

El GLUT 4 es una proteína de 509 aminoácidos, codificada por un gen ubicado en el cromosoma 17. Tiene una K_m para la glucosa de 5 mM. Se expresa en los tejidos donde el transporte de glucosa es dependiente de insulina: el músculo (cardíaco y esquelético) y el tejido adiposo. En ausencia de un estímulo apropiado, la mayor parte del GLUT 4 (aproximadamente el 90%) permanece almacenado en vesículas intracelulares, localizadas en el citoplasma. Estas vesículas, en donde reside el transportador, constituyen un compartimiento altamente especializado, cuyo tráfico y contenido sólo se conocen parcialmente; se sabe que en las vesículas, junto al GLUT 4, se localizan otras proteínas, que translocan juntamente con el transportador a la membrana citoplasmática, con la que finalmente se fusionan (Mastick et al., 1994); uno de los principales componentes de las

vesículas es una aminopeptidasa de función desconocida, también se ha descrito la sinaptobrevina (proteína asociada a vesículas) y una proteína unión a GTP. Las vesículas están sometidas a un ciclo continuo de exocitosis-endocitosis. La presencia de insulina, la contracción muscular, la estimulación eléctrica y la hipoxia son estímulos que activan la exocitosis (Zhao et al., 1993).

El transportador GLUT 5 es una proteína de 501 aminoácidos, codificada por un gen localizado en el cromosoma 1; prácticamente es un transportador de fructosa, ya que su afinidad por otros monosacáridos, incluyendo la glucosa, es mínima. Se localiza en el yeyuno, los espermatozoides, las células tubulares renales y las células de la microglia (Guerre-Millo, 1995).

El GLUT 6 era el nombre que se le daba previamente a un supuesto producto que se encontró por análisis de secuencias; posteriormente se demostró que correspondía a un pseudogén. El que antes se llamaba GLUT 9 se llama actualmente GLUT 6; es una proteína de 507 aminoácidos que se expresa en cerebro, bazo y leucocitos (Doege et al., 2001).

El GLUT 7 originalmente fue descrito como un transportador del retículo endoplásmico de tejidos gluconeogénicos (Waddell et al., 1992).

El GLUT 8 es una proteína de 477 aminoácidos que posee un 30% de homología con el GLUT 1 y se expresa en testículos y placenta (Ibersson et al., 2000).

El actual GLUT 9 es una proteína de 540 aminoácidos cuyo gen está ubicado en el cromosoma 4, tiene una homología del 44% con el GLUT 5 y del 38% con el GLUT 1. Se expresa principalmente en riñón e hígado y en menor concentración en bazo, leucocitos, cerebro y corazón (Phay et al., 2000).

EL GLUT 10 tiene 541 aminoácidos, es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 20, con un 35% de homología con los GLUT 3 y 8. El gen del GLUT 10 se ha

relacionado con susceptibilidad a diabetes mellitus no insulino dependiente. El GLUT 10 se expresa principalmente en hígado y páncreas (Mcvie-Wiley et al., 2001).

El GLUT 11 es una proteína de 496 aminoácidos, codificada por un gen ubicado en el cromosoma 22; tiene una homología de 41% con el transportador de fructosa GLUT 5. Se expresa en corazón y músculo esquelético (Doege et al., 2001).

El GLUT 12 es una proteína de 617 aminoácidos. Se expresa en músculo esquelético, tejido adiposo e intestino delgado. Se considera un segundo sistema de transporte de glucosa dependiente de insulina. Se ha demostrado que el transportador tiene una localización perinuclear en ausencia de insulina (Uldry et al., 2001).

El último de los GLUT descrito es el GLUT 13 que es el mismo transportador de mioinositol; tiene 629 aminoácidos; presenta una homología de secuencia de 36% con el GLUT 8. Se expresa principalmente en el cerebro (Rogers et al., 2002).

La deficiencia en alguno de estos transportadores puede acarrear como consecuencia diferentes enfermedades, una nueva relación entre la insulina, la utilización de glucosa y los GLUTs se desarrolla, basada en estudios experimentales. De hecho, numerosos estudios han demostrado una correlación positiva entre la expresión de GLUT y la utilización de la glucosa cerebral (Duelli y Kuschinsky, 2001;. Vannucci et al, 1997). Algunos investigadores han reportado que la expresión de GLUTs se incrementa en modelos experimentales de diabetes (Vannucci et al, 1997).

1.2. Definición de la diabetes mellitus (DM)

La DM se puede definir como un síndrome caracterizado por un estado de hiperglucemia crónica como consecuencia de una producción insuficiente de insulina, resistencia a esta hormona o ambas (ADA, 2005). Los mecanismos que dan lugar a la diabetes van desde la destrucción de las células beta por una respuesta autoinmunitaria

hasta situaciones en que se observa resistencia a la insulina. Aunque la hiperglucemia es el marcador bioquímico de la diabetes, el síndrome se caracteriza por profundas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Herman, 1999).

1.3. Importancia, síntomas y complicaciones de la DM

La DM constituye uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial. En México se registran anualmente más de 180 mil casos nuevos y causa alrededor de 75 mil defunciones (Cuadro 1), la DM es la principal causa de muerte desde el año 2000 (Secretaría de Salud, 2008).

Cuadro 1. Principales causas de mortalidad general en México, 2008.

Orden	Descripción	Defunciones	%
1	Diabetes mellitus	75 572	14.0
2	Enfermedades isquémicas del corazón	59 579	11.1
3	Enfermedad cerebrovascular	30 212	5.6
4	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	28 422	5.3
5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	20 565	3.8
6	Accidentes de vehículo de motor	16 882	3.1
7	Enfermedades hipertensivas	15 694	2.9
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	15 096	2.8
9	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	14 767	2.7
10	Agresiones (homicidios)	13 900	2.6

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008.

El incremento observado de la ocurrencia de diabetes en México probablemente refleja una mayor exposición a factores de riesgo relacionados con los estilos de vida, en particular alimentarias y falta de ejercicio, que favorecen un incremento en la masa corporal, en una población con predisposición genética.

En el año 2000 se calculó que el número de diabéticos en América era de 35 millones, cifra que se incrementará a 50 millones en el año 2025; 52% de los diabéticos en

el continente viven en América Latina y el Caribe y esa proporción se prevé crecerá a 62% en el año 2025 (Vázquez y col; 2006).

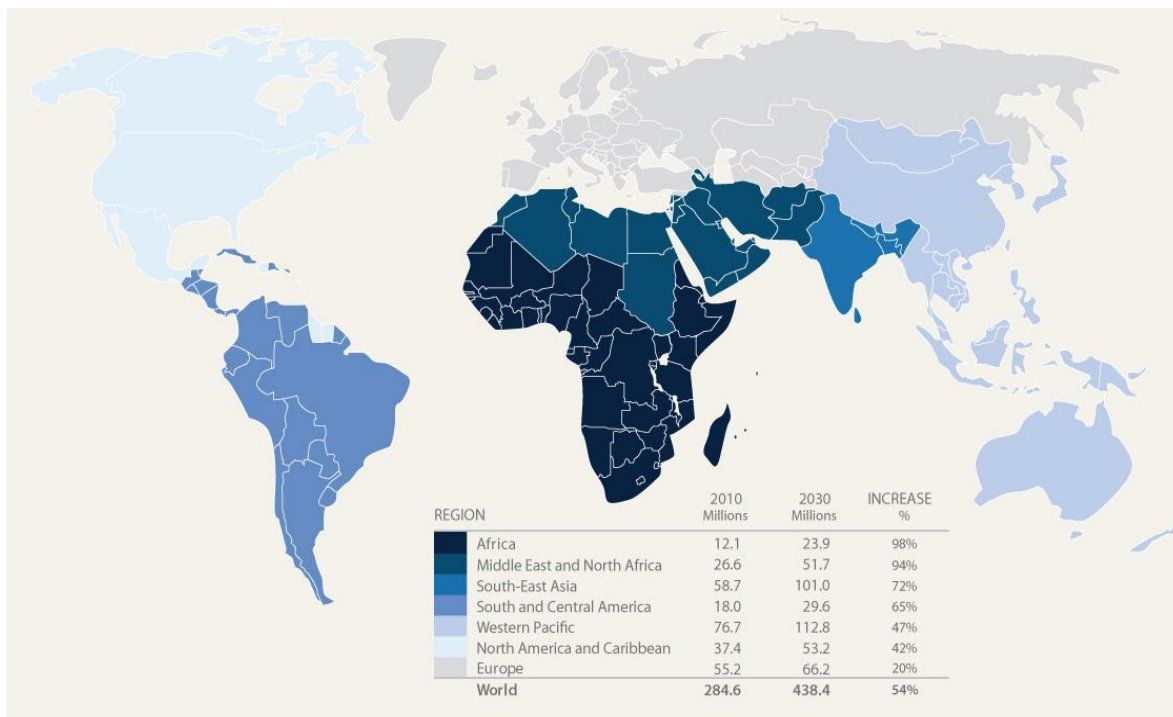


Figura 1. Proyecciones mundiales de las personas con diabetes (grupo de edad entre 20 y 79 años), 2010-2030 (millones). Tomado de International Diabetes Federation, 2010.

La hiperglucemia, poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso son síntomas característicos de la diabetes mal controlada, y en muchas ocasiones también hay visión borrosa. Las complicaciones crónicas de la enfermedad son consecuencia del metabolismo anormal, tanto de la glucosa como de las proteínas y los lípidos. Las complicaciones de la diabetes a largo plazo son: retinopatía con pérdida potencial de la visión, nefropatía que conduce a insuficiencia renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies y amputaciones. Además, se pueden presentar alteraciones a nivel gastrointestinal, genitourinario, cardiovascular y disfunción sexual. La posibilidad de sufrir infarto de miocardio, accidente vascular cerebral e insuficiencia renal es dos veces superior que en la población de características similares sin diabetes y el riesgo de sufrir una amputación es 10 veces mayor (Alpízar, 1999).

1.4. Clasificación de la DM

La gran mayoría de los casos de diabetes caen en dos grandes categorías:

En una categoría, la diabetes tipo 1, es una enfermedad autoinmune en la cual se pierden las células β del páncreas. Típicamente presenta un brote sintomático abrupto y usualmente pero no siempre se presenta en niños y adultos jóvenes menores de 30 años. Sin embargo, cada día se le reconoce un mayor papel en las personas mayores de 30 años, encontrándose formas idiopáticas en personas mayores de 60 años.

Las personas en mayor riesgo de desarrollar este tipo de diabetes a menudo pueden ser identificados por pruebas serológicas de un proceso patológico autoinmune que ocurre en los islotes pancreáticos y por marcadores genéticos (ADA, 2005).

En la otra categoría y mucho más frecuente, la diabetes tipo 2, la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una respuesta inadecuada de secreción de insulina compensatoria. En esta última categoría, existe un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en diferentes tejidos, pero sin síntomas clínicos, pueden estar presentes por un largo período de tiempo antes de que la diabetes se detecte.

Durante este período asintomático, es posible demostrar una anomalía en el metabolismo de los hidratos de carbono mediante la medición de la glucosa plasmática en ayunas (ADA, 2005).

También se puede clasificar en otros tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, defectos genéticos en función de las células, los defectos genéticos en la acción de la insulina, las enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística), así como también la diabetes mellitus gestacional (DMG), diabetes diagnosticada durante el embarazo.

1.5. DM en el Sistema Nervioso Central

A pesar de la opinión tradicional de que el cerebro no se ve afectado por la insulina o su falta, la DM perturba el sistema nervioso central (SNC) y puede dañar el cerebro (Kumagai, 1999).

La diabetes aumenta el riesgo de accidente cerebrovascular y exacerba el daño por apoplejía y la mortalidad (Kuller, 1995). El accidente cerebrovascular es un daño agravado potencialmente, tanto a través de los efectos de la hiperglucemia y la falta de insulina en la bioquímica del cerebro en la presencia de isquemia. Los efectos secundarios del tratamiento de la diabetes, que es la hipoglucemia aguda puede afectar la función cerebral y cuando es grave y prolongada, puede dañar permanentemente el cerebro en gran medida a través de mecanismos excitotóxicos o causar la muerte. Diversas evidencias experimentales sugieren que la muerte excitotóxica es un evento común que se presenta en algunos desórdenes neurológicos como la isquemia cerebral, la hipoglicemia y la epilepsia, y en algunas enfermedades neurodegenerativas como la de Huntington, Alzheimer y la de Parkinson.

La hiperglucemia en sí, aun cuando es relativamente corta, es un importante factor de riesgo para la ocurrencia de accidente cerebrovascular, niveles elevados de glucosa en sangre en periodos de tiempo cortos han demostrado ser predictores de accidente cerebrovascular.

Las interacciones entre neuronas y glía de bergmann son necesarias para mantener la homeostasis en el cerebro ya que existe una estrecha relación entre ambos tipos de células. La sobrevivencia y muerte celular que se presenta en algunas enfermedades neurodegenerativas o durante la isquemia cerebral podría estar vinculada no sólo a las características particulares de cada tipo celular, sino también a la interacción física, metabólica y fisiológica que existe entre estas células.

1.6. Células gliales

El cerebro de los mamíferos está constituido principalmente por dos clases de células: las neuronas y las células gliales. Se estima que el cerebro humano contiene más de 100 mil millones de neuronas mientras que el número de células gliales supera entre 5 y 10 veces a la población neuronal (Kandel et al., 2000).

Las neuronas son células altamente especializadas y morfológicamente pueden ser divididas en cuatro regiones: el cuerpo celular o soma que es el centro metabólico de la célula; las dendritas, estructuras ramificadas que reciben señales de otras células; el axón, que se extiende a partir del soma de la célula nerviosa y que conduce la información a otras neuronas, por último las terminales presinápticas que constituyen la región de la neurona que permite la comunicación con otras neuronas a través de estructuras especializadas llamadas sinapsis (Doege et al., 2001).

Las células gliales a su vez se clasifican principalmente en tres categorías:

- a) Los oligodendrocitos y las células de Schwann que forman la mielina, una membrana que sirve de barrera de aislamiento y que se encuentra involucrada en la conducción del impulso nervioso del sistema nervioso central y periférico, respectivamente.
- b) La microglia, formada por células que responden a un daño o enfermedad en el cerebro, activando una respuesta inflamatoria y fagocitando las bridas celulares o detritus.
- c) Los astrocitos que se caracterizan por tener una forma estrellada están estrechamente vinculados con las neuronas en procesos como: la recaptura de neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica, la transferencia de sustratos metabólicos y la liberación de factores tróficos que promueven el crecimiento, maduración y reparación de las células nerviosas.

Durante mucho tiempo se pensó que el papel de las células gliales estaba limitado al mantenimiento de la citoarquitectura del cerebro. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que las células gliales establecen una estrecha relación con las neuronas a través de sistemas denominados neurogliales, que se encargan de mantener la homeostasis cerebral. Diversos reportes sugieren que las células gliales pueden tener otras funciones además de las ya mencionadas como son: la regulación de la excitabilidad neuronal, el control de la microcirculación cerebral y la reconstitución de los contactos sinápticos, lo que hace que la comunicación entre las células gliales y las neuronas sea esencial para el funcionamiento del cerebro (Fields and Stevens-Graham, 2002; Auld and Robitaille, 2003; Newman, 2003; Zonta et al., 2003).

Existe una estrecha relación entre las células gliales y las neuronas, debido al soporte nutricional que mantienen las primeras, por esto es importante estudiar el comportamiento presente en la diabetes mellitus, así como también tomar en cuenta los tratamientos que se utilizan y de qué forma pudieran actuar a un nivel de SNC.

1.7. Tratamientos actuales de la DM

En vista de que las metas de tratamiento de la DM tipo 1 y 2 son cada vez más estrictas, el evento adverso más frecuente de estas intervenciones es la hipoglucemia. Es por lo anterior que el conocimiento detallado de los mecanismos fisiopatológicos, de la presentación clínica y del tratamiento de la hipoglucemia que ocurre en el contexto del uso de agentes antidiabéticos e hipoglucemiantes es de vital importancia para la práctica clínica cotidiana (Escorcía, 2009). Los fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, algunos productos herbales y algunas enfermedades pueden causar hipoglucemia.

Los fármacos usados en el tratamiento de la diabetes mellitus incluyen a la insulina y a los medicamentos orales. Los agentes orales antidiabéticos se dividen en dos grupos: por un lado, los hipoglucemiantes como las sulfonilureas, y las meglitinidas y por otro, los

antihiperglucemiantes como las biguanidas, los inhibidores de la glucosidasa, la exenatida, los inhibidores de la dipeptil-peptidasa-4 (DPP-4) y las glitazonas (Reith et al., 1996).

A pesar de su amplio uso y efecto benéfico en el control de los pacientes diabéticos, estos medicamentos no han sido suficientes para lograr un control adecuado de la DM y no han podido evitar el desarrollo de las complicaciones agudas y crónicas características de la misma.

Estos medicamentos tienen el potencial de causar varios efectos tóxicos específicos además de la hipoglucemia, como son diarrea, reacciones alérgicas, ataques al corazón y otros problemas cardíacos, ataques o "derrames" cerebrales, problemas en los riñones, daño a los nervios, problemas digestivos, problemas en los ojos, problemas en los dientes y las encías, entre otros.

1.7.1. Insulina

La concentración de la glucosa tiene un papel principal en la regulación de la liberación de insulina. La insulina se une a un receptor específico tipo protein-cinasa en la superficie celular, particularmente en el hígado, músculo y tejido adiposo.

La insulina se sintetiza *in vivo* en las células beta del páncreas como una pro-hormona que al ser fragmentada resulta en el péptido C y la insulina misma. Los sitios principales de degradación de la insulina son el hígado (70%) y los riñones (10-40%) (Reith et al., 1996).

Después de la administración intravenosa o subcutánea de insulina, la vida media será dependiente de la dosis y del tipo de insulina. Las insulinas pueden clasificarse en 3 tipos (Cuadro 2), de acción rápida, intermedia y prolongada, su principal desventaja es que son de un costo elevado.

Cuadro 2. Formas de Insulina Disponibles

Tipo de Insulina	Inicio de acción (h)	Pico de acción (h)	Duración (h)
Lispro, Aspart	Inmediata	1	4-5
Regular	0.5-1.0	2-3	3-6
NPH	2-4	4-10	10-16
Detemir	3-4	6-8	5.7-23.2
Lenta	3-4	4-12	12-18
Glargina	3-4	No pico	35
Ultralenta	6-10	8-16	20-30

Fuente: Escorcía, 2009.

1.7.2. Sulfonilureas

Las sulfonilureas se unen a los receptores de alta afinidad en las membranas de las células beta pancreática, resultando el cierre de los canales de potasio sensibles al trifosfato de adenosina. Esto causa la despolarización de la membrana, entrada de calcio a la célula y activación de la maquinaria secretora independiente de la concentración de glucosa (Ashcroft, 2000).

Las sulfonilureas representan más de la mitad de todos los fármacos orales prescritos para diabetes (Inzucchi, 2002). Las sulfonilureas de primera generación, como la clorpropamida y tolbutamida son usadas cada vez con menos frecuencia, debido a que dependen casi totalmente de la eliminación renal y/o por su vida media elevada.

Las sulfonilureas de segunda generación son eliminadas por varias rutas, aunque típicamente tienen vidas medias que se aproximan a las 24 horas. Los agentes de segunda generación (glibenclamida, glipizida y glicazida) están asociados con episodios frecuentes de hipoglucemia, cuyo comienzo puede ser temprano o tardío (12 a 16 horas después de la sobredosis). Ciertas sulfonilureas están actualmente disponibles en formulaciones de liberación sostenida que resultan en cinéticas de efecto clínico y sobredosis aún más impredecibles.

Se ha sugerido que la acumulación progresiva de glibenclamida puede explicar la estimulación prolongada de la secreción de insulina en algunos pacientes aun después del retiro del fármaco, contribuyendo a la hipoglucemia sostenida por sulfonilureas (Lehtihet et al., 2003).

Los factores de riesgo relacionados a hipoglucemia por sulfonilureas son principalmente: edad adulta, la reducción de la ingesta, errores de prescripción, insuficiencia renal, sobredosis accidental o autoinfligida e interacción medicamentosa (Shorr et al., 1997).

1.7.3. Meglitinidas

La repaglinida y nateglinida son fármacos orales de comienzo rápido y vida media ultracorta, que son estructuralmente diferentes de las sulfonilureas, La repaglinida es una nueva forma de fármaco liberador de insulina derivado del ácido benzoico.

Su mecanismo de acción se cree involucrado en los canales de K-ATP sensibles en un sitio distinto al usado por las sulfonilureas (Reith et al., 1996). La actividad extrapancreática es también similar, demostrando reducciones en las concentraciones de insulina total, comparado con el uso de sulfonilureas.

La repaglinida es metabolizada en el hígado hacia metabolitos inactivos y eliminada principalmente por la bilis. La nateglinida produce un incremento postprandial de insulina y la duración de esta respuesta es más corta que con repaglinida, por lo tanto el riesgo de hipoglucemia postabsortiva es menor que con otra sulfonilurea o repaglinida (Levien et al., 2001).

1.7.4. Biguanidas

Las biguanidas incluyen a la fenformina y metformina, ambas son derivadas de la guanidina, el componente activo de la lila francesa (*Galega officinalis*). La fenformina fue discontinuada de los Estados Unidos en 1977 por la alta incidencia de acidosis láctica fatal y fue reemplazada por la metformina a mediados de los noventa para tratamiento de la diabetes tipo 2 (Reith et al., 1996). La metformina disminuye los niveles de glucosa por varios mecanismos, el más importante de los cuales parece relacionarse con la inhibición de la gluconeogénesis y además disminución subsecuente de la salida de glucosa hepática. Esto también aumenta la captación de glucosa sérica, disminuyendo la oxidación de ácidos grasos e incrementando el uso intestinal de glucosa.

En el músculo esquelético y en células adiposas la metformina aumenta la actividad y la translocación de transportadores de glucosa . A diferencia de las sulfonilureas, éstas no estimulan la secreción de insulina, por lo que es más apropiado denominarlas agentes sensibilizantes de la insulina o antidiabéticos. La metformina está también asociada con acidosis láctica que es fatal en cerca del 50% de los casos y ocurre en aproximadamente 3/100,000 pacientes al año (Crofford, 1995).

1.7.5. Tiazolidinedionas

Aunque la troglitazona fue retirada del mercado en el año 2000 debido a reportes de falla hepática y muerte, dos fármacos de esta clase están en uso: rosiglitazona y pioglitazona. Son estructuralmente similares a la troglitazona y tienen la ventaja de disminuir la hiperglucemia sin incrementar la secreción de insulina.

Estos agentes reducen la salida hepática de glucosa e incrementan la captación periférica, mejorando así el efecto endógeno de la insulina (Reith et al., 1996). Ambos fármacos son rápidamente absorbidos, se someten a un extenso metabolismo hepático y son generalmente bien tolerados. Sin embargo, debido a su similitud estructural con la

troglitazona, hay cierta preocupación por la toxicidad hepatocelular, aunque pocos casos de lesión hepática reversible han sido reportados. Además, debido a su capacidad de alterar la diferenciación celular, las consecuencias a largo plazo del uso de estos agentes permanecen indefinidas (Gale, 2001).

Las tiazolidinedionas disminuyen la resistencia a la insulina por incremento en la sensibilidad hepática, de tejido adiposo y del músculo esquelético a la insulina. La captación de glucosa por el tejido adiposo y el músculo esquelético aumentan, mientras la producción de glucosa hepática se reduce. Sus efectos adversos incluyen edema periférico, subida de peso y la posible exacerbación de insuficiencia cardíaca congestiva, permanece controversial su asociación con el riesgo de infarto de miocardio y en sobredosis no causa hipoglucemia (Waksman, 2008).

1.7.6. Inhibidores de la alfa-glucosidasa

Estos agentes frecuentemente usados en combinación con sulfonilureas, actúan disminuyendo las concentraciones posprandiales de glucosa, mediante la disminución de la absorción gastrointestinal de carbohidratos. Inhiben selectivamente la enzima alfa-glucosidasa del borde en cepillo, previniendo el metabolismo de los polisacáridos en unidades pequeñas de absorción.

Existen tres agentes inhibidores de la alfa-glucosidasa: la acarbosa, que fue la primera en ser comercializada, seguida del miglitol y voglibosa. La acarbosa y el miglitol son oligosacáridos que inhiben las enzimas alfa-glucosidasa en el borde en cepillo del intestino delgado, principalmente glucoamilasa, sucrasa y maltasa. Como resultado, las elevaciones postprandiales de glucosa sanguínea se atenúan después de la ingestión de carbohidratos (Reith et al., 1996).

Por sí mismas los inhibidores de la alfa-glucosidasa no causan hipoglucemia. La experiencia con sobredosis de inhibidores de la alfa-glucosidasa permanece limitada. Sin

embargo, ya que la flatulencia, la distensión y la absorción deficiente pueden complicar el uso terapéutico de estos medicamentos, deben esperarse en sobredosis por estos fármacos. Adicionalmente la toxicidad hepática reversible ha sido reportada en pacientes tomando acarbosa (Harrigan et al., 2001). Debido a todos los efectos adversos presentados en los pacientes, se buscan alternativas que ayuden a contrarrestar estos efectos adversos.

1.8. Alternativas en el control de la DM

Además de los fármacos ya mencionados, para el tratamiento de la DM, se tienen otras alternativas que incluyen: el trasplante de páncreas, injerto de islotes pancreáticos y la implantación de bombas de infusión de insulina o páncreas artificial.

No obstante las dos primeras no han podido superar las barreras de histocompatibilidad que conllevan, casi invariablemente, al rechazo de injerto, y con el páncreas artificial aún no se logran superar algunos aspectos técnicos (Robertson et al., 2000; ADA, 2000).

Además, estas alternativas pertenecen a una medicina que requiere cierto nivel económico de los pacientes y no están al alcance de la población de los países en desarrollo. Otra importancia de las plantas medicinales, según datos de la Organización Mundial de la Salud es que más del 70% de la población mundial tiene que recurrir a la medicina tradicional, como única alternativa a su alcance, para resolver sus principales problemas de salud.

1.9. Plantas medicinales y DM

Se sabe que mundialmente son utilizadas más de 1200 plantas medicinales en el control de la DM (Marles and Farnsworth, 1994). Algunas de estas plantas han sido objeto de estudios farmacológicos exhaustivos dirigidos hacia la validación de sus propiedades antidiabéticas. Sin embargo, alrededor de 800 especies vegetales reportadas como

auxiliares en la diabetes no se han sometido a estudios sistematizados. La naturaleza química de los compuestos hipoglucemiantes que más frecuentemente se han aislado de plantas antidiabéticas son carbohidratos, alcaloides, glucopéptidos, terpenoides, péptidos, flavonoides, esteroides y compuestos de naturaleza lipídica (Marles and Farnsworth, 1994). Es importante subrayar que más del 10% de las plantas reportadas mundialmente como auxiliares en la diabetes crecen en México.

1.10. Generalidades de Ibervillea sonorae

Ibervillea sonorae es una planta dioica perenne, se conoce popularmente como “guareque” o “wereke”; se localiza en zonas semiáridas de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California. Algunos grupos étnicos usan la raíz para múltiples propósitos: antirreumático, antiinflamatorio, analgésico, enfermedades cardiacas, se dice que es efectiva para curar el cáncer y auxiliar en el tratamiento de la diabetes por su aparente efecto hipoglucémico, *I. sonorae* se ha convertido en una de las plantas más ampliamente utilizadas en México para el control de la diabetes mellitus (López and Hinojosa, 1988; Xolalpa, 1994).



Figura 2. Imagen de *Ibervillea sonorae*.

2. Antecedentes

Las plantas han sido utilizadas durante siglos, por distintos grupos humanos, para tratar diversos padecimientos, ya que representan la principal fuente de productos naturales que se utilizan por sus importantes efectos terapéuticos, importantes tanto en el cuerpo humano como en el de otros animales (Mendoza and Figueroa, 2006).

En México, se cuenta con una vasta herencia prehispánica-mesoamericana, evidenciada por el abundante recurso de hierbas medicinales en el Códice de la Cruz-Badiano, que contiene 185 plantas con la descripción de sus características físicas, el modo de preparación como remedio y la manera de empleo en diversas situaciones patológicas (De la Cruz, 1991). Existe un amplio cúmulo de especies vegetales, cuya acción terapéutica aún no se ha confirmado. Es por eso que la herbolaria mexicana representa un recurso viable para encontrar nuevos tratamientos contra las enfermedades degenerativas, como el cáncer, la artrosis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, etcétera. (Figueroa-Hernández et al., 2005).

En el plano internacional también es notorio el estudio de la medicina tradicional y los recursos herbarios de todo el mundo. El resultado es un sinnúmero de publicaciones de los resultados que apoyan el uso de la medicina tradicional en diversos países. En una revisión bibliográfica en *Medline*, de 1996-2006, se encontraron 73 artículos referentes a plantas antidiabéticas, procedentes de 25 países (Fernández-Saavedra et al., 2008).

Adolfo Andrade Cetto, investigador mexicano, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, ha informado que en territorio mexicano, diverso en clima y orografía, existen al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias de plantas, tanto en el medio rural como en los mercados de las grandes ciudades, para el tratamiento de la diabetes mellitus y solo un bajo porcentaje ha sido sometido a algún tipo de estudio científico comprobatorio de la actividad hipoglucemiante, de cerca de 306 plantas auxiliares en la diabetes, 133 cuentan con información fitoquímica acerca de sus metabolitos secundarios principales, y sólo para

30 existe algún estudio científico de actividad farmacológica, una es la cucurbitácea, *Ibervillea sonora* (Figuroa-Hernández et al., 2004).

Siendo la dieta la piedra angular en el manejo adecuado de la diabetes mellitus, se utilizan como profilácticos en la dieta diaria plantas que se han consumido durante centurias como alimentos y condimentos, con efecto hipoglucemiante demostrado tanto en animales de laboratorio como en seres humanos, que además de dar sabor y color a los alimentos, tienen acciones antioxidantes, ejercen efectos fisiológicos benéficos, incluidos el antidiabético, y pueden ser útiles como quimiopreventivos de neoplasias y enfermedades degenerativas (Hiroyuki et al., 2001,2003).

El INEGI en el año 2003 mencionó que en México existen alrededor de 10 millones de indígenas, sin acceso a la medicina “occidental”, quienes recurren a la Medicina tradicional para sobrevivir. Además, en México, a los productos derivados de las plantas se les ha dado el denominador absurdo de “complementos alimenticios”, concepto que realmente es mal usado, ya que no se tienen bases científicas para poder denominarlos como tales.

Tal situación ha propiciado el abuso por parte de los comerciantes, quienes han inundado el mercado nacional con una serie de productos que escapan a las regulaciones sanitarias a que son sometidos los medicamentos de patente y carecen de un control de calidad estricto, de métodos de conservación que erradiquen la presencia de hongos y de esporas en los productos simples.

Las ventas de libre acceso de esos y otros productos de hierbas, se ven acrecentadas por las campañas de que “si es natural su uso no es tóxico ni peligroso”; sin embargo, se sabe que las plantas y sus productos no son inocuos, que al ser usadas para tratar enfermedades o prevenirlas, adquieren el carácter de medicamentos, igual que los de patente, y además de sus efectos benéficos, pueden producir efectos colaterales, tóxicos de diferente magnitud y aún mortales (Srinivasan, 2005).

Del género *Ibervillea*, se conocen varias especies, destacándose *I. sonora* e *I. lindheimeri* que se comercializan y utilizan ampliamente en el territorio mexicano, secos, rebanados, molidos y encapsulados, por lo que es difícil distinguir a qué especie pertenecen (Kearns, 1994).

El efecto hipoglucémico de la preparación tradicional de la raíz de *I. sonora* ha sido validado en ratones sanos y en ratas y ratones diabéticos. En estudios agudos, la raíz de la planta no mostró efecto hipoglucémico importante al ser administrada por vía oral. No obstante, al administrarla por vía intraperitoneal (IP) causó disminuciones significativas de la glucemia tanto en ratones sanos como en ratones con diabetes inducida por aloxana (Alarcón, 2002; 2005).

I. sonora también redujo la glucemia de manera significativa en ratas con diabetes moderada, pero no en ratas con diabetes severa. Al parecer, la planta requiere la presencia de insulina para ejercer su acción. A pesar de que estos resultados validan las propiedades antidiabéticas de esta planta medicinal en el control de la DM, aún siguen faltando estudios dirigidos a la obtención de los principios activos en cantidad suficiente para poder dilucidar su estructura química, así como su mecanismo de acción.

3. Justificación

Actualmente existe un crecimiento exponencial de enfermedades crónicas degenerativas como la Diabetes Mellitus. México ocupa el primer lugar en obesidad infantil y segundo lugar en obesidad adulta a nivel mundial, uno de los principales factores para ser propensos a la DM es la obesidad, se estima que para el año 2025 el número de enfermos diabéticos se triplique a nivel nacional, por esta razón es necesario continuar la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces y seguras, capaces de abatir los costos, sobre todo en aquellos tratamientos prolongados, como es el caso de la DM, por lo tanto, es urgente recuperar y revalorar el saber tradicional popular con respecto al uso de las plantas, y aprovecharlas como recurso, tomándola como una alternativa de salud para los diversos sectores de la sociedad, ya que es de bajo costo y fácil acceso, en contraposición a la difícil obtención de la costosa medicina institucional y privada.

3.1. Justificación del modelo

Debido al papel fundamental que presentan los astrocitos en el soporte nutricional neuronal, las células de glía de Bergmann son un modelo de estudio *in vitro* para evaluar los efectos de nuevos principios activos que afectan el metabolismo de la glucosa que se ve implicado en el proceso de algunas enfermedades crónicas degenerativas.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Producir extractos de *Ibervillea sonora* por (maceración e infusión) y evaluar el efecto que tienen en el transporte de glucosa en modelos *in vitro* BGC (células gliales de Bergmann) e *in vivo* (ratas Wistar).

4.2. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones experimentales óptimas para la producción de extractos de *I. sonora* en cuatro diferentes condiciones: maceración e infusión y secado por aspersion y liofilización.
- Realizar el análisis fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Ibervillea sonora*.
- Establecer el cultivo celular del modelo de prueba *in vitro* (BGC).
- Obtener constantes cinéticas del transporte de glucosa en células gliales de Bergmann.
- Evaluar el efecto de los extractos en el transporte de glucosa en células gliales de Bergmann
- Determinar la Dosis Letal 50 (LD₅₀) de los extractos obtenidos de *Ibervillea sonora* en las cuatro diferentes condiciones de producción.
- Determinar la actividad hipoglucemiante de los extractos en ratas Wistar.

5. Materiales y métodos

La estrategia experimental estuvo dividida con base en tres objetivos:

- Obtención de los extractos acuosos de *Ibervillea sonorae*
- Evaluación de los extractos en modelo *in vivo*
- Evaluación de los extractos en modelo *in vitro*

5.1. Protocolo experimental

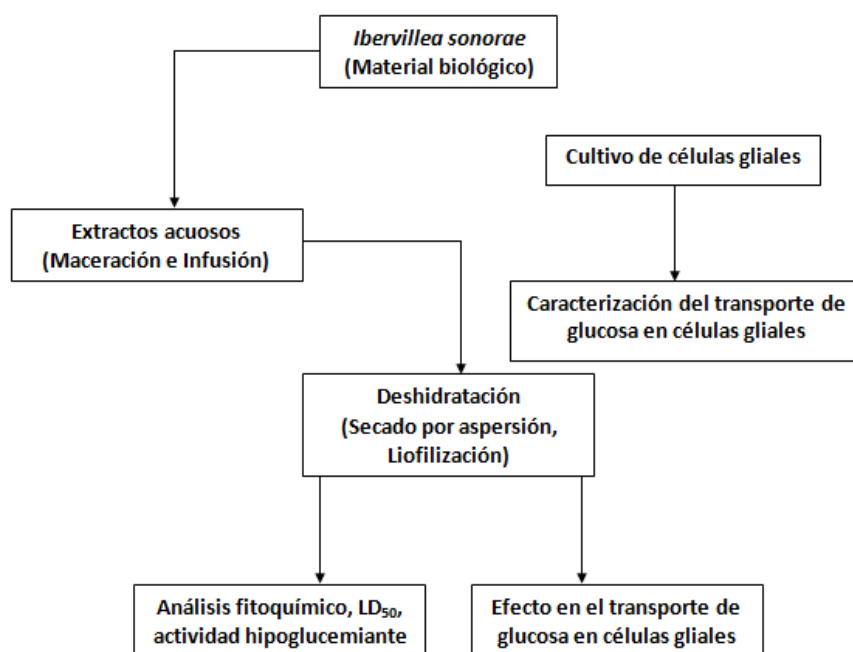


Figura 3. Diagrama de bloques del protocolo experimental

5.2. Material biológico

Ibervillea sonorae se adquirió en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. La raíz se adquirió seca y se guardó hasta su posterior utilización.

5.3. Extractos

La obtención de los extractos se realizó de dos formas, por maceración y por infusión, la eliminación del agua o deshidratación de estos extractos se realizó por secado por aspersión y liofilización, obteniendo los polvos finales para su evaluación en los modelos *in vivo* e *in vitro*.

5.3.1. Extracción por maceración e infusión

Para la extracción por maceración se utilizaron 500 gramos de raíz de *Ibervillea sonorae* seca y molida, se colocaron en un recipiente de vidrio con 2 litros de agua destilada y se dejó reposar por 24 horas, el líquido obtenido fue filtrado para ser secado. Para la extracción por infusión el proceso fue similar, 500 gramos de raíz de *Ibervillea sonorae* seca y molida fueron colocados en un recipiente de vidrio con 2 litros de agua destilada, se mantuvo en ebullición por 15 minutos, el líquido obtenido fue filtrado, los dos extractos fueron deshidratados por medio de secado por aspersión y liofilización.

5.3.2. Deshidratación (secado por aspersión y liofilización)

Los extractos obtenidos (maceración e infusión) fueron obtenidos por medio de secado por aspersión bajo las siguientes condiciones en un secador BÜCHI Mini spray dryer B-290, cabe destacar que no se usó ningún soporte.



T=130 °C
Asp=70%
Pump=20%
30<Q-flow<40

Figura 4. Equipo BÜCHI Mini spray dryer B-290

Los extractos obtenidos (maceración e infusión) se congelaron a -70°C para posteriormente ser liofilizados en un equipo LABCONCO FreeZone 6 Liter Console Freeze Dry Systems por 72 horas.



$$T \geq -40^{\circ}\text{C}$$

$$P \leq 0.075 \text{ mbar}$$

Figura 5. Equipo LABCONCO Free Zone 6 Liter Console Freeze Dry Systems.

5.4. Análisis Fitoquímico de los extractos.

Después de realizar la deshidratación de los extractos se realizó el análisis preliminar para detectar los metabolitos secundarios que se encontraban presentes.

Fueron evaluados los 4 extractos acuosos obtenidos a partir de *Ibervillea sonora*, un extracto metanólico y un extracto etanólico que se obtuvieron en colaboración con el equipo de trabajo de la Dra. Belem Piña (Departamento de Bioprocesos, UPIBI-IPN), así como 2 muestras (Vitaware® y Wereke®), que se venden actualmente como medicinas naturistas y que aparentemente contienen *Ibervillea sonora*. Las pruebas cualitativas que se realizaron fueron las siguientes:

Cuadro 3. Pruebas realizadas en el análisis fitoquímico.

Metabolitos secundarios	Pruebas de identificación
Alcaloides	Reacción de Dragendorff
Azúcares reductores	Reacción de Benedict
Cumarinas	Reacción de Ehrlich
Flavonoides	Reacción de Shinoda
Glicósidos cianógenicos	Reacción de Grignard

Quinonas	Reacción de Börntrager
Saponinas	Reacción de Rosenthaler
Sesquiterpenlactonas	Prueba con Hidroximato Férrico
Taninos	Reacción de la Gelatina

5.4.1. Alcaloides

Para determinar la presencia de alcaloides se realizó la prueba de Dragendorff, tomando en cuenta la metodología usada por Vega Torres en 2009.

5.4.2. Azúcares reductores

La presencia de azúcares reductores fue determinada por la prueba de Benedict descrita por López Gutiérrez en 2008.

5.4.3. Cumarinas

La reacción de Ehrlich fue llevada a cabo como describe Montoya Vera en 2007.

5.4.4. Flavonoides

Para la detección de flavonoides presentes se llevo a cabo la reacción de la cianidina o también conocida como reacción de Shinoda como describe Paján en 2002.

5.4.5. Glicósidos cianogénicos

La determinación de glicósidos cianogénicos se llevo a cabo por la prueba de Grignard descrita por López Gutiérrez en 2008.

5.4.6. Quinonas

Para la determinación de quinonas se realizó la reacción de Börntrager, se diluyó una porción del extracto en un tubo de ensaye, con 3 ml de agua destilada, se filtró y al líquido filtrado, se le añadieron 3 ml de hidróxido de potasio al 5% y se calentó a ebullición por 3 minutos, una vez enfriando se realizó una extracción con 3 ml de cloroformo. Se eliminó la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le adicionaron 2ml de hidróxido de potasio al 5%. Un color rojo indicó la presencia de benzoquinonas; si fue amarillo verdoso, se le adicionó 1 gota de peróxido de hidrógeno al 6%. Si la coloración cambió a roja, se consideró positiva para derivados de antrona.

5.4.7. Saponinas

La presencia de saponinas fue determinada por la prueba de Rosenthaler descrita por López Gutiérrez en 2008.

5.4.8. Sesquiterpenlactonas

Para determinar la presencia de sesquiterpenlactonas se llevo a cabo la reacción con hidroximato férrico, en la cual se agregó una porción del extracto a una cápsula de porcelana, se le adicionaron dos gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2 N y una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Se calentó la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, se enfrió y se llevó a pH de 1 con ácido clorhídrico 0.5 N. Se adicionó una gota de cloruro férrico 1%. Las coloraciones roja, violeta o rosa indicaron que la prueba es positiva para este metabolito.

5.4.9. Taninos

Los taninos presentes fueron determinados por la reacción de la gelatina descrita por Carvajal Rojas en 2009.

5.5. Experimentos en modelo in vivo

5.5.1. Animales de experimentación

Se trabajó con ratones (*Mus musculus*) cepa CD-1 adquiridos en el Bioterio México S.A. de C.V; hembras, adultas, de 25 a 35 gramos de peso corporal y ratas (*Ratus norvegicus*) cepa Wistar, adquiridas en Harlan México S.A. de C.V; hembras, adultas, de 220 a 300 g de peso corporal (figura 5).

Los animales de experimentación fueron alimentados con nutricubos (rat-chow Ralston Purina®) para roedores y agua, mantenidos en condiciones óptimas en la planta piloto de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) en cuanto a iluminación y temperatura, alojados en condiciones uniformes, clínicamente sanos.



Figura 6. Animales de experimentación Del lado izquierdo ratones cepa CD-1 (*Mus musculus*), del lado derecho ratas Wistar (*Ratus norvegicus*).

5.5.2. Dosis Letal 50 (LD_{50})

La dosis letal 50 indica los miligramos de una sustancia necesarios por kilogramo de peso de un animal para matar al 50% de la población evaluada. Para el bioensayo se utilizaron ratones cepa CD-1 y fueron administrados por vía intraperitoneal. Se formaron grupos de 5 ratones y les fueron administradas diferentes dosis (200, 400, 600, 800, 1000,

1200, 1400 y 1600 mg/kg de peso). Siguiendo la metodología de Saravia Gómez, 2005. El experimento se realizó por triplicado, con los resultados obtenidos se determinó la LD₅₀ mediante análisis estadístico PROBIT (Hahn and Soyer, 2008).

5.5.3. Efecto hipoglucémico

Para la determinación del efecto hipoglucémico, se formaron 5 grupos: 2 de control y 3 de tratamiento con 3 ratas cada uno; al grupo 1 se le administró solución salina isotónica (SSI) control negativo; al grupo 2 se le administró Glimepirida (control positivo), a los grupos 3, 4 y 5 se le administraron las dosis de 100, 200 y 400 mg/kg de peso, respectivamente, del extracto obtenido por maceración liofilizado (ML). El experimento fue llevado a cabo por duplicado como lo establece Alarcón en 2005. Antes de cada estudio las ratas se sometieron a un ayuno de 5 horas y se determinó la glucemia inicial, se administraron las diferentes sustancias descritas por vía IP. Se determinó la glucemia a los 60, 120 y 180 minutos después de la administración en muestras sanguíneas obtenidas por punción de la punta de la cola de los animales. La cuantificación de la glucemia se realizó con un glucómetro modelo Optium Xceed® y tiras reactivas Optium de Abbott®.

5.6. Experimentos en modelo in vitro

5.6.1. Cultivo celular

El cultivo primario de Glia de Bergmann se preparó a partir de cerebelos de embriones de pollo de 14 días, los cuales fueron homogenizados mecánicamente empleando agujas de calibres 16 y 18, las células obtenidas se sembraron con una densidad de 8×10^5 células/ml en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), complementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO™) y 50 µg/ml de gentamicina. Las células se incubaron de 4 a 6 días a 37°C en 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 90%.

5.6.2. Caracterización del transporte de glucosa basal

Para caracterizar el transporte de glucosa basal se realizaron ensayos de saturación. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de glucosa marcada radioactivamente con tritio (^3H) y no marcada durante 30 minutos. Después de esto, se removió la marca rápidamente por aspiración y éstas fueron lavadas 3 veces con buffer A (Hepes 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 0.8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, Glucosa 33 mM CaCl₂ 1.8mM) a 4 °C para detener la captura y se disolvieron con NaOH 0.1N.

Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford y la radiactividad incorporada por las células mediante conteo por centelleo líquido. Los datos obtenidos fueron analizados mediante regresión no lineal con el programa PRISM ver. 5.0 (Prism GraphPad Software).

5.6.3. Efecto de los extractos en la captura de glucosa en BGC

Para determinar la actividad del extracto en el transporte se realizaron ensayos de captura de [^3H]-2-Deoxiglucosa de acuerdo a la metodología descrita (Ruiz et al; 1994), con algunas modificaciones de tiempos ya que se realizaron con cultivos primarios. Las células se incubaron con glutamato y con diferentes concentraciones del extracto (10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 %) por 30 minutos; posteriormente, expuestas a una solución fisiológica con 2-D-Glucosa (52 mCi/ ml) por 30 minutos.

Después de esto, se removió la marca rápidamente por aspiración y éstas fueron lavadas 3 veces con buffer A a 4 °C, para detener la captura y se disolvieron con NaOH 0.1 N. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford y la radiactividad incorporada por las células mediante conteo por centelleo líquido. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa PRISM (Prism GraphPad Software).

5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba t-Student con un nivel de significancia de ($P < 0.05$). Para determinar la LD₅₀, después de realizar el bioensayo, los datos fueron analizados mediante un ensayo PROBIT (Ver anexo A).

6. Resultados y discusión

6.1. Obtención del extracto y rendimientos

Los polvos obtenidos fueron cuatro, los cuales fueron denominados conforme al Cuadro 4, en el que también se muestran los diferentes rendimientos.

Cuadro 4. Denominación de los extractos obtenidos y rendimiento.

Método de Extracción	Eliminación de agua		RENDIMIENTO	
	Secado por aspersion	Liofilización	MSPA	ISPA
Maceración	MSPA	ML	ISPA	13.19%
Infusión	ISPA	IL	ML	8.58%
			IL	8.16%

De los cuatro extractos obtenidos, el que mostró mayor rendimiento fue MSPA, mientras que el de menor rendimiento fue IL, lo que señala, que los extractos que fueron obtenidos por secado por aspersion mostraron mayor rendimiento en comparación con los obtenidos por liofilización.

Los rendimientos obtenidos por liofilización son aproximadamente menores en un 40% a los obtenidos por secado por aspersion, debido a una importante pérdida de la muestra en el proceso dado por derrames o sublimación de la misma. Sin embargo, es significativamente mayor al reportado por Banderas en 2006, que señaló un rendimiento del 1.87% para *Ibervillea sonora* en un proceso de liofilización.

La técnica de deshidratación de secado por aspersion permite una producción a gran escala y el producto obtenido es de baja densidad en comparación con el producto obtenido por liofilización (Bassoli et al., 1993).

Lo cual se ve reflejado en el cuadro 5, en las densidades compactas que se obtuvieron se ve claramente que las densidades de los polvos obtenidos por secado por

aspersión son aproximadamente 10 veces menores comparadas con las obtenidas para los polvos obtenidos por liofilización.

Cuadro 5. Densidades compactas de los extractos obtenidos.

Extracto	Densidad compacta (g/ml)
MSPA	0.1086
ISPA	0.197
ML	1.032
IL	1.117

Debido a la simplicidad en el equipo de secado por aspersión los costos de producción son bajos en comparación con el proceso de liofilización (Bassoli et al., 1993), en un estimado de costos para los procesos de concentración resultó 6.06 veces mayor el proceso de liofilización, para secado por aspersión el costo estimado fue de \$241.65 pesos, mientras que para liofilización fue de \$1465.00 pesos (Ver anexo B).

Las desventajas que presenta la liofilización es el alto coste de instalaciones y equipos, maneja un elevado gasto energético y tiene una operación de larga duración. (Bermejo Sanz, 1998). Esto puede verse reflejado en el tiempo de operación de cada uno de los procesos, en el secado por aspersión el tiempo de operación para nuestro caso fue de 30 minutos, mientras que en el proceso de liofilización el tiempo de operación fue de 48-72 horas.

6.2. Análisis fitoquímico

De acuerdo a las pruebas cualitativas realizadas, los metabolitos secundarios que se encontraron en las diferentes muestras se encuentran resumidos en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados de análisis fitoquímico preliminar.

Metabolitos secundarios	MSPA	ISPA	ML	IL	Extracto metanólico	Extracto etanólico	I. sonoreae ("Wereke")	I. sonoreae ("Vitaware")
Alcaloides	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
Azúcares reductores	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cumarinas	++	+++	++	++	+++	+++	-	+
Flavonoides	++	+++	++	++	+++	+++	-	++
Glicósidos cianogénicos	-	-	+	-	-	-	-	-
Quinonas	+	+	++	+++	+++	+++	-	++
Saponinas	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	+	-

+++ prueba positiva intensa, ++ prueba positiva, + prueba positiva débil y - prueba negativa.

El análisis fitoquímico preliminar mostró la presencia de algunos metabolitos secundarios en la mayoría de los compuestos analizados (MSPA, ISPA, ML, IL, Extracto metanólico, extracto etanólico y el producto Vitaware®).

Los metabolitos presentes en los cuatro extractos obtenidos por nuestro equipo de trabajo (ISPA, MSPA, IL, ML) son: alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, quinonas y saponinas, sin embargo, hay que señalar que aunque estos metabolitos se encuentran presentes en los diferentes extractos, existe diferencia en el grado de intensidad de las pruebas cualitativas, mismos que se relacionan con una diferenciación en la concentración de los metabolitos presentes.

Los extractos metanólico y etanólico son idénticos en cuanto a intensidad de las pruebas y en cuanto a presencia de metabolitos, situación que ninguno de los otros

extractos comparten, Alarcon-Aguilar en 2005, quien reportó solo la presencia de fenoles y esteroides para extractos diclorometánico y metanólico de *Ibervillea sonora*.

El producto comercial Wereke® fue la muestra que presentó menor cantidad de metabolitos secundarios: solo muestra alcaloides, azúcares reductores, saponinas y taninos. Cabe destacar que fue el único extracto que mostró presencia de taninos.

En ninguno de los extractos se encontró la presencia de sesquiterpenlactonas.

El extracto ML fue el único que mostró presencia de glicósidos cianogénicos.

La presencia de saponinas podría indicarnos que los extractos pudieran tener alguna actividad antifúngica, antibacteriana o como detergente, ya que las saponinas actúan en la membrana plasmática de los hongos, inhibiendo su crecimiento (Montes, 2000). Existen evidencias de que las saponinas poseen actividad antifúngica (Marqui, 2008), y actúan como surfactantes no iónicos, que en la mayoría de los detergentes se usan (Silva, 2004).

La presencia de los compuestos identificados en los extractos, así como antecedentes previos a este estudio nos permiten suponer que *I. sonora* figura como una planta medicinal con gran potencial.

6.3. Experimentos en modelo in vivo

6.3.1. LD₅₀

Al ser administrados los ratones con las diferentes dosis presentaban de forma inmediata algunos signos de toxicidad como poca actividad, astenia, secreción lacrimal y diarrea. Los efectos letales (muerte) producidos por los extractos pueden explicarse posiblemente por una severa hipoglucemia (Ver sección 6.3.2.). Aproximadamente 4 horas después de ser inyectados, los ratones que habían sido administrados con las dosis

más bajas (200, 400, 600 y 800 mg/kg) comenzaban a tener actividad normal. La muerte de los ratones se presentaba aproximadamente 18 horas después de ser administrados, solo se les administró una dosis y se observó el comportamiento presentado.

Las dosis de 200, 400, 600 y 800 mg/Kg no presentaron muertes con algunos extractos, por lo tanto se tuvo que realizar la administración de dosis más grandes (1000, 1200, 1400 y 1600 mg/Kg) hasta obtener los resultados esperados, ya que en este experimento necesitábamos tener los datos de la dosis máxima a la cual no muere ningún animal y la dosis mínima en la cual muere el 100% de la población.

Para este bioensayo se evaluaron los 4 extractos, obteniendo los siguientes resultados. Las diferentes variables que se obtuvieron con el bioensayo se encuentran registradas en los Cuadros 7, 8, 9 y 10 y al ser analizados los resultados se obtuvieron las dosis letales para cada uno de los extractos.

6.3.1.1. Infusión secado por aspersión (ISPA)

Cuadro 7. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto ISPA.

Concentración (mg/kg)	N	Vivos	Muertos	Log Concentración	% Mortalidad	% MUP
800	10	10	0	2.90	0	2
1000	10	2	4	3	40	4.75
1200	10	4	6	3.07	60	5.25
1400	10	2	8	3.14	80	5.84
1600	10	0	10	3.20	100	8

(N) Tamaño de la muestra; (%MUP) Porcentaje de la mortalidad en unidades PROBIT

Al ser tratados estos resultados con el ensayo PROBIT la LD₅₀ obtenida fue de 1140.039765 mg/kg de peso.

6.3.1.2. Infusión Liofilizado (IL)

Cuadro 8. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto IL.

Concentración (mg/kg)	N	Vivos	Muertos	Log Concentración	% Mortalidad	% MUP
800	10	10	0	2.90	0	2
1000	10	6	4	3	40	4.75
1200	10	2	8	3.07	80	5.84
1400	10	0	10	3.14	100	8

(N) Tamaño de la muestra; (%MUP) Porcentaje de la mortalidad en unidades PROBIT

Al ser tratados estos resultados con el ensayo PROBIT la LD₅₀ obtenida fue de 1061.184451 mg/kg de peso.

6.3.1.3. Maceración secado por aspersion (MSPA)

Cuadro 9. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto MSPA.

Concentración (mg/kg)	N	Vivos	Muertos	Log Concentración	% Mortalidad	% MUP
800	10	10	0	2.90	0	2
1000	10	8	2	3	20	4.16
1200	10	6	4	3.07	40	4.75
1400	10	2	8	3.14	80	5.84
1600	10	0	10	3.20	100	8

(N) Tamaño de la muestra; (%MUP) Porcentaje de la mortalidad en unidades PROBIT

Al ser tratados estos resultados con el ensayo PROBIT la LD₅₀ obtenida fue de 1173.02409mg/kg de peso.

6.3.1.4. Maceración Liofilizado(ML)

Cuadro 10. Resultados para el Bioensayo de LD₅₀ para el extracto ML.

Concentración (mg/kg)	N	Vivos	Muertos	Log Concentración	% Mortalidad	% MUP
600	10	10	0	2.77	0	2
800	10	6	4	2.90	40	4.75
1000	10	4	6	3	60	5.25
1200	10	0	10	3.07	100	5.84

(N) Tamaño de la muestra; (%MUP) Porcentaje de la mortalidad en unidades PROBIT

Al ser tratados estos resultados con el ensayo PROBIT la LD₅₀ obtenida fue de 963.0265688 mg/kg de peso.

Cuadro 11. LD₅₀ obtenidas mediante análisis PROBIT para cada uno de los extractos.

Extracto	LD ₅₀
ISPA	1140.03 mg
IL	1061.18 mg
MSPA	1173.02 mg
ML	963.02 mg

Los extractos obtenidos por secado por aspersión muestran LD₅₀ mayores respecto a los extractos obtenidos mediante liofilización, por otro lado el extracto con mayor LD₅₀ fue el extracto MSPA, mientras que el extracto ML fue el que mostro una menor LD₅₀.

Los inconvenientes en el secado por aspersión son las pérdidas de las propiedades y la calidad del producto final (Bassoli et al., 1993). La técnica de liofilización presenta ventajas como lo son que se obtienen productos de redisolución rápida, la forma y características del producto final son esencialmente las originales, es un proceso idóneo para sustancias termolábiles, existe una pérdida mínima de constituyentes volátiles en comparación con secado por aspersión, presenta un contenido muy bajo de humedad final y los constituyentes oxidables están protegidos (Bermejo Sanz, 1998). La aparente perdida de

actividad biológica podría estar relacionada con el tiempo de contacto de los polvos a temperaturas altas, ya que los polvos obtenidos por secado por aspersion se mantienen aproximadamente 30 minutos a una temperatura de 130 °C y son los que presentan mayores LD₅₀, mientras que los polvos obtenidos por liofilización mostraron LD₅₀ menores.

De acuerdo a la clasificación de tóxicos CYTED según criterios de Williams 1995 (Cuadro 12), los diferentes extractos de wereke son considerados productos ligeramente tóxicos ≤ 5000 mg/kg.

Cuadro 12. Clasificación de Tóxicos CYTED

Clasificación de tóxicos	LD₅₀ mg/Kg (ratones)
Extremadamente tóxica	≤ 1
Altamente tóxica	≤ 50
Moderadamente tóxica	≤ 500
Ligeramente tóxica	≤ 5000
Prácticamente no tóxica	≤ 15000
Relativamente inocuo	≥ 15000

En estudios anteriores, se han encontrado rangos de dosis letales para extractos de plantas que van desde los 300 mg/kg hasta los 2000 mg/kg de peso (Martínez, 2001; Orta, 2003; Garces, 1996; Rojas, 2006), para *Iverbillea sonora* no se ha publicado ningún resultado de LD₅₀.

6.3.2. Efecto hipoglucémico

El estudio de las variaciones de la glucemia basal en animales sanos, como respuesta a determinada sustancia, representa el método más sencillo en la investigación de plantas con probable actividad hipoglucemiante (Hernández-Galicia, 2007).

Basándonos en que el extracto por Maceración Liofilizado (ML) presentaba aparentemente una mayor actividad biológica respecto al análisis preliminar y una menor

LD₅₀, aunado a los resultados que se obtuvieron en el modelo *in vitro* (ver secciones 6.2; 6.3.1; y 6.4.2.), ya que presentaba una mayor actividad biológica aparente y mostró un efecto mayor en la captura de glucosa en BGC al ser estimuladas con una menor concentración (0.01%) que los otros extractos, se decidió que sería usado para evaluar el efecto hipoglucémico en ratas sanas. Los datos se expresaron como la media con su desviación estándar y se sometieron al análisis con prueba t de Student para determinar la significancia estadística.

Los resultados se muestran en el Cuadro 13 y en la Figura 7, en las cuales se observa un decremento paulatino de la glucosa sanguínea en los diferentes tiempos de la prueba glucémica, con respecto al control negativo.

Cuadro 13. Glucemia presentada por las ratas al ser administradas vía IP

Tratamiento	Glucemia mg/dl								
	N	0 min		60 min		120 min		180 min	
Control (SSI)	6	79 ± 2.89		77.6 ± 2.42		77.5 ± 3.39		76.1 ± 3.97	
Control positivo (Glimepirida 4 mg/kg)	6	75.3 ± 3.83	100%	α * 69.5 ± 5.35	92.3%	α * 64.1 ± 5.19	85.1%	α * 70.3 ± 3.55	93.3%
<i>I. sonorae</i> (100mg/Kg)	6	78.5 ± 5.01	100%	α * 70.8 ± 2.78	90.1%	α * 70.8 ± 5.03	90.1%	74.5 ± 2.25	94.9%
<i>I. sonorae</i> (200mg/Kg)	6	76.5 ± 3.93	100%	α * 70.8 ± 5.19	92.5%	α * 61.3 ± 2.65	80.1%	α * 69.8 ± 4.07	91.2%
<i>I. sonorae</i> (400mg/Kg)	6	78.6 ± 4.08	100%	α * 68.1 ± 8.13	86.6%	α * 65.6 ± 6.25	83.4%	α * 65.8 ± 4.07	83.7%

α Mostraron diferencias significativas con respecto a su glucemia en ayunas (0 min) (p<0.05).

* Mostraron diferencias significativas con respecto al control (p<0.05).

Los porcentajes son con respecto a su glucemia en ayunas

La escasa variabilidad de los valores de glucosa sanguínea obtenidas en ayuno, indica la uniformidad de los datos al inicio de los experimentos. Los valores de la glucemia inicial en el grupo control con SSI, permanecieron prácticamente constantes durante todo el estudio (72.13-81.89 mg glucosa/dl), no existiendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a este valor.

En el grupo con administración de Glimepirida, partiendo de una glucemia basal de 75.3 ± 3.83 mg/dl, se observó un descenso estadísticamente significativo de la glucemia a

los 60, 120 y 180 minutos, con un descenso de 14.87% a los 120 minutos con respecto a su glucemia basal inicial, siendo este el descenso mayor; esto corresponde con la farmacocinética reportada en el PLM 2008, en que una dosis de 4 mg de glimepirida, presenta una concentración máxima promedio de 352 ng/ml y 591 ng/ml respectivamente en un tiempo máximo de 2.5 horas.

La tabla muestra que la dosis de 100 mg/kg del extracto ML ejerce un descenso significativo de los niveles de glucosa en sangre con respecto al control y a la glucemia inicial a los 60 y 120 minutos, con una disminución de 9.8%, después de 180 minutos, el descenso ya no fue significativo.

La dosis de 200 mg/kg del extracto mostró un descenso máximo significativo del 19.86% en los niveles de glucosa en sangre con respecto al control y a la glucemia inicial a los 60, 120 y 180 minutos, sin embargo, se observó que a partir de los 180 minutos, se inició la recuperación de los niveles de glucemia basales.

Las dosis de 400 mg/kg del extracto mostró comportamiento similar a la dosis de 200 mg/kg, en donde, los descensos significativos en los niveles de glucosa en sangre con respecto al control y a la glucemia inicial se presentaron a los 60, 120 y 180 minutos, mostrando un mayor descenso a los 120 minutos; este descenso fue del 16.53%, sin ninguna recuperación de los niveles basales de glucemia, después de los 180 minutos posteriores a la administración.

De acuerdo a los valores observados durante el estudio, además del tiempo de toma de las muestras, la dosis de 400 mg/kg de peso ejerce mayor efecto hipoglucémico en comparación con las dosis de 100 y 200 mg/kg de peso. Estos resultados confirman también la actividad hipoglucemiante observada en cucurbitáceas por Acosta y col. (2001), Srinivas y col (2003) y específicamente para *Ibervillea sonora* por Alarcón y col. (2002, 2005).

Alarcón en 2002 mostró que el extracto acuoso obtenido por infusión y posteriormente liofilizado presentaba una actividad hipoglucemiante al ser administrado vía intraperitoneal cuando eran utilizadas dosis de 150 y 300 mg/kg. Alarcón en 2005 reportó que tanto la preparación tradicional (extracto acuoso) y el extracto crudo (jugo) de la raíz de *Ibervillea sonorae* resultó en reducciones significativas de la glucemia en ratones sanos tras la administración intraperitoneal a una dosis de 600 mg /kg. Además, el extracto DCM administrado por vía intraperitoneal causó una hipoglucemia grave que le produjo letalidad en todos los animales tratados cuando las dosis fueron de 300 y 600 mg/kg.

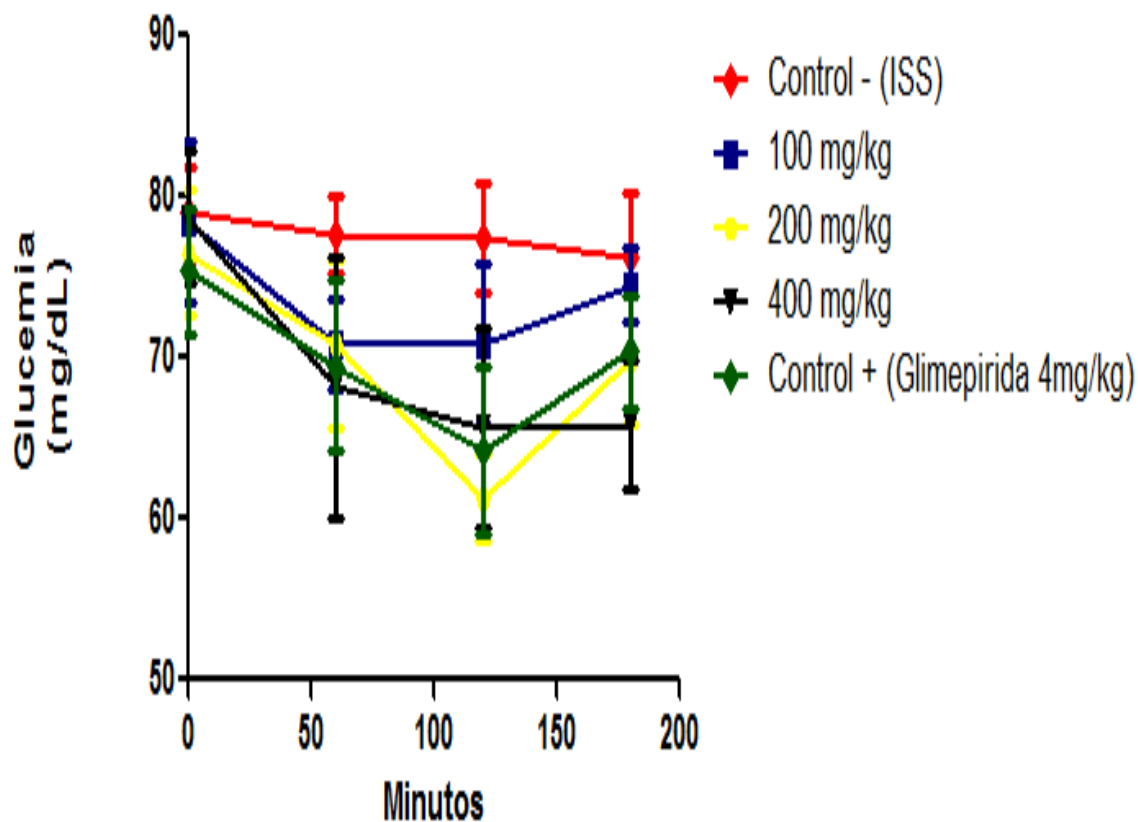


Figura 7. Cinética de Glucemia. Se muestra la cinética de glucosa determinada en ratas Wistar observada después de la administración via intraperitoneal a las diferentes condiciones experimentales.

6.4. Experimentos en modelo in vitro

6.4.1. Caracterización del transporte de glucosa basal

La caracterización se realizó con la finalidad de calcular la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_M) del transporte de glucosa basal en las células gliales de Bergmann. Para determinar la velocidad máxima de una reacción enzimática, la concentración de sustrato $[S]$ se aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. Esa es la velocidad máxima de la enzima, en ese caso, los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato.

La velocidad V indica el número de reacciones por segundo que son catalizadas por una enzima. Con concentraciones crecientes de sustrato $[S]$, la enzima va acercándose asintóticamente su velocidad máxima V_{max} , pero nunca la alcanza. Por esta razón, no hay un $[S]$ determinado para la V_{max} . De todas formas, el parámetro característico de la enzima está definido por la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ($V_{max}/2$).

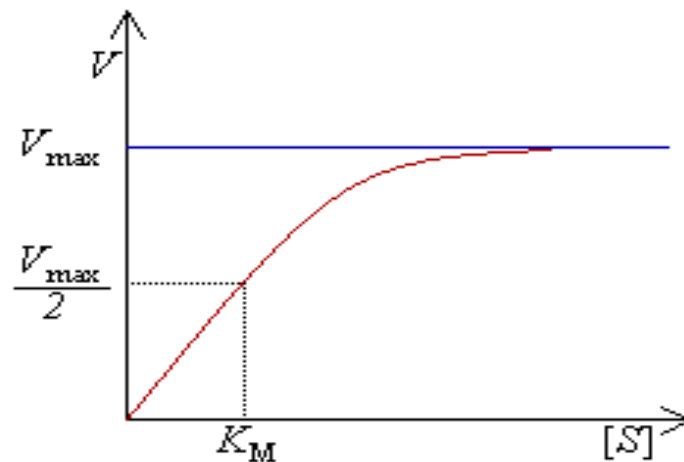


Figura 8 . Diagrama de velocidad de reacción y constante de Michaelis-Menten.

Entonces, aunque la concentración de sustrato a V_{\max} no puede ser medida exactamente, las enzimas pueden ser caracterizadas por la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.

Esta concentración de sustrato se conoce como constante de Michaelis-Menten (K_M). Esta constante representa, la constante de disociación (la afinidad del complejo enzima-sustrato (ES) por el sustrato). Valores bajos indican que el complejo ES está unido muy fuertemente y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto (Lehninger, 2000).

Como se mencionó en la metodología, basándonos en el modelo matemático Michaelis-Menten, se determinó la K_M de este sistema con el objetivo de elucidar el tipo de transportador de glucosa presente, dado que existen al menos 12 diferentes transportadores de glucosa, reportados.

Específicamente, para el sistema neuronal se tienen reportados los transportadores GLUT-1 y GLUT-3. Castrejón en 2007 reportó que GLUT-1 es el transportador encargado del ingreso de la glucosa en células gliales y neuronales.

Diversas publicaciones han demostrado que GLUT-1 es el encargado del transporte de glucosa en cerebelo, sistema nervioso central y barrera hematoencefálica. (McEwen and Reagan, 2004).

Por los trabajos anteriores, suponemos que el transportador que se encarga del ingreso de glucosa en BGC es GLUT-1. La figura 8 muestra los resultados obtenidos para los ensayos de saturación que se realizaron.

Con los resultados obtenidos de los ensayos de saturación, se obtuvieron las constantes V_{\max} y K_M .

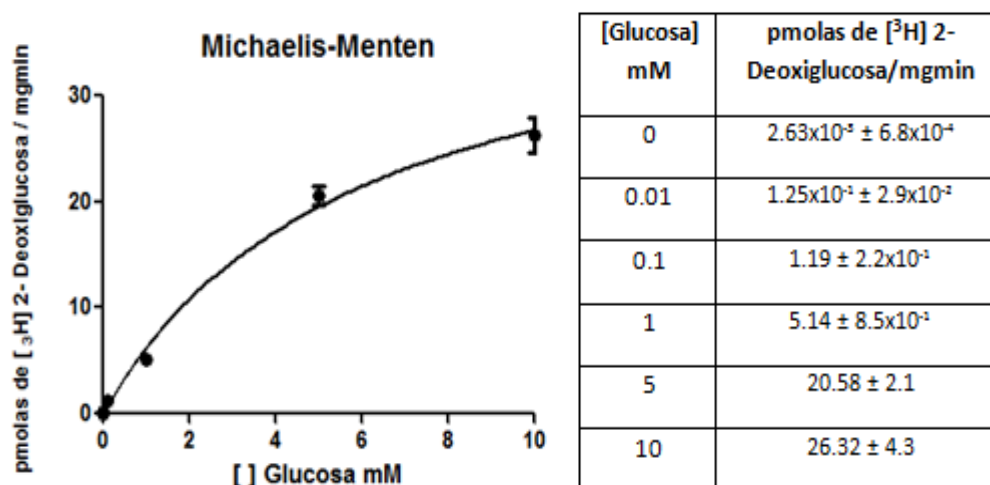


Figura 9. Regresión no lineal para obtener constantes del transporte de glucosa basal.

La caracterización del transporte arrojó los valores de $V_{\max} = 42.32$ mM y $K_M = 5.828$ mM, valores similares al que se reporta en bibliografía, Zhao en 2007 con un valor de K_m para GLUT-1 de 3-7 mM, con lo que podemos sugerir que GLUT-1 es el transportador implicado en el ingreso de la glucosa a este sistema.

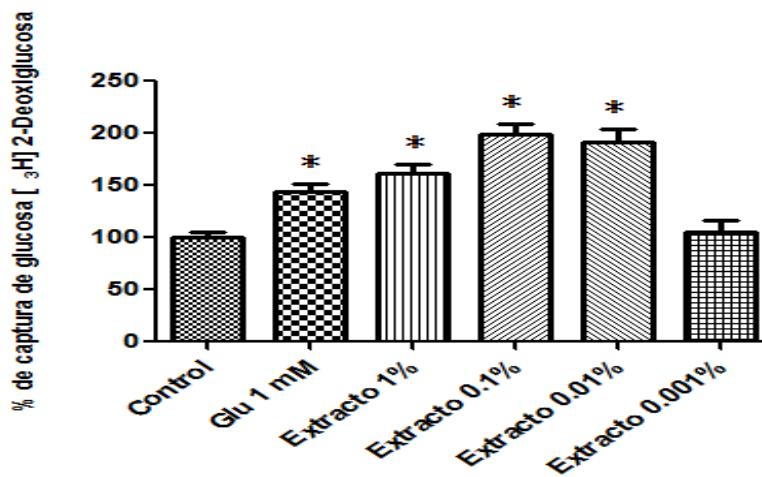
6.4.2. Efecto de los extractos en la captura de glucosa en BGC

Para evaluar el efecto en el transporte de glucosa de los cuatro extractos en las BGC, se determinó previamente el utilizar un rango de concentraciones de 0.01 a 1% (p/v) de los extractos debido a que a concentraciones mayores a 10% (p/v), la captura se veía abatida, posiblemente por un efecto citotóxico.

Se utilizó Glutamato 1mM como control positivo de referencia debido a que se ha reportado que la acción de este neurotransmisor incrementa la captura de glucosa (Magistretti, 2009; Caesar et al; 2008).

6.4.2.1. Efecto del extracto (MSPA) en la captura de glucosa en BGC

Cuando el extracto MSPA fue utilizado sobre las BGC, se mostraron incrementos en la captura de glucosa sobre el control en las concentraciones de 1%, 0.1% y 0.01%, no así para la concentración de 0.001%. El extracto al ser utilizado en una concentración de 1% mostró un aumento en la captura de 61.8% sobre el control, a una concentración de 0.1% y 0.01%, la captura se vió aumentada en porcentajes similares sobre el control, 99.1% y 91.1% respectivamente, para la concentración de 0.001% el aumento permaneció similar al control, ya que solo se aumentó en un 4.9%. La Figura 9 y el cuadro 14 muestran estos resultados.



* Mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 10. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto MSPA.

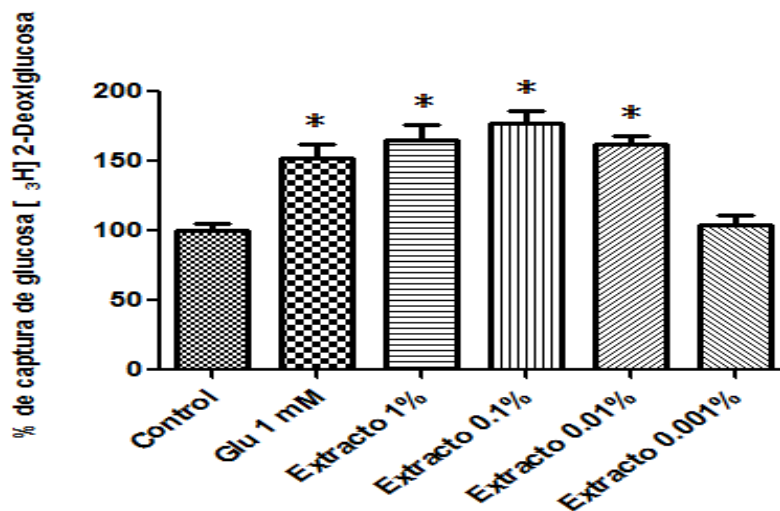
Cuadro 14. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto MSPA.

MSPA	
% de captura sobre el control	
Control	100 ± 16.67
Glu 1mM	*143.4 ± 25.26
Extracto 1%	*161.8 ± 25.45
Extracto 0.1%	*199.1 ± 33.89
Extracto 0.01%	*191.1 ± 33.85
Extracto 0.001%	104.9 ± 19.39

* Mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

6.4.2.2. Efecto del extracto (ISPA) en la captura de glucosa en BGC

El extracto ISPA fue utilizado sobre las BGC y se mostraron aumentos en la captura de glucosa sobre el control en las concentraciones de 1%, 0.1% y 0.01%, no así para la concentración de 0.001%. El extracto de 1% y 0.01% mostraron aumentos similares en la captura sobre el control 64.7% y 62.5% respectivamente, el mayor aumento en la captura de glucosa se mostró en la concentración de 0.1%, 77% sobre el control, nuevamente para la concentración de 0.001% el aumento permaneció similar al control, ya que solo se vió aumentado en un 4.9%.



* Mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 11. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto ISPA.

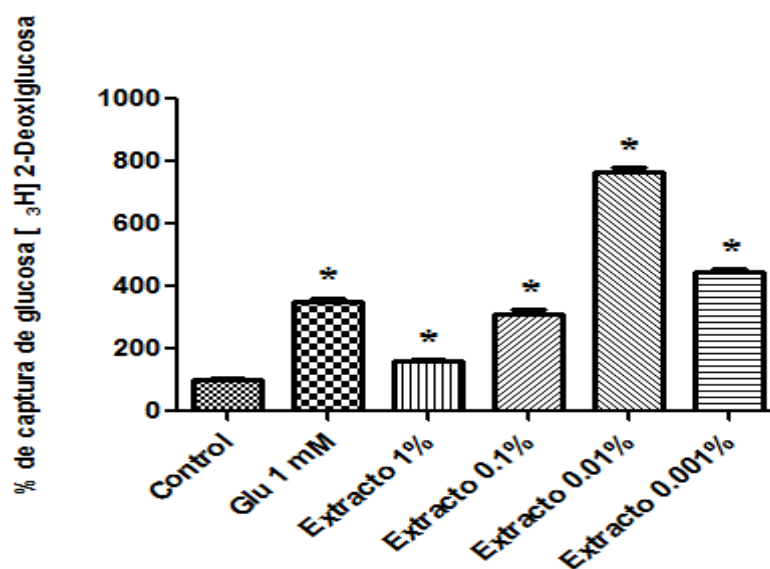
Cuadro 15. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto ISPA.

ISPA	
% de captura sobre el control	
Control	100 ± 6.99
Glu 1mM	*152.2 ± 23.16
Extracto 1%	*164.7 ± 25.29
Extracto 0.1%	*177 ± 23.5
Extracto 0.01%	*162.5 ± 13.28
Extracto 0.001%	104.6 ± 15.65

* Mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

6.4.2.3. Efecto del extracto (ML) en la captura de glucosa en BGC

Cuando el extracto ML fue utilizado sobre las BGC, se mostraron aumentos en la captura de glucosa sobre en todas las concentraciones evaluadas. El extracto de 1% mostró un aumento en la captura de 60% sobre el control, a una concentración de 0.1% la captura se vio aumentada un 211% sobre el control, la concentración de 0.001% mostro un aumento del 343.7% sobre el control, el mayor porcentaje de captura se mostro a una concentración del extracto de 0.01%, 665.5% sobre el control.



* Mostraron diferencias significativas con respecto al control (p<0.05).

Figura 12. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto ML.

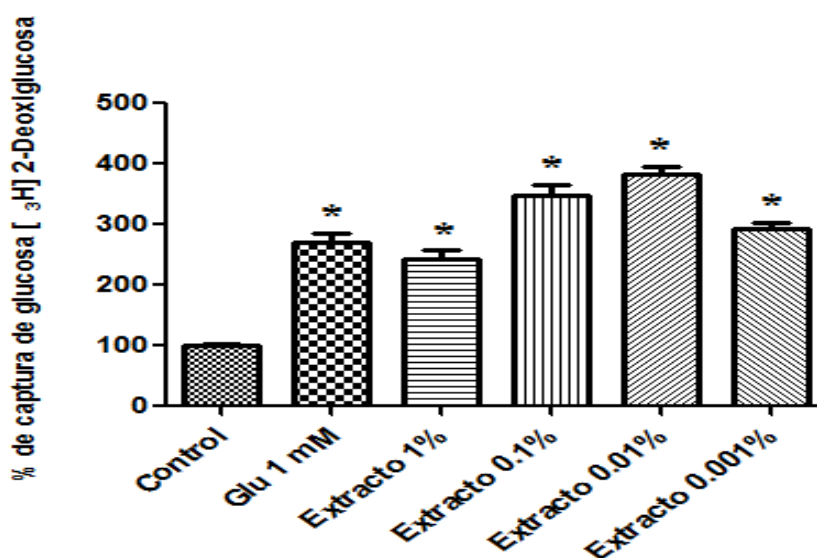
Cuadro 16. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto ML.

ML	
% de captura sobre el control	
Control	100 ± 13.47
Glu 1mM	*351.2 ± 26.05
Extracto 1%	*160 ± 21.67
Extracto 0.1%	*311 ± 28.71
Extracto 0.01%	*765.5 ± 26.08
Extracto 0.001%	*443.7 ± 34.71

* Mostraron diferencias significativas con respecto al control (p<0.05).

6.4.2.4. Efecto del extracto (IL) en la captura de glucosa en BGC

El extracto IL fue evaluado sobre las BGC, se mostraron aumentos en la captura de glucosa sobre el control en todas las concentraciones usadas, la concentración de 1% mostró el aumento más pequeño 141.9% sobre el control, a una concentración de 0.1% y 0.01%, la captura se vió aumentada en porcentajes similares sobre el control, 248.5% y 283.4% respectivamente, para la concentración de 0.001% el aumento fue de 193.9%.



* Mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 13. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con el extracto IL.

Cuadro 17. Porcentajes de captura sobre el control al ser estimulados con el extracto IL.

IL	
% de captura sobre el control	
Control	100 ± 12.22
Glu 1mM	*270.2 ± 29.56
Extracto 1%	*241.9 ± 38.14
Extracto 0.1%	*348.5 ± 39.88
Extracto 0.01%	*383.4 ± 23.41
Extracto 0.001%	*293.9 ± 26.09

* Mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

De manera global, los cuatro extractos (MSPA, ISPA, IL y ML) muestran un incremento en la captura de glucosa sobre el control, sin embargo, claramente se ve que los extractos obtenidos por liofilización (IL y ML) muestran una mayor actividad (Figura 14). Los extractos obtenidos por secado por aspersion (ISPA y MSPA) muestran aumentos similares, mostrando el mayor aumento a una concentración de 0.1%, 77% para ISPA y 99.1% en MSPA. Para los extractos de liofilizado (IL y ML) se mostro el mayor aumento a una concentración de 0.01%, pero el extracto ML mostro un aumento de 665.5%, mientras que IL fue de 283.4%.

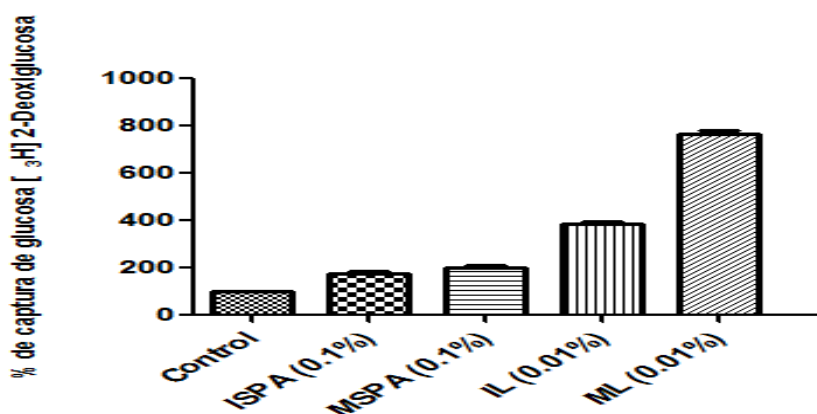


Figura 14. Captura de glucosa en BGC al ser estimulados con los diferentes extractos a la mayor concentración que presentaron la mayor captura los diferentes extractos.

Cuadro 18. Porcentajes de captura de glucosa en BGC al ser estimulados con los diferentes extractos a la mayor concentración que presentaron la mayor captura sobre el control.

% de captura sobre el control		Concentración (%)
Control	100	-----
ISPA	177 ± 23.5	0.1
MSPA	199.1 ± 33.89	0.1
IL	383.4 ± 23.41	0.01
ML	765.5 ± 26.08	0.01

El uso de extractos naturales para evaluar la captura de glucosa en células gliales es un campo en investigación, cabe destacar que es uno de los primeros trabajos que se realizan en esta tipo celular, sin embargo si se han realizado trabajos previos de ensayos de

captura de glucosa en otros sistemas como reporta Sun Lee en 2008, que trabajó con extractos metanólicos de *Tetracera scandens* en células de músculo esquelético de ratas, en las cuales se reportaron incrementos que van en un rango de 77 a 195% sobre el control. Por otro lado Noipha en 2010, trabajó con extractos de *Clausena harmandiana* reportando incrementos en las capturas de glucosa en un 80% en células de Miotubos L6, en ambos trabajos se reporta que el efecto es dependiente de dosis y tiempo.

Con esta evidencia, se ha demostrado que hay una relación estrecha entre el análisis preliminar (mayor cantidad de metabolitos secundarios presentes), la formas de extracción (maceración a temperatura ambiente) y concentración de los extractos de *Ibervillea sonora* (liofilizado), en los que el extractos con mayor efectividad biológica fue el ML.

7. Conclusiones

Los extractos obtenidos mediante secado por aspersión mostraron rendimientos mayores que los extractos obtenidos por liofilización.

El análisis toxicológico indicó que los 4 extractos corresponden al índice toxicológico nivel 4, ligeramente tóxico, (Clinical Toxicology of Comercial Products, 1995) por lo que se puede concluir que los compuestos activos presentes en los extractos tienen un bajo perfil toxicológico.

En general el método de extracción no influye en la presencia de metabolitos secundarios, pero si en la actividad biológica de estos, (demostrado en la LD₅₀), siendo el más eficiente la extracción por maceración.

Debido a que la mortalidad fue notada solamente después de la administración IP a dosis relativamente altas de los extractos en los ratones y que el valor de la DL₅₀ es muy alta, es poco probable que ocurra toxicidad en el humano por el consumo de los extractos de *I. sonorae*.

El extracto acuoso de *I. sonorae* obtenido por maceración liofilizado (ML) tiene un efecto significativo en la disminución de la glucosa sanguínea de ratones sanos en todas las concentraciones usadas, 100, 200 y 400 mg/kg.

Los estudios realizados con los diferentes extractos acuosos (MSPA, ISPA, IL y ML) de *I. sonorae* en el modelo in vitro revelan que todos tienden a aumentar la captura de glucosa en BGC de una forma significativa.

Debido a que el extracto ML mostro una menor LD₅₀, así como un mayor efecto en la captura de glucosa en el modelo in vivo, puede ser considerado como el extracto con mayor actividad biológica y por lo tanto el más eficiente para nuestro interés.

El estudio del transporte de glucosa en el cerebro resulta en el desarrollo de varias nuevas líneas de investigación y los desarrollos recientes pueden aportar conocimientos cruciales sobre el impacto funcional de metabolismo de la glucosa, el transporte y la utilización de las funciones neuronales o tal vez la función que desempeña este transporte en enfermedades cronicodegenerativas como lo es la Diabetes.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los extractos obtenidos por medio de liofilización son los más eficaces en cuanto a actividad biológica, siendo ML el más eficiente, mientras que por factibilidad económica los extractos obtenidos por secado por aspersión fueron los mejores.

8. Perspectivas

Determinar el efecto hipoglucémico en un modelo de ratas diabéticas.

Dilucidar los mecanismos de acción de la actividad hipoglucemiante del extracto ML (cascadas de señalización involucradas).

Dilucidar la(s) estructura(s) del(los) metabolito(s) y propiedades específicas con propiedades hipoglucemiantes de *Ibervillea sonora*.

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Ibervillea sonora*.

Escalamiento de la producción de los extractos de *Ibervillea sonoare*.

Producción de complementos alimenticios con actividad hipoglucemiante de los extractos de *Ibervillea sonora* (tabletas, cápsulas, entre otros).

Estudio del ciclo de vida de *Ibervillea sonoare* en diferentes condiciones ecológicas.

Implementación de programas biotecnológicos dirigidos a la conservación de la especie.

9. Referencias

- Acosta JL, Jiménez E, Juárez MA, Díaz JC. 2001. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J Ethnopharmacol* 77: 99-101.
- Alarcón FJ, Román R, Jiménez M, Reyes R, Gonzáles B, Flores JL. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol* 55: 171-177.
- Alarcón FJ, Campos AE, Xolalpa S, Hernández E, Román R. 2002a. Hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonorae* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biol* 40: 570-575.
- Alarcón FJ, Hernández E, Campos AE, Xolalpa S, Rivas JF, Vázquez LI, Román R. 2002b. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol* 82: 185-9.
- Alarcón FJ, Román R, Flores JL, Aguirre. 2002c. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res* 16: 383-386.
- Alpízar-Salazar M, Pizaña-Barba JA, Zárata-Aguilar A. 1999. La diabetes mellitus en el adulto mayor. *Rev. Med. IMSS* 37: 117-125.
- American Diabetes Association (ADA). 2000. Pancreas transplantation for patients with type 1 Diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 23 (Suppl. 1): S117-S119.
- American Diabetes Association. ADA. 2004. Nutrition principles and recommendations. *Diabetes Care* 27: S36-S46.
- American Diabetes Association. ADA. 2005. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 28: S37-S42.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99: 325-348.
- Argáez-López N, Wachter NH, Kumate-Rodríguez J, Cruz M, Talavera J, Rivera-Arce E, Lozoya X. 2003. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care* 26:2470.
- Ashcroft FM, Gribble FM. 2000. Tissue specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K (ATP) channels. *J Diabetes Complications* 14: 192-6.

Ashfield R, Gribble F, Ashcroft S, Ashcroft F. 1999. Identification of the high affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K-ATP channel. *Diabetes* 48: 1341-1347.

Auld DS, Robitaille R. 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 2003;40:389-400.

BASSOLI, D. G. et al. Instant coffee with natural aroma by spray-drying. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLOQUIUM ON COFFEE, 15, 1993. Proceedings Montpellier: Association Scientifique Internationale du Café, 1993, p. 712-718.

B.S. McEwen, L.P. Reagan, Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function, *Eur. J. Pharmacol.* 490 (2004) 13– 24.

Burchell A. A re-evaluation of GLUT 7. *Biochem J* 1998; 331: 973.

Caesar K, Hashemi P, Douhou A, Bonvento G, Boutelle MG, Walls AB, Lauritzen M. *J Physiol.* 2008 Mar 1;586(5):1337-49. Epub 2008 Jan 10.

Committee Report. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.

Contreras C, Pérez S, Alarcón F, Román R. 2002a. Antihyperglycemic effect of Psacalium peltatum. *Proc West Pharmacol Soc* 45:134-6.

Contreras F, Romero B, Suárez N, González M, Fouillioux C, Guevara E, Betancourt MC, Torres D y Velasco M. 2002b. Receptores Sur y Sulfonilureas en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica (AVFT)* v.21 n.2.

Crofford OB, Metformin. *N Engl J Med* 1995; 333: 588-589.

Cyrino FZ, Bottino DA, Coelho FC, Ravel D, Bouskela E. 2003. Effects of sulfonylurea on K (ATP) channel-dependent vasodilation. *J Diabetes Complications* 17: 6-10.

De la Cruz M. *Libellus de medicinabulus indorum herbis*. Manuscrito Azteca de 1552. Según traducción latina de Juan Badiano. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores. Fondo de Cultura Económica- Instituto Mexicano del seguro Social, Eds. México, 1991.

Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, 2001. Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle.

Doyle ME, Egan JM. 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* 55:105-131.

Duelli, R., Kuschinsky, W., 2001. Brain glucose transporters; relationship to local energy demand. *News Physiol. Sci.* 16, 71–76.

Escorcía S, 2009. Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos, *Revista de Endocrinología y Nutrición*. Vol. 17, No. 3 • Julio-Septiembre 2009 pp 120-128

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003a. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: S5-S20.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003b. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:3160-3167.

Fernández-Saavedra G, Jardón Delgado A, Figueroa-Hernández JL. Especies vegetales con utilidad en el tratamiento de la diabetes. *Congreso nacional de Química Médica*, 2008.

Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* 2002; 298:556-62.

Figueroa-Hernández JL, Fernández-Saavedra G, Céspedes Cortez C, Jardón Delgado A, Figueroa Espitia JL and Pedraza Chaverri J: Natural Products and Plant Extracts Used in the Treatment of Cancer: Review of Data from the 2004 1st National Congress of Medical Chemistry Oriented to Cancer Investigation at Oaxaca, Mexico. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 49: 14-18)

Figueroa-Hernández, J.L., Sandoval-Gonzales, G., Jayme Ascencio, V., Figueroa Espitia, J.L. and Fernández-Saavedra, G. (2005) Plant Products With Anticancer Properties Employed In The Treatment of Bowel Cancer. Literature Review 1985 and 2004. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 48: 77-83.

Gale E. Lessons from the glitazones: a story of drug development. *Lancet* 2001; 357: 1870-1875.

Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen I H, Schroder HD. Glucose transporter expression in human muscle fibers. *J Appl Physiol* 2000; 279 E529-E538.

Guerre-Millo M. Les transporteurs d'hexoses. *Medicine/Sciences* 1995; 11: 1.111-1.119.

Hahn, E. D. and R. Soyer. (date unknown). "Probit and Logit Models: Differences in a Multivariate Realm." Retrieved May 28, 2008

Hamaguchi T, Hirose T, Asakawa H, Itoh Y, Kamado K, Tokunaga K, Tomita K, Masuda H, Watanabe N, Namba M. 2004 Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide. *Diabetes Res Clin Pract* 66 Suppl 1:S129-32.

Harrigan R, Nathan M, Beattie P. Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity, and treatment. *Ann Emerg Med* 2001; 38: 68-78.

Hernández E, Aguilar A, Aguilar L, Román R, Chávez AA, García LM, Flores JL, Alarcón FJ. 2002a. Studies on hypoglycemic activity of Mexican plants. *Proc. West. Pharmacol Soc* 45:118-124.

Hernández E, Campos AE, Alarcón FJ, Vázquez LI, Flores JL, Román R. 2002b. Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice. *Proc West Pharmacol Soc* 45:42-43.

Hiroyuki F, Tomohide Y, Kazunori O. (2001) Efficacy and safety of Touchi Extract, an α -glucosidase inhibitor derived from fermented soybeans, in non-insulin-dependent diabetic mellitus. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12:351–356.

Hiroyuki F, Tomohide Y, Kazunori O. (2003) Long-term ingestion of Touchi-extract, an α -glucosidase inhibitor, by borderline and mild type-2 diabetic subjects is safe and significantly reduces blood glucose levels. *Nutrition Research* 23:713–722.

Ibberson, M., Uldry, M., Thorens, B., 2000. GLUTx1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulinsensitive tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 4607– 4612.

Inzucchi S. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *JAMA* 2002; 287: 360-372.

Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., Thorens, B., 2002. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol: Endocrinol. Metab.* 282, E974– E976.

Kaku K, Inoue Y, Kaneko T. 1995. Extraprostatic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes Res Clin Pract* (suppl) 28: S105- S108.

Kandel ER. The nervous system has two classes of cells. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editores. *Principles of neuronal science*. USA: McGraw-Hill, 2000;19-35.

Kearns, D.M., The Genus *Ibervillea* (Cucurbitaceae): An Numeration of the Species and two New combinations. *Madroño*, 41(1):13-22, 1994

Kellett, G.L., Helliwell, P.A. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.* 2000, 350: 155-62.

Kuller, L.H.(1995). Stroke and diabetes. In "Diabetes in America" National Institutes of Health, pp. 449-456.

Kumagai, A. K (1999). Glucose transport in brain and retina: Implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* 15(4), 261-273.

Lehtihet M, Welsh N, Berggren P et al. Glibenclamide inhibits islet carnitine palmitoyltransferase 1 activity, leading to PKC-dependent insulin exocytosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E438-E446.

Levien T, Baker D, Campbell R et al. Nateglinide therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 1426-1434.

López R, Hinojosa A. 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Universidad de Sonora, Hermosillo Son, México. 133p.

Lund-Anderen, H., 1979. Transport of glucose from blood to brain. *Physiol. Rev.* 59, 305–310.

Marcy TR, Britton ML, Blevins SM. 2004. Second-Generation Thiazolidinediones and Hepatotoxicity. *Ann Pharmacother* 38:1419-1423.

Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 8, 1003–1011.

Marles RJ, Farnsworth NR. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137-189.

Mastick CC, Aebersold R, Lienhard I GE. Characterization of a major protein in GLUT 4 vesicles. *J Biol Chem* 1994; 269: 6.089-6.092.

Mcvie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 2001; 72: 113-117.

Mendoza Patiño N y Figueroa-Hernández JL. *Herbolaria. Rev Fac Med UNAM* 48(6), 248-249, 2006.

Montoya Vera, 2007. Phytochemical and Biochemical study of prehispanic *Nectandra* sp. seeds. *eciperu revista del encuentro científico internacional Volumen 4 - Número 1 Enero - Junio 2007*

Moore H, Summerbell C, Hooper L, Cruickshank K, Vyas A, Johnstone P, Ashton V, Kopelman P. 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD004097.

Moe OW, Berry CA, Rector FC. Renal transport of glucose, aminoacids, sodium, chloride, and water. In: Brenner; BM, ed. *The Kidney*, 6a ed. Philadelphia: aunders.

Nagashima K, Takahashi A, Ikeda H, Hamasaki A, Kuwamura N, Yamada Y, Seino Y. 2004. Sulfonylureas and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res and Clin Pract Suppl* 1: S-75-78.

Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 2003; 26:536-42.

Paján M, Villalón C, Escalona J.C, Bordies A, Valdés R, 2002. Determinación de los posibles tipos de flavonoides presentes en el limo medicinal, materia prima. *Revista cubana de química*, Vol. XIV, 3.

Pardridge, W.M., 1983. Brain metabolism: a perspective from the blood–brain barrier. *Physiol. Rev.* 63, 1481– 1535.

Phay JE, Hussain HB, Moley JF. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 2000; 66: 217-220.

PLM 2008

Reith DM, Dawson AH, Epid D et al. Relative toxicity of beta blockers in overdose. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996; 34: 273-278.

Robertson PR, Davis C, Larson J, Stratta R, Sutherland DF. 2000. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 23: 112-116.

Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E., Best, J.D. Identification of a novel glucose transporter-like protein - GLUT12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 282: E733-8.

Rogers, S., Chandler, J.D., Clarke, A.L., Petrou, S., Best, J.D. Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003, 308: 422-6.

Román R, Lara A, Alarcón FJ, Flores JL. 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch of Med Res* 23: 105-109.

Romo de Vivar A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Editorial Limusa. p.p. 72.

Shorr R, Ray W, Daugherty J et al., Incidence and risk factors for serious hypoglycemia in older persons using insulin or sulfonylureas. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1681-1686.

Sokoloff L. Metabolism of ketone bodies by the brain. *Ann Rev Med* 1973;24:271-80.

Samuelson AB. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol* 71: 1-21.

Singh SN, Vats P, Suri S, Shyam R, Kumria MM, Ranganathan S, Sridharan K. 2001. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 76:269-77.

Srinivas N, Murthy KB, Srinivas DL, y Ravindra BSB. 2003. The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. *BMC Complementary and Alternative Medicine* September 3:1-4

Srinivasan K. (2005) Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *International Journal of Food Sciences & Nutrition* 56(6):399-414.

Stuart CA, Gilkison CR, Carlson RF, Stuart CA, Gilkison CR, Carlson RF. 1997. Effect of adding a sulfonylurea in patients with non-insulindependent diabetes mellitus previously well controlled with insulin. *Endocr Pract* 3:344-348.

Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:536-546.

Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T. 1986. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependnet K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 407: 493-499.

Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., Thorens, B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS letts.* 2002, 524: 199-203.

Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M., Thorens, B. Identification of a mammalian H⁽⁺⁾-myoinositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 2001, 20: 4467-77.

Vázquez-Martínez JL, Gómez-Dantés H, Fernández-Cantón S. 2006. Diabetes mellitus en población adulta del IMSS: Resultados de la encuesta nacional de salud 2000. *Rev. Med. Inst. Mex. Seg. Soc.* 44(1): 13-26.

Vannucci, S.J., Maher, F., Simpson, I.A., 1997b. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2 – 21.

Vega Torres D, Cabrera S, Saavedra M, Torres G, 2009. Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallo y flores de la *Ixora coccinea* L. *Revista Química Viva* 3, 8- ISSN 1666-7948

Waddell ID, Zomerschoe AG, Voice M W, Burchell A. Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem J* 1992; 286: 173-177.

Waksman J. Cardiovascular risk of rosiglitazone: another perspective. *J Pharm Pharmacology* 2008; 60: 1-10.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.

Xolalpa MS. 1994. Flora Medicinal Mayo de la región de El fuerte y Choix, Sinaloa. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Flora Medicinal Indígena de México. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista, México. pp. 363- 411.

Zhao, F.-Q, Keating A, Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters *Current Genomics*, 2007, 8, 113-128.

Zhao, F.-Q., Glimm, D.R., Kennelly, J.J. Distribution of mammalian facultative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues. *Int. J. Biochem.* 1993, 25: 1897-903.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman M, Goodyear LJ, Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 2003;6:43-50.

Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG, Schlattner U, Neumann D, Michael B, Freeman MB. 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. *J Biol Chem* 279: 43940-43951.

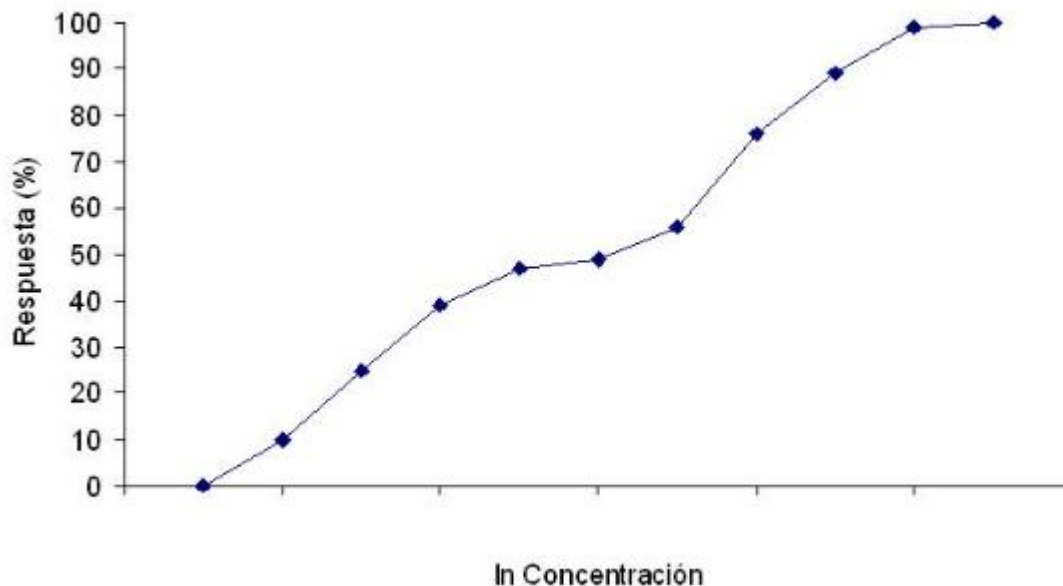
Anexo A

Método Probit

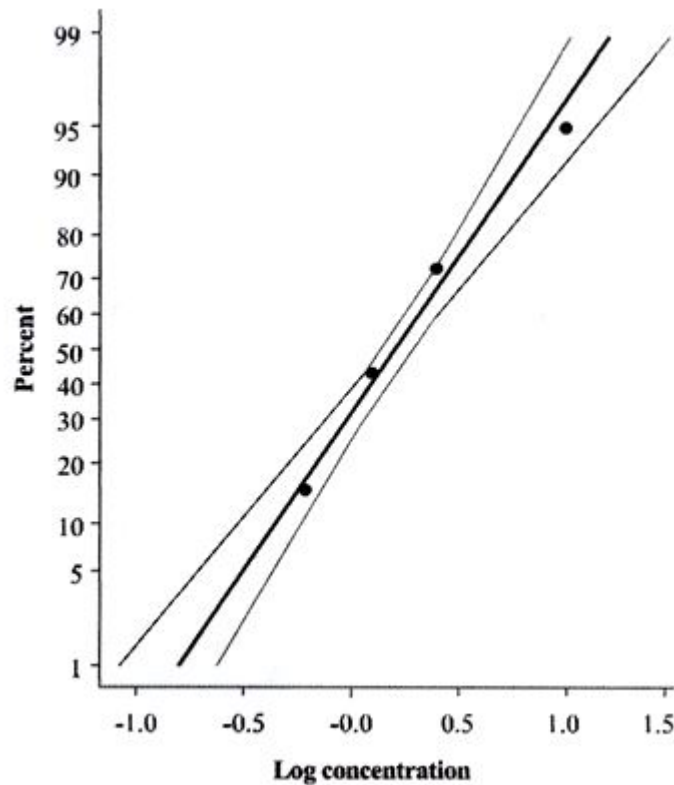
La regresión Probit consiste en un tipo particular de regresión lineal que se construye con el objetivo de conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de algún extracto tóxico) y una variable dependiente (la respuesta mortalidad) para una especie y una exposición determinada.

Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (LD_{50}).

Para calcular la LD_{50} es necesario realizar **una** regresión concentración-respuesta. Si se representa la mortalidad acumulada en % (en el eje Y) y la concentración en el eje X (log-ln transformado) de los datos lo que obtenemos es una respuesta de tipo sigmoidal.



El objetivo principal de la transformación probit es hacer lineal la relación entre dosis-respuesta. La transformación probit procede de la Normal Equivalent Deviation (NED), que es la proporción de mortalidad expresada en unidades de desviación estándar de la media de una curva normal. Se suele sumar 5 a la NED para evitar valores negativos. La respuesta de la población se debe ajustar a una distribución normal. Si transformamos el eje Y en unidades Probit y el eje X en logaritmo lo que obtenemos es una recta.



En esta recta tomando en cuenta que lo que buscamos es la LD_{50} (50% de mortalidad), solo se realizará una regresión lineal para este valor, para posteriormente realizar un antilogaritmo de la concentración y obtendremos el resultado de LD_{50} .

Anexo B

Comparación de los costos de producción estimados para las diferentes formas de concentrar los extractos (secado por aspersion & liofilización)

Para 1kg de *Ibervillea sonorae*, necesitamos 4L de agua, por medio de maceración obtendríamos 2872 ml.

Para concentrar 2872 ml por medio de secado por aspersion nos tardaríamos aproximadamente 430 minutos (7.18 h), tomando en cuenta que para secar 200 ml nos tardamos 30 minutos aproximadamente, mientras que para concentrar el mismo volumen por liofilizado nos tomaría aproximadamente 137.85 h, debido a que 1000 ml son secados en un lapso de 48 horas.

El gasto energético para secado por aspersion sería de 20822 watts (20.822 kw), el secador gasta 2900 watts por hora.

El gasto energético para liofilización sería de 482475 watts (482.475 kw), la liofilizadora gasta 3500 watts por hora.

Tomando en cuenta que el kw se encuentra a un precio de 2.0001, para secado por aspersion el gasto en cuanto a energía seria de \$41.64, mientras que para liofilización seria de \$965.00

Para operar los equipos se necesita el costo hombre, tomando el salario mínimo como 60 pesos, para secado por aspersion solo se necesitaría un día, es decir \$60.00, mientras que para liofilización, se necesitaría operar por 6 días, esto sería equivalente a \$360.00.

De acuerdo a estos cálculos podemos ver la siguiente comparación.

Secado por aspersión		Liofilización	
	Costo (pesos)		Costo (pesos)
1 kg I. sonoreae	\$100.00	1 kg I. sonoreae	\$100.00
4 litros H ₂ O	\$40.00	4 litros H ₂ O	\$40.00
Costo energía	\$41.64	Costo energía	\$965.00
Costo hombre	\$60.00	Costo hombre	\$360.00
Total	\$241.64	Total	\$1465.00

Tomando en cuenta estos cálculos, se ve claramente que el secado por aspersión es un proceso de bajo costo comparado con el proceso de liofilización, el proceso de liofilización es mayor 6.06 veces.

Anexo C

En el transcurso de la investigación, los resultados y avances se presentaron en:

- 4° Coloquio de Ingeniería Farmacéutica del 12 al 14 de Mayo del 2010, “Evaluación del efecto de extractos del wereque en el transporte de glucosa en células gliales de Bergmann”.
- 2° Foro de Biotecnología 2010 del 10 al 12 de Noviembre del 2010, “Evaluación de la actividad biológica de los extractos del wereque en modelos *in vivo* e *in vitro*”.
- XLIII Congreso nacional de Ciencias Farmacéuticas del 3 al 6 de Octubre de 2010, “Efecto en el transporte de glucosa de extractos de *Ibervillea sonora* en células gliales de Bergmann”.