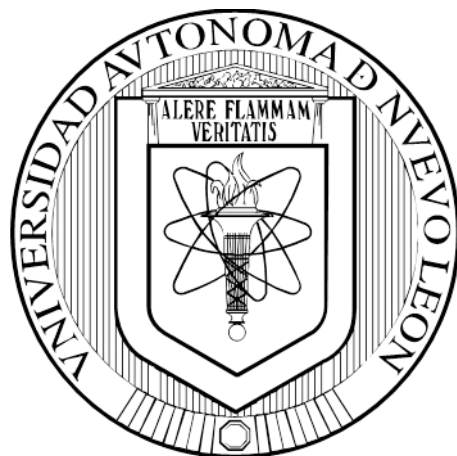


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE ENSAYOS *IN VITRO* A MICRO ESCALA
INDICADORES DE ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA Y
ANTIHIPERGLUCÉMICA EN EXTRACTOS DE PLANTAS**

POR

GRACIELA GRANADOS GUZMÁN


**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

DICIEMBRE 2016

Optimización y validación de ensayos *in vitro* a micro escala indicadores de actividad antirradicalaria y antihiper glucémica en extractos de plantas.

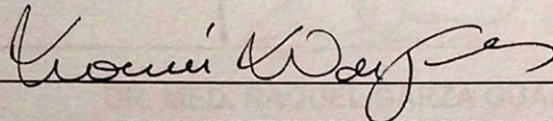
Aprobación de la Tesis:

DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ



DR. RICARDO SALAZAR ARANDA

Director de Tesis



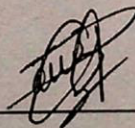
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

Co-Directora de Tesis



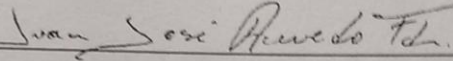
DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS

Comisión de Tesis



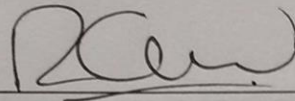
DRA. PAULA CORDERO PÉREZ

Comisión de Tesis



DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNANDEZ

Comisión de Tesis



DR. MED. RAQUEL GARZA GUAJARDO

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo gracias a los proyectos de ciencia básica CONACYT con número: CB-2012-01-180997 y CB-2013-01-22082.

Mi más profundo agradecimiento mi comisión de tesis:

Al Dr. Ricardo Salazar por su guía, sus consejos, su paciencia, su amistad durante todo este proceso. No tengo suficientes palabras de agradecimiento para usted.

A la Dra. Noemí Waksman por la oportunidad de realizar el Doctorado dentro del Departamento de Química Analítica y que fue un apoyo fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Rocío Castro, le agradezco compartir su tiempo, sus conocimientos, libros e invaluable consejos.

A la Dra. Paula Cordero, por compartir sus conocimientos y su tiempo para que este estudio se pudiera llevar a cabo.

Al Dr. Juan José Acevedo, quien me recibió en su laboratorio y me brindó sus recursos, conocimiento, tiempo y amistad.

Agradezco a todos los miembros del Departamento de Química Analítica que proporcionaron amablemente extractos para realizar los ensayos que se presentan en este trabajo y que obtienen con tanto esfuerzo: Dr. Jonathan

Pérez Meseguer, Dr. David Silva, Dr. Alejandro Pérez, Dra. Rocío Castro, Dra. Blanca Alanís, MC Cecilia Delgado.

Quiero agradecer muy especialmente:

Al Ing. Rogelio García que además de cambiar mi vida, sacrificó las vacaciones de dos años y semanas de su tiempo libre para ayudarme con los ensayos *in vivo*, además de cuidarme y apoyarme en todo momento. Gracias por creer en mí. Te amo.

A la Bióloga Elizabeth Negrete cuya colaboración fue invaluable en el desarrollo de este trabajo y me brindó no sólo su tiempo, trabajo y esfuerzo, también su amistad.

A mi amigo el Dr. Jonathan Meseguer que además de su amistad de muchos años, participó de manera activa en este proyecto.

A la MC Cecilia Delgado por brindarme su amistad y ayuda en los ensayos de hepatoprotección.

Al Técnico Julio Torres y la QCB Sara Adame por apreciable colaboración en el desarrollo de los ensayos *in vivo*.

A la MC Magda Escobar por tu amistad y ayuda incondicional.

Al grupo de trabajo de Análisis Instrumental: Dra. Norma Cavazos, Dra. Blanca Alanís, Dr. Ricardo Salazar, Dra. Lidia Nacha, Dra. Juliana Barrios, quienes han sido muy comprensivos y me han apoyado para poder terminar esta tesis.

Quiero agradecer a mi familia, porque a pesar de que a veces trastorno su existencia me quieren y me apoyan incondicionalmente:

A Rogelio García, mi compañero de vida, quién llena mi existencia de felicidad y risas. Gracias por cuidarme y quererme. Por todo lo que tú eres y significas, te amo con todo mi corazón.

A mi padre Manuel Granados, quién me sigue dando lecciones de entereza, trabajo duro, honor y profesionalismo. Te respeto y te amo.

A mi madre Graciela Guzmán, la mujer más fuerte y bella del universo, gracias por tu amor, tus cuidados, tu cariño, por tenerme paciencia y quererme tanto. Te amo siempre.

A mi hermana Bárbara Regina Granados, que ha crecido (no sé cuándo) y es un ejemplo de trabajo y responsabilidad, detallista y hermosa. Inteligente y fuerte. Te agradezco que siempre estás ahí para mí. Te amo pequeña hermana.

A mis tías: Lola, Naly, María de Jesús, Alicia y Nora Guzmán Briones que son ejemplos de vida y siempre me han apoyado de todas las formas posibles. Mucho de lo que yo soy, se los debo a ustedes. Gracias por quererme y creer en mí.

Gracias a los ángeles de mi vida, mi hermano Manuel Ricardo, mis abuelos Cruz Briones, Genaro Guzmán y Cayetano Granados, que están todos los días conmigo, son mi luz.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ensayos de Alto Rendimiento	2
1.2 Optimización de Ensayos.....	4
1.3 Validación de Ensayos.....	9
1.4 Antecedentes	13
1.4.1 Actividad Antioxidante	13
1.4.2 Actividad Hepatoprotectora	14
1.4.3 Actividad Antihiper glucémica	16
CAPITULO 2 JUSTIFICACIÓN	18
CAPITULO 3 OBJETIVO GENERAL	20
CAPITULO 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
CAPITULO 5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
5.1 Reactivos.....	22
5.2 Material.....	24
5.3 Equipo	24
5.4 Información Bibliográfica de los Ensayos	25
5.5 Optimización de los Distintos Métodos	26
5.6 Cinética Enzimática	27
5.6.1 Parámetros Bioquímicos	27
5.6.1.1 Velocidad Inicial (V_0), Velocidad máxima (V_{max}) y Constante de Michaelis-Menten (K_m).....	27
5.7 Validación	28
5.7.1 Linealidad.....	29
5.7.2 Precisión	30
5.7.3 Exactitud	30
5.7.4 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	31
5.7.5 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.....	32
5.7.5.1 Desviación Estándar Relativa de las Señales.....	32
5.7.5.2 Desviación Estándar Relativa del Porcentaje de Inhibición o Reducción	32
5.7.5.3 Factor Z	34

5.7.6 Robustez.....	35
5.8 Método de Reducción del Radical Libre DPPH.....	35
5.8.1 Optimización.....	36
5.8.2 Validación.....	37
5.8.2.1 Linealidad.....	37
5.8.2.2 Precisión y Exactitud.....	37
5.8.2.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	38
5.8.2.4 Uniformidad de placa y Variabilidad de señal.....	38
5.8.2.5 Robustez.....	38
5.9 Método de Reducción del Radical Libre ABTS.....	39
5.9.1 Optimización del Método de ABTS.....	39
5.9.2 Validación.....	40
5.9.2.1 Linealidad.....	40
5.9.2.2 Precisión y Exactitud.....	41
5.9.2.3 Límites de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	41
5.9.2.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.....	42
5.9.2.5 Robustez.....	42
5.10 Método de Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.....	42
5.10.1 Optimización.....	43
5.10.2 Cinética Enzimática.....	44
5.10.3 Validación.....	45
5.10.3.1 Linealidad.....	45
5.10.3.2 Precisión y Exactitud.....	45
5.10.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	46
5.10.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.....	46
5.10.3.5 Robustez.....	46
5.11 Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.....	47
5.11.1 Optimización.....	47
5.11.2 Cinética Enzimática.....	48
5.11.3 Validación.....	49
5.11.3.1 Linealidad.....	49
5.11.3.2 Precisión y Exactitud.....	49
5.11.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	50
5.11.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.....	50
5.11.3.5 Robustez.....	50
5.12 Aplicación de los Ensayos Optimizados y Validados a Extractos de Plantas.....	51

5.12.1 Método de Reducción de DPPH.....	51
5.12.2 Método de Reducción de ABTS.	53
5.12.3 Método de Inhibición de α -Glucosidasa.	53
5.12.4 Método de Inhibición de α -Amilasa.	54
5.13 Evaluación de Extractos en Modelos <i>in vivo</i>	56
5.13.1 Actividad Hepatoprotectora.	56
5.13.2 Actividad Antihiperglucemiante.	57
 CAPITULO 6 RESULTADOS.....	 60
6.1 Método de Reducción del Radical Libre DPPH.	60
6.1.1 Información Bibliográfica.	60
6.1.2 Optimización.....	62
6.1.3 Validación.....	64
6.1.3.1 Linealidad.	64
6.1.3.2 Precisión y Exactitud.....	66
6.1.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	66
6.1.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.	67
6.1.3.5 Robustez.....	68
6.2 Método de Reducción del Radical Libre ABTS.....	68
6.2.1 Información Bibliográfica.	68
6.2.2 Optimización.....	69
6.2.3 Validación.....	73
6.2.3.1 Linealidad.	73
6.2.3.2 Precisión y Exactitud.....	75
6.2.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	75
6.2.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.	76
6.2.3.5 Robustez.....	77
6.3 Método de Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.	78
6.3.1 Información Bibliográfica.	78
6.3.2 Optimización del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.	78
6.3.3 Cinética Enzimática.....	81
6.3.4 Validación del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.	83
6.3.4.1 Linealidad.	83
6.3.4.2 Precisión y Exactitud.....	84
6.3.4.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.....	85
6.3.4.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.	85
6.3.4.5 Robustez.....	86

6.4 Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.....	87
6.4.1 Información Bibliográfica.....	87
6.4.2 Optimización.....	87
6.4.3 Cinética Enzimática.....	90
6.4.4 Validación del Método de Inhibición de α -Amilasa.....	92
6.4.4.1 Linealidad.....	92
6.4.4.2 Precisión y Exactitud.....	93
6.4.4.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo.....	94
6.4.4.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.....	95
6.4.4.5 Robustez.....	96
6.7 Aplicación de los Ensayos Optimizados y Validados a Extractos de Plantas.....	97
6.7.1 Evaluación de la Potencial Actividad Antirradicalaria.....	97
6.7.2 Evaluación de la Potencial Actividad Antihiper glucémica.....	97
6.8 Evaluación de Actividad Biológica de Plantas <i>in vivo</i>	100
6.8.1 Actividad Hepatoprotectora.....	100
6.8.2 Actividad Antihiper glucemiante.....	102
 CAPITULO 7 DISCUSIÓN.....	 110
7.1 Método de Reducción del Radical Libre DPPH.....	115
7.2 Método de Reducción del Radical Libre ABTS.....	118
7.3 Método de Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.....	121
7.4 Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.....	124
7.5 Aplicación de los Ensayos Optimizados y Validados a Extractos de Plantas.....	126
7.5.1 Evaluación de la Actividad Antirradicalaria.....	126
7.5.2 Evaluación de la Inhibición Enzimática.....	128
7.6 Evaluación de Extractos por Modelos <i>in vivo</i>	128
7.6.1 Actividad Hepatoprotectora.....	129
7.6.2 Actividad Antihiper glucemiante.....	132
 CAPITULO 8 CONCLUSIONES.....	 135
 CAPITULO 9 PERSPECTIVAS.....	 136
 BIBLIOGRAFIA.....	 138
 RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	 152

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	Condiciones Iniciales del Método de Reducción del Radical Libre DPPH.....	37
TABLA 2	Variables para Robustez del Método De Dpph.....	38
TABLA 3	Condiciones Iniciales del Método De Reducción del Radical Libre ABTS.....	41
TABLA 4	Variables para Robustez del Método de ABTS.....	42
TABLA 5	Condiciones Iniciales del Método de α -Glucosidasa.....	45
TABLA 6	Variables para Robustez del Método de α -Glucosidasa.....	46
TABLA 7	Condiciones Iniciales del Método de Inhibición de α -Amilasa.....	49
TABLA 8	Condiciones de Robustez para el Método de α -Amilasa.....	50
TABLA 9	Extractos de Plantas Utilizados en los Métodos de DPPH y ABTS.....	52
TABLA 10	Extractos de Plantas Utilizados en los Métodos de α -Amilasa y α -Glucosidasa.....	55
TABLA 11	Condiciones Experimentales del Método de DPPH.....	61
TABLA 12	Experimento Simplex Secuencial Básico para el método de DPPH.....	63
TABLA 13	Método Optimizado de Reducción del Radical Libre DPPH.....	63
TABLA 14	Precisión y Exactitud del Método de DPPH.....	66
TABLA 15	Desviación Estándar Relativa de las Señales de DPPH.....	67
TABLA 16	Desviación Estándar Relativa de los Porcentajes de Reducción.....	67
TABLA 17	Factor Z para el Método de DPPH.....	68
TABLA 18	Robustez para el Método de DPPH.....	68
TABLA 19	Referencias Bibliográficas para el Método de ABTS.....	70
TABLA 20	Simplex Secuencial Básico para el Método ABTS.....	71
TABLA 21	Optimización del Porcentaje de ABTS.....	72
TABLA 22	Método Optimizado de Reducción del Radical Libre ABTS.....	72
TABLA 23	Precisión y Exactitud del Método de ABTS.....	75
TABLA 24	Desviación Estándar Relativa de las Señales de ABTS.....	76
TABLA 25	Desviación Estándar Relativa de los Porcentajes de Reducción de ABTS.....	76
TABLA 26	Factor Z para el Método de ABTS.....	77

TABLA 27 Evaluación de Robustez del Método de ABTS.....	77
TABLA 28 Condiciones Experimentales para el Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	79
TABLA 29 Experimento Simplex Secuencial Básico para el Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	80
TABLA 30 Valores de K_m y V_{max} para la Enzima α -Glucosidasa.....	82
TABLA 31 Método Optimizado de Inhibición de α -Glucosidasa.....	82
TABLA 32 Precisión y Exactitud del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	84
TABLA 33 Desviación Estándar Relativa de las Señales del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	85
TABLA 34 Desviación Estándar Relativa de los Porcentajes de Inhibición de α -Glucosidasa.....	86
TABLA 35 Factor Z para el Método de α -Glucosidasa.....	86
TABLA 36 Evaluación de Robustez para el Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	87
TABLA 37 Condiciones Experimentales para el Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.....	89
TABLA 38 Experimento Simplex Secuencial Básico para el Método de Inhibición de α -Amilasa.....	90
TABLA 39 Valores de K_m y V_{max} para la Enzima α -Amilasa.....	91
TABLA 40 Método Optimizado de Inhibición de α -Amilasa.....	92
TABLA 41 Precisión y Exactitud del Método de Inhibición de α -Amilasa.....	94
TABLA 42 Desviación Estándar Relativa de las Señales del Método de Inhibición de α -Amilasa.....	95
TABLA 43 Desviación Estándar Relativa de los Porcentajes de Inhibición del Método de α -Amilasa.....	95
TABLA 44 Factor Z para el Método de α -Amilasa.....	96
TABLA 45 Evaluación de Robustez del Método de Inhibición de α -Amilasa.....	96
TABLA 46 Actividad Antirradicalaria <i>in vitro</i> de Extractos de Plantas.....	98
TABLA 47 Actividad Antihiper glucémica <i>in vitro</i> de Extractos de Plantas.....	99
TABLA 48 Actividad Hepatoprotectora de Extractos de Plantas.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de un Ensayo de Alto Rendimiento.....	5
Figura 2. Diseño de Distribución de las Señales de la Especie Absorbente.....	33
Figura 3. Reacción de Reducción del Radical Libre DPPH.....	35
Figura 4. Reacción de Reducción del Radical Libre ABTS.....	39
Figura 5. Reacción de α -Glucosidasa.....	43
Figura 6. Reacción de la Enzima α -Amilasa y Reacción de Miller.....	47
Figura 7. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Ensayo de DPPH.....	62
Figura 8. % Reducción de DPPH por Quercetina.....	65
Figura 9. % Reducción de DPPH por el extracto Adicionado con Quercetina.....	65
Figura 10. Curva de Calibración de DPPH en etanol.....	65
Figura 11. Evaluación de la Correlación de Concentración de Quercetina Calculada y Real por el Método de DPPH.....	66
Figura 12. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Método de ABTS.....	69
Figura 13. Porcentaje de Reducción de ABTS con Trolox.....	74
Figura 14. Porcentajes de Reducción de ABTS con Extracto Adicionado con Trolox.....	74
Figura 15. Curva de Calibración de ABTS en Etanol.....	74
Figura 16. Evaluación de la Correlación de Concentración de Trolox Calculada y Real por el Método de ABTS.....	75
Figura 17. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	80
Figura 18. Cinética Enzimática de α -Glucosidasa sobre p-NPG.....	81
Figura 19. Gráfica de Lineweaver-Burke de α -Glucosidasa.....	81
Figura 20. Porcentajes de Inhibición de α -Glucosidasa por Acarbosa.....	83
Figura 21. Porcentaje de Inhibición de α -Glucosidasa por un Extracto Adicionado con Acarbosa.....	84

Figura 22. Evaluación de la Correlación de Concentración de Acarbosa Calculada y Real por el Método de Inhibición de α -Glucosidasa.....	85
Figura 23. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Método de Inhibición de α -Amilasa.....	88
Figura 24. Cinética Enzimática de α -Amilasa Sobre Almidón.....	91
Figura 25. Gráfica de Lineweaver-Burke para la α -Amilasa Sobre Almidón.....	91
Figura 26. Porcentaje de Inhibición de α -Amilasa con Acarbosa.....	93
Figura 27. Porcentaje de Inhibición de α -Amilasa con Extracto Adicionado con Acarbosa.....	93
Figura 28. Evaluación de la Correlación de Concentración de Acarbosa Calculada y Real por el método de inhibición de α -amilasa.....	94
Figura 29. Cinética de Glucemia Promedio Normalizada para Controles y Extractos Inhibidores de α -Glucosidasa.....	103
Figura 30. Pico Glucémico a los 15 min Obtenido para Controles y Extractos Inhibidores de α -Glucosidasa administrados vía oral.....	104
Figura 31. Cinética de Glucemia Promedio Normalizada para Extractos Inhibidores de α -Amilasa.....	106
Figura 32. Pico Glucémico a los 15 min Obtenido para los Controles y Extractos Inhibidores de α -Amilasa administrados vía oral.....	107
Figura 33. Cinética de Glucemia Promedio Normalizada para Extractos Sin Actividad Inhibitoria.....	108
Figura 34. Pico Glucémico a los 15 min Obtenido para los Extractos Sin Actividad Inhibitoria administrados vía oral.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AF	Amortiguador de fosfatos
ATP	Trifosfato de adenosina (en inglés adenosine triphosphate)
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina transaminasa
ASB	Albúmina de suero bovino
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CHAPS	Hidrato de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propansulfonato
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
DEM	Desviación estándar de la media
DER	Desviación Estándar Relativa
DTT	Ditiotreitol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracil

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HO [*]	Hidroxil
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (en inglés High-Performance Liquid Chromatography)
ICH	Conferencia internacional en armonización de requerimientos técnicos para el registro de fármacos para el uso humano (en inglés The international Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
i. p.	Intraperitoneal
K _m	Constante de Michaelis Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
O ₂ ^{*-}	Radical superóxido
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (en inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity)

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (en inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NO [*]	Óxido nítrico
PMFS	Fluoruro de bencilsulfonilo
RO [*]	Radical Alcóxi
ROO [*]	Radical Peróxilo
USP	Convención de la farmacopea de Estados Unidos (United States Pharmacopeial Convention)
V _i	Velocidad inicial
V _{max}	Velocidad máxima
v.o.	Vía oral

RESUMEN

M.C. Graciela Granados Guzmán
Universidad Autónoma de Nuevo León
Faculta de Medicina

Fecha de graduación:

Título del estudio: **OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE ENSAYOS *IN VITRO* A MICRO ESCALA INDICADORES DE ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA Y ANTIHIPERGLUCÉMICA EN EXTRACTOS DE PLANTAS.**

Número de páginas:

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Química Biomédica.

Área de estudio: **Química Analítica.**

Propósito y Método de Estudio:

Los ensayos *in vitro* a microescala son rápidos, sencillos, económicos y disminuyen reactivos, residuos y el uso de animales de experimentación. Sin embargo, presentan baja reproducibilidad y baja correlación con los resultados *in vivo*, posiblemente por las variaciones que se realizan en cada laboratorio. En este trabajo se optimizaron y validaron ensayos *in vitro* y a microescala indicadores de actividad antirradicalaria y antihiperglucemiante. La optimización se llevó a cabo utilizando un diseño factorial fraccionado y un método simplex secuencial básico, tomando en cuenta porcentaje de reducción/inhibición y las absorbancias de los controles. Con las condiciones experimentales optimizadas se validaron todos los métodos.

Una vez encontradas las condiciones óptimas para cada método se validaron. En la siguiente tabla se presenta un resumen de los resultados de la validación:

		Método			
		DPPH	ABTS	α -Glucosidasa	α -Amilasa
Linealidad	Rango Lineal	7.2 - 121.7 μ M DPPH	2.9 - 70 % ABTS	100 - 310.2 μ g/mL acarbosa	1.5 - 5 μ g/mL acarbosa
	r^2	0.9941	0.9947	0.994	0.9906
	Pendiente	9.7588	16.54	0.147	7.5784
Precisión	% DER	< 7 %	< 10 %	< 2 %	< 5 %
Exactitud	% Error	< 6 %	< 2 %	< 3 %	< 6 %
	Pendiente	0.9961	1.0029	1.000	1.000
Variabilidad de señal	% DER	< 13 %	< 13.1 %	< 7 %	< 4 %
	Factor Z	> 0.94	> 0.89	> 0.92	> 0.93

Se analizaron 30 muestras reales con los métodos optimizados y validados. 23 extractos mostraron actividad antirradicalaria y 10 extractos presentaron actividad inhibitoria enzimática.

En la evaluación *in vivo*, los 10 extractos evaluados presentaron actividad hepatoprotectora y 9 de 14 extractos, actividad antihiperglucemiante

Conclusiones:

Se desarrollaron métodos *in vitro* a microescala, precisos y exactos capaces de determinar la potencial actividad antirradicalaria y antihiperglucemiante en extractos naturales.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La investigación farmacológica se intensificó en Europa en la segunda mitad del siglo XIX cuando sus iniciadores, Rudolf Buchheim y Oswald Schmiedeberg, investigaron en animales la acción de fármacos existentes. Durante el siglo XX, con el surgimiento de la química sintética se hizo necesaria la evaluación farmacológica de los productos desarrollados. Muchos de estos nuevos fármacos se descubrieron utilizando animales de experimentación (Vogel, 2002).

La vía clásica del rastreo farmacológico involucra pruebas secuenciales de las nuevas entidades químicas o extractos de material biológico tanto en órganos aislados, como en diferentes especies de animales, por lo general roedores. La evaluación de la velocidad y alcance de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de compuestos nuevos es una parte fundamental para el profundo entendimiento de los efectos tóxicos y farmacológicos que puede abarcar humanos y animales. La mayoría de los fármacos actuales han sido descubiertos y evaluados de esta forma. Este enfoque clásico tiene como ventaja que, si un compuesto presenta actividad en

un modelo animal, es muy probable que también presente actividad en humanos. Sin embargo, consumen mucho tiempo y requieren cantidades relativamente grandes del nuevo compuesto (Vogel, 2002; Schroeder et al., 2011).

1.1 Ensayos de Alto Rendimiento

Los ensayos de alto rendimiento surgieron en los años 90 y se han convertido en una herramienta ampliamente utilizada en el descubrimiento de nuevos fármacos y por ser métodos *in vitro* han sido fuertemente promovidos por todos los sectores industriales con el propósito de producir datos confiables que sean relevantes para humanos, y disminuir el uso de animales de estudio. Los ensayos de alto rendimiento se tratan básicamente de un proceso de rastreo y ensayo que se enfoca en un solo mecanismo. Son utilizados tanto por científicos industriales como por investigadores académicos y su propósito principal es acelerar el descubrimiento de nuevos fármacos mediante el rastreo de una gran cantidad de compuestos a una velocidad que puede ser de varios miles de compuestos por día o por semana. La rapidez de estos métodos es de vital importancia ya que los laboratorios de síntesis química y de evaluación de productos de origen natural pueden generar un gran número de nuevos compuestos diariamente. Los ensayos de alto rendimiento son también utilizados para la caracterización metabólica y farmacocinética, así como para obtener datos toxicológicos sobre nuevos fármacos (Szymański et al., 2012; Martis et al., 2011; Schroeder et al., 2011; Fallarero et al., 2014).

Entre los puntos más interesantes de la tecnología de estos ensayos se encuentran: su rapidez y reducción de costos, ya que se disminuye la cantidad de material, reactivos y residuos. Además, en casos como el de la industria cosmetológica, donde se ha prohibido el uso de ciertos estudios en animales de experimentación (p. ej. de genotoxicidad, irritación de piel y ojos y toxicidad aguda) los métodos de alto rendimiento pueden ser una solución (Szymański et al., 2012; Martis et al., 2011; Schroeder et al., 2011).

Actualmente se considera que los ensayos de alto rendimiento son una subcategoría del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos y pueden describirse como la fase que abarca desde la elección de la diana hasta la dirección que señalarán los resultados de este ensayo.

La mayoría de los fármacos utilizados clínicamente ejercen su acción en una de dos vías y los ensayos *in vitro* deben estar diseñados para emular estas formas de acción:

1. Por interferencia con un componente (agonista) en el cuerpo, previniendo la interacción de este con su sitio de acción (receptor).
2. Por interferencia con una enzima normalmente esencial para el bienestar del cuerpo o bien una enzima involucrada en el crecimiento de bacterias, parásitos u hongos que causan enfermedades o estados infecciosos y el tratamiento consiste en remover su actividad.

Es de importancia crítica conjuntar la diana elegida con el método de ensayo para asegurar la relevancia biológica y la robustez del rastreo. El

ensayo debe estar configurado correctamente para que los compuestos que posean la actividad biológica deseada estén presentes en la colección de muestras. El ensayo debe demostrar baja variabilidad y una señal alta respecto al ruido para que puedan ser minimizados los falsos positivos y/o negativos (Macarrón & Hertzberg, 2011). Un ejemplo de esto es el caso de los productos naturales, donde las muestras pueden ser extractos crudos, mezclas semipurificadas o compuestos puros. Cuando son mezclas naturales complejas, incluso puede haber falsos negativos porque los compuestos activos pueden estar en muy baja concentración (Fallarero et al., 2014).

1.2 Optimización de Ensayos

Dentro del desarrollo de un ensayo, la optimización es a menudo requerida para alcanzar un desempeño aceptable que, además mantenga las condiciones dentro del rango deseado (Figura 1). Se debe recordar que los ensayos *in vitro* se llevan a cabo en ambientes artificiales, donde los sistemas biológicos pueden ser inestables o presentar actividad por debajo de su potencial; la optimización mejora significativamente la estabilidad y/o actividad de un sistema biológico estudiado, y se ha vuelto un paso clave en el desarrollo de ensayos de rastreo. Para encontrar la mejor condición posible para evaluar la diana de un ensayo de alto rendimiento, se debe llevar a cabo la optimización del ensayo (Macarrón y Hertzberg, 2011).

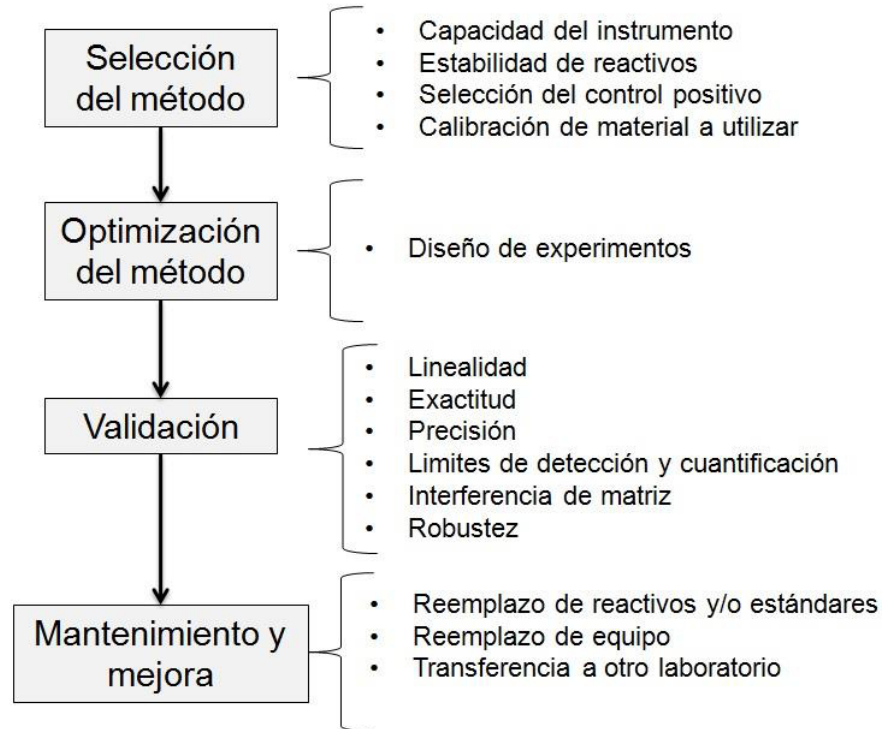


Figura 1. Desarrollo de un Ensayo de Alto Rendimiento.

Además, cabe mencionar que los requerimientos para la estabilidad de los reactivos son mayores en los ensayos de alto rendimiento que en otras áreas de investigación. En este tipo de ensayos, se utilizan soluciones diluidas de reactivos por largos períodos de tiempo y se necesita mantener una baja variabilidad tanto como una señal alta, con respecto al ruido.

El número de factores que pueden ser probados en un proceso de optimización es inmenso, sin embargo, el conocimiento inicial del sistema (pH óptimo, requerimientos de metales, sensibilidad a la oxidación, etc.) pueden ayudar a seleccionar los más apropiados. Los factores a considerar pueden ser: composición del amortiguador, pH, temperatura, fuerza iónica, osmolaridad,

iones monovalentes (Na^+ , K^+ , Cl^-); cationes divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}); moduladores reológicos (glicerol, polietilenglicol); policationes (heparina, dextran); acarreadores de proteínas (ASB y caseína); agentes quelantes (EDTA, EGTA); agentes reductores (DTT, β -mercaptoetanol); inhibidores de proteasa (PMFS, leupeptina); detergentes (tritón, CHAPS), entre otros (Fallarero et al., 2014; Macarrón & Hertzberg, 2011).

La estabilidad de los reactivos debe ser evaluada utilizando las mismas condiciones previstas para el ensayo, incluidas las concentraciones de los solventes, de las soluciones madre, reservorios, microplacas, entre otros. (Macarrón y Hertzberg, 2011).

La forma clásica de optimizar los factores experimentales se lleva a cabo variando un factor mientras que el resto permanecen constantes. Sin embargo, en el proceso de optimización de los ensayos de alto rendimiento, el número de variables a estudiar puede ser muy grande. Abordarlas de manera individual resulta poco conveniente, ya que puede ser un proceso largo por el gran número de pruebas necesarias. Las conclusiones obtenidas en el estudio de cada factor tendrán validez restringida, porque no es posible estudiar la interacción entre los mismos. Además, en la mayoría de los casos no es viable debido al alto costo y tiempo invertidos (Mercado y Santoyo, 2005).

Debido a las limitaciones de la optimización clásica, se han recomendado diversos diseños de experimentos. Los diseños de experimentos se definen como una secuencia completa de pasos que aseguran que se obtendrán los

datos apropiados, de modo que permitan un análisis objetivo que conduzca a deducciones válidas con respecto al problema establecido (Mercado y Santoyo, 2005).

El objetivo de un diseño de experimentos es evaluar si el cambio de un factor produce una mejora en el proceso, para lo cual es necesario realizar pruebas que lo demuestren. La metodología de los diseños de experimentos estudia como variar las condiciones (factores) habituales involucradas en la realización de un proceso, con el propósito de aumentar la probabilidad de detectar cambios significativos en la respuesta, de esta forma se obtiene un mayor conocimiento del comportamiento del proceso de interés (Lutz et al., 1996).

En el diseño de experimentos se determinan los factores que tienen efecto sobre la respuesta. Dependiendo del número de factores y de sus posibles rangos, se debe elegir uno de los diferentes diseños. Todos los factores se varían de manera simultánea y sistemática, lo cual permite que puedan ser medidas la significancia de un factor específico o bien la interacción entre ellos. Por lo general, los rangos de los factores que se utilizan, son los extremos de los rangos de operación (Lutz et al., 1996).

Entre los diseños de experimentos disponibles se pueden mencionar los de rastreo, los factoriales (fraccionados o completos), los de superficie de respuesta y los generados por computadora (Altekar et al., 2006).

El diseño factorial completo es conceptualmente el más sencillo de establecer e interpretar. Los datos que se obtienen para todas las combinaciones de factores, permiten el estudio de cada factor y de la interacción entre ellos. Por otra parte, en el diseño factorial fraccionado se realiza una menor cantidad de experimentos y, por lo tanto, no se obtiene información de todas las interacciones, mientras que en el diseño factorial completo al involucrar una mayor cantidad de pruebas es factible conseguir esta información (Granados-Guzmán et al., 2014).

Actualmente existe una gran variedad de programas computacionales para realizar el diseño de experimentos, tales como: STATGRAPHICS, MODDE, STATA, entre otros.

Una vez realizada la valoración de los parámetros más influyentes, se procede a encontrar las condiciones óptimas para cada factor. El camino a seguir depende de los resultados del diseño de experimentos. Si más de un factor o la interacción de estos tienen efecto significativo sobre el resultado, se puede realizar un método simplex o un diseño de superficie de respuesta para encontrar las condiciones óptimas. Pero si sólo un factor tiene efecto relevante sobre el ensayo, se deben realizar pruebas variando gradualmente las condiciones experimentales, hasta determinar cuáles son las mejores (Granados-Guzmán et al., 2014).

Por lo general la optimización se enfoca en la actividad (la señal o señal de fondo), pero el desempeño estadístico también debe ser tomado en cuenta

cuando se hace la optimización de un método; para lograr esto deben realizarse duplicados o triplicados y la variabilidad resultante debe ser medida para cada condición.

1.3 Validación de Ensayos

White publicó en el 2000, las condiciones generales para lograr un buen ensayo (White, 2000):

1. Relevancia: El resultado del ensayo *in vitro* debe tener una buena concordancia con las propiedades *in vivo* del fármaco o sustancia a probar. Esto requiere la validación del método con compuestos estándar con actividad conocida en animales o humanos.
2. Efectividad: Los criterios de descarte deben eliminar una fracción sustancial de los compuestos. Si casi todos los compuestos presentan actividad, el ensayo solamente añadirá pasos extra que retrasarán el proceso de descubrimiento.
3. Rapidez: El procedimiento experimental debe ser lo suficientemente rápido para mantener el ritmo con que se generan compuestos nuevos que requerirán probarse. La rapidez muchas veces se alcanza a expensas de la exactitud absoluta.
4. Robustez: El procedimiento experimental debe ser aplicable a una gran variedad de estructuras químicas. Idealmente también debería trabajar con diferentes componentes biológicos.

5. Exactitud y reproducibilidad: Se quiere que los ensayos proporcionen resultados correctos desde la primera vez, porque repetir los ensayos disminuye la productividad del método.

La calidad de un método debe estar determinada por su objetivo primario, el cual es distinguir con exactitud una diana de otra que no lo es. Para este propósito se utilizan controles positivos y negativos o blancos. Un análisis cuidadoso de los controles permitirá identificar errores en la manipulación de líquidos o el procesamiento de muestras. Los problemas obvios deben resolverse antes de validar el ensayo. Aún después, se pueden esperar errores aleatorios debidos a fallas en el equipo o fallas usuales en el laboratorio. Estos errores deben ser tomados en cuenta cuando se realice la validación del ensayo (Macarrón y Hertzberg, 2011).

Como se mencionó, los ensayos *in vitro* tienen entre sus ventajas la sencillez y reducción de costos. Sin embargo, para considerar a los bioensayos una alternativa real a procesos cuantitativos más costosos, es necesario llevar a cabo una validación analítica.

El objetivo general de llevar a cabo la validación analítica de cualquier procedimiento, es demostrar que el método es aceptable para el propósito previsto, por ejemplo determinar la actividad biológica o farmacológica de una nueva entidad química. En general, la calidad de un bioensayo es definida por la robustez y reproducibilidad de una señal detectable que permite que un proceso biológico sea cuantificado, ya sea en ausencia de cualquier compuesto

de prueba o en presencia de compuestos inactivos (Eli-Lilly, 2007). Sin embargo, como lo expresa Stevenson, en el resumen del 21 Simposio Internacional Intensivo de Desarrollo y Validación de Ensayos Biológicos (Stevenson, 2011), “uno de los retos es obtener medidas absolutas de exactitud, lo cual es de suma importancia, ya que la falta de exactitud dificulta comparar los resultados de dos ensayos, así como su capacidad para ser reproducidos”. Si bien se pueden realizar comparaciones de precisión, basados en replicados, esto no es directamente transferible a exactitud. Esto sucede por la falta de conocimientos del significado de correlación, equivalencia y valores promedio. Aun utilizando la mejor tecnología disponible, dos ensayos pueden mostrar diferencias en las medias y la precisión. Asumiendo que uno de los ensayos precede al segundo, no se puede elegir con confianza entre alguno de los dos resultados. Todo esto se vuelve sumamente relevante cuando se quiere transferir un método, de un laboratorio a otro.

De acuerdo a la guía de validación para ensayos biológicos de la U.S. Pharmacopeial Convention (USP, 2010) un bioensayo debe fundamentalmente evaluar múltiples concentraciones de un estándar (con replicados) ya sea durante una corrida (en un día de trabajo) o entre corridas (diferentes días de trabajo). Además, la Guía de la Conferencia Internacional en Armonización de los Requerimientos Técnicos para el Registro de Fármacos para Uso Humano Q2 (ICH, 2005b), indica que además de la precisión, los parámetros que deberían evaluarse para validar un ensayo son: exactitud, especificidad, linealidad, rango y robustez. Sin embargo, dichas determinaciones son las que

se evalúan comúnmente en cualquier método analítico y es importante tomar en cuenta parámetros que sugieren otros protocolos enfocados en bioensayos, como la Guía para el Desarrollo de Ensayos de Alto Rendimiento de Eli-Lilly (2007), que en su apartado de validación de ensayos enzimáticos propone que para considerar un método validado es necesario determinar la Constante de Michaelis-Menten (K_m), la Velocidad Máxima (V_{max}), la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) y el factor Z. Este factor ha sido ampliamente aceptado entre la comunidad que trabaja con ensayos de alto rendimiento como una forma de evaluar el desempeño estadístico de un ensayo. El factor Z es una combinación de la ventana de señal y la variabilidad, ambos parámetros importantes para la calidad de un ensayo, e indica la separación relativa de la señal y el fondo (Snijman et al., 2009).

En la literatura, es poco frecuente encontrar reportes de ensayos enzimáticos con validación analítica, incluso aunque se tome como base un método reportado previamente, a menudo se indica que se realizaron pequeñas variaciones, ya sea a las soluciones que se utilizan (enzima, sustrato o amortiguador), en la concentración, pH, tiempo o temperatura de incubación, en las condiciones de lectura (tiempo, longitud de onda), etc. Muchas de estas modificaciones realizadas suceden en puntos críticos del método y debieran ser optimizadas y más importante aún, asegurar que estos “pequeños cambios” no incidan en el resultado final. Además, aunque en diferentes guías ICH (2005), Eli-Lilly (2007) y USP (2010), se establece el uso de controles positivos para evaluar el método, esto no siempre se cumple.

También es importante considerar la matriz, ya que en caso de productos naturales, los extractos de plantas tienden a presentar diferentes coloraciones como amarillo, verde o café (producidos por los distintos componentes de la planta) que pueden interferir en la medición de la Absorbancia, lo cual podría llevar a descartar compuestos útiles por fallas en el manejo de la técnica instrumental.

1.4 Antecedentes

El Departamento de Química Analítica tiene dos líneas de generación y aplicación del conocimiento (LGAC):

- Aislamiento de productos naturales con actividad farmacológica, y
- Desarrollo y validación de métodos analíticos.

Dentro de la primera línea, actualmente se desarrolla la investigación de productos naturales con actividad hepatoprotectora, antiviral, antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, antidiabética y antihiper glucémica. Por este motivo, es de interés para el Departamento contar con los ensayos *in vitro* optimizados y validados que permitan una correcta evaluación de dichas actividades..

1.4.1 Actividad Antioxidante.

La oxidación es la transferencia de electrones de un átomo a otro y representa una parte esencial de la vida de los organismos aerobios, ya que el

oxígeno es el último aceptor de electrones en el sistema que produce energía en forma de ATP. Sin embargo, pueden producirse problemas cuando el flujo de electrones se desacopla (transferencia de electrones desapareados), generándose radicales libres. Algunos ejemplos de radicales libres, conocidos como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), incluyen: radicales superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), peroxilo (ROO^{\cdot}), alcoxilo (RO^{\cdot}), hidroxilo (HO^{\cdot}) y óxido nítrico (NO^{\cdot}). Los radicales libres son muy reactivos y rápidamente atacan moléculas de las células cercanas (Pietta, 2000). Las ERO son consideradas responsables de un gran número de enfermedades como padecimientos coronarios, cáncer y otros procesos degenerativos relacionados con el envejecimiento. La actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de suprimir, retrasar o prevenir significativamente el daño causado con el proceso oxidativo, causado principalmente por las ERO (Christodouleas et al., 2009). La actividad antioxidante se evalúa a través de ensayos *in vitro* tales como: DPPH, ABTS, ORAC, catalasa, xantina oxidasa, entre otros. Cuando se utilizan radicales libres como DPPH o ABTS, los métodos se conocen más apropiadamente como métodos de evaluación de actividad antirradicalaria.

1.4.2 Actividad Hepatoprotectora.

El daño hepático, tanto a nivel agudo como crónico, es una patología común a nivel mundial. Las principales etiologías son el abuso del alcohol, la infección viral (hepatitis B y C), enfermedades metabólicas (enfermedad de Wilson), alteración en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, entre otras. La

actividad antioxidante esta potencialmente relacionada con la hepatoprotección, ya que es notorio que independientemente del agente etiológico, en todos los tipos de daño hepático existe evidencia contundente de un incremento de radicales libres y/o una disminución significativa de las defensas antioxidantes, como lo son las enzimas endógenas catalasa, óxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc. Así las ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) juegan un papel crucial en la inducción y progresión de la enfermedad hepática (Konigsberg Fainstein, 2008).

Ya que el desbalance entre la producción de radicales libres y los sistemas antioxidantes endógenos de defensa produce estrés oxidativo, en diversos artículos se ha propuesto el uso de antioxidantes para reducir las ERO y así conseguir hepatoprotección (Konigsberg Fainstein, 2008).

Los modelos de hepatoprotección *in vitro* incluyen ensayos con líneas celulares y rebanadas de hígado.

Los ensayos de hepatoprotección *in vivo* evalúan los efectos de agentes de prueba en el hígado normal y en modelos murinos con hepatotoxicidad aguda inducida con tetracloruro de carbono (CCl₄). El CCl₄ es un compuesto químico usado ampliamente para inducir daño hepático en estudios experimentales y su toxicidad ha sido extensamente estudiada (Tong et al., 2015).

1.4.3 Actividad Antihiper glucémica.

Es ampliamente aceptado que el objetivo más difícil en el manejo de los pacientes con diabetes mellitus es mantener niveles de glucosa en sangre cercanos a la normalidad. La hiperglucemia postprandial, es una condición caracterizada por el aumento anormal de glucosa en sangre y ha sido relacionada con la diabetes tipo 2. La hidrólisis de los carbohidratos de la dieta, como el almidón, son la mayor fuente de glucosa en sangre. Diversos estudios sugieren que la inhibición de enzimas que hidrolizan carbohidratos pueden retardar efectivamente la absorción de glucosa y por lo tanto disminuir la hiperglucemia postprandial (Kim et al., 2000; Hou et al., 2009; Apostolidis y Lee, 2010).

La α -amilasa es una enzima pancreática que se encarga de la digestión de almidón en el intestino delgado catalizando la hidrólisis interna de las uniones alfa-1,4-glucosídicas, mientras que la α -glucosidasa es una enzima unida a la membrana del epitelio del intestino delgado que degrada los hidratos de carbono a azúcares reductores (Matsui et al., 1996b; Champe, 2007; Kim et al., 2000).

La potencial actividad *in vitro* se ha evaluado en diversos trabajos midiendo el grado de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa con técnicas espectrofotométricas (Subramanian et al., 2008; Apostolidis y Lee, 2010; Kang et al., 2012).

Para la evaluación *in vivo* de la actividad antihiper glucemiante, se puede utilizar un modelo de inhibición de enzimas metabólicas, en el que se mide la

disminución de la hiperglucemia postprandial a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de administrar almidón como fuente de carbohidratos, en ratas normales, comparadas con un grupo control (Yusoff et al., 2015).

CAPITULO 2

JUSTIFICACIÓN

Los ensayos de alto rendimiento son una alternativa para disminuir el uso de animales en las etapas iniciales del aislamiento biodirigido o durante el rastreo de una gran cantidad de compuestos, cuando se está investigando un solo mecanismo de acción. Este tipo de bioensayos son sencillos, económicos y permiten analizar un gran número de muestras en corto tiempo, ya que pueden ser adaptados a microescala.

Aunque diariamente se realizan y reportan este tipo de bioensayos, en la mayoría de los casos los resultados obtenidos con controles positivos no son reproducibles, posiblemente debido a las pequeñas modificaciones que se hacen en cada laboratorio.

Por este motivo consideramos de particular importancia realizar la optimización y validación analítica de cada bioensayo, para aumentar su relevancia y facilitar la transferencia confiable entre laboratorios, garantizando así la calidad de los resultados obtenidos.

CAPITULO 3

OBJETIVO GENERAL

Optimizar y validar ensayos *in vitro* a microescala indicadores de actividad antirradicalaria y antihiperoglucémica en extractos de plantas.

CAPITULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar y validar los ensayos a microescala de DPPH y ABTS como indicadores de la actividad antirradicalaria.
2. Optimizar y validar los ensayos de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa para estimar la potencial actividad antihiper glucémica.
3. Aplicar los ensayos validados a extractos de plantas.
4. Evaluar los extractos que hayan presentado las mejores actividades en un modelo *in vivo*.

CAPITULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

1. 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), *Sigma*, Alemania.
2. 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (trolox), 97 %, *Sigma-Aldrich*, Rusia.
3. α -Amilasa de páncreas porcino, 15 U/mg, *Sigma*, EUA.
4. α -Glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, 12.4 U/mg, *Sigma-Aldrich*, EUA.
5. Acarbosa, $\geq 95\%$, *Sigma*, China.
6. Ácido 2-2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), $\geq 98\%$, *Sigma-Aldrich*, Canadá.

7. Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA), 98%, *Aldrich*, India.
8. Agua destilada, Laboratorios Monterrey.
9. Albúmina Sérica Bovina (ASB), Fracción V, 96-99 % Albumina, *Sigma*, EUA.
10. Almidón, *Sigma Aldrich*, India.
11. Carbonato de sodio (Na_2CO_3), ≥ 99 %, *Sigma Aldrich*, Japón.
12. Cloruro de sodio (NaCl), para cultivo celular, *Sigma*, EUA.
13. Etanol, ACS, *J.T. Baker*, EUA.
14. Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), ACS, *Fisher Scientific*, EUA.
15. Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), *Sigma-Aldrich*, EUA.
16. Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), para cultivo celular, *Sigma*, EUA.
17. Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), ACS, *Fisher Scientific*, EUA.
18. Hidróxido de sodio (NaOH), *CTR*, México.
19. Kit para determinación de ALT/GPT, número de kit 0018480700, *Instrumentation Laboratory*, EUA.
20. Kit para determinación de AST/GPT, número de kit 0018480800, *Instrumentation Laboratory*, EUA.
21. Legalón[®] (Silimarina), tabletas 70 mg, *Takeda*, México.
22. Metanol, ACS, *J.T. Baker*, EUA.
23. Quercetina, *TCI América*, EUA.
24. p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido, *Sigma-Aldrich*, EUA.
25. Persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), 99.0%, *Sigma-Aldrich*, Alemania.

26. Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), $\geq 99\%$,
Sigma- Aldrich, España.

5.2 Material

En este trabajo se utilizaron placas de poliestireno con 96 pocillos, fondo plano, marca Falcon, EUA.

El diseño de experimentos se realizó utilizando el programa computacional STATGRAPHICS XVI Centurion (Statpoint Technologies, Inc., EUA).

El tratamiento estadístico y la validación se llevó a cabo utilizando los programas EXCEL (versiones 2007 y 2010, Microsoft, EUA) y Minitab 17 (Minitab, Inc., EUA).

El proceso de los datos de actividad antihiper glucemiante *in vivo* se realizó en el programa Origin 8 (OriginLab, EUA).

Los métodos optimizados y validados fueron aplicados a extractos de plantas proporcionados amablemente por investigadores, miembros del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL.

5.3 Equipo

En el desarrollo de este estudio se utilizó el siguiente equipo:

1. Analizador, modelo ILAB- 300 plus, marca Clinical Chemistry System, EUA.
2. Balanza Analítica, modelo Pioneer, marca Ohaus, EUA.

3. Baño de ultrasonido, modelo 2510, marca Branson, EUA.
4. Glucómetro portátil, modelo Optium Xceed, marca Abbot, EUA.
5. Incubadora con agitación para microplacas, marca VWR, EUA.
6. Lector de placas, modelo Multiskan FC, marca Thermo Scientific, EUA.
7. pH Metro, modelo ϕ 61, marca Beckman, EUA.
8. Placa de agitación y calentamiento, modelo Ceramag Midi, marca IKA, EUA.
9. Vórtex, modelo Maxi Mix II, marca Thermo Scientific, EUA.

5.4 Información Bibliográfica de los Ensayos

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los estudios que emplean bioensayos para evaluar la actividad antirradicalaria y antihiper glucémica *in vitro*. Estos procedimientos sirvieron como modelo de estudio.

Se utilizaron los sistemas de búsqueda Pubmed, SUMMON y Ebsco, además de las bases de datos Elsevier, Springer, American Chemical Society y Wiley. Se buscaron los procedimientos para los ensayos:

1. ABTS, control positivo: trolox
2. DPPH, control positivo: quercetina
3. α -glucosidasa, control positivo: acarbosa
4. α -amilasa, control positivo: acarbosa

5.5 Optimización de los Distintos Métodos

Para iniciar la optimización de cada método en microplaca fue necesario establecer la concentración efectiva media (CE_{50}) o la concentración inhibitoria media (CI_{50}), de controles positivos para cada ensayo en tubo o volúmenes altos (macrodilución) (Fórmula 1), con el propósito de utilizar dicha concentración en los estudios del diseño factorial y simplex secuencial básico.

$$\% \text{ Reducción o Inhibición} = \frac{A_{\text{controlnegativo}} - A_{\text{Prueba}}}{A_{\text{controlnegativo}}} \times 100$$

Fórmula 1

Dónde:

$A_{\text{control negativo}}$ = *Absorbancia del control negativo (mezcla de reacción sin adicionar la sustancia con actividad reductora o inhibitoria conocida).*

A_{Prueba} = *Absorbancia del agente de prueba (control positivo o agente a evaluar).*

El diseño factorial fraccionado se llevó a cabo utilizando el programa computacional STATGRAPHICS XVI Centurion, para generar la matriz de experimentos. Una vez realizados los experimentos, se calcularon los porcentajes de reducción o inhibición (Fórmula 1) y se obtuvieron los diagramas de Pareto que permitieron definir las variables con efecto significativo sobre la respuesta.

El segundo paso fue establecer las condiciones óptimas de dichas variables por medio de un método simplex secuencial básico (Sabaté y Tomás, 1997), utilizando como experimentos iniciales los niveles alto y bajo del método factorial anterior (Fórmula 2). El número de experimentos se planteó tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$\# \text{ experimentos} = N + 1$$

Fórmula 2

Dónde:

N =Número de variables a optimizar.

Una vez realizado el primer conjunto de experimentos, se procedió a identificar el peor valor. Este se eliminó y se plantearon nuevas variables utilizando la fórmula 3, para generar un nuevo conjunto de experimentos.

$$V_N = 2\bar{x}_{\text{Mejor}} - V_{\text{Peor}}$$

Fórmula 3

Dónde:

V_N = Valor nuevo para cada variable.

\bar{x}_{Mejor} = Promedio de cada condición.

V_{Peor} = Valor de la condición que dio el peor resultado.

5.6 Cinética Enzimática

5.6.1 Parámetros Bioquímicos.

5.6.1.1 Velocidad Inicial (V_0), Velocidad máxima (V_{max}) y Constante de Michaelis-Menten (K_m).

La velocidad inicial se define como la actividad enzimática en un intervalo de tiempo. Experimentalmente se determina la desaparición de un reactivo o la aparición de un producto por minuto ($\Delta A/\text{min}$) (Champe, 2007).

Se utilizaron 10 concentraciones de sustrato, siguiendo el procedimiento optimizado. Se graficó la absorbancia en función del tiempo, la pendiente fue

igual a la V_0 , posteriormente se graficó la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. Por último, se calculó el recíproco a cada uno de los ejes y se obtuvo una gráfica de doble recíproco. Los valores de K_m y V_{max} se calcularon con la ecuación de la recta, extrapolando los valores obtenidos experimentalmente. El punto donde convergen la recta y el eje de las ordenadas es equivalente a $1/V_{max}$ y el punto donde convergen la recta y el eje de las abscisas es equivalente a $-1/K_m$. La K_m es la concentración del sustrato en la que la V_0 de reacción es la mitad de la V_{max} determinada bajo concentraciones de sustrato saturantes. V_{max} es la velocidad máxima teórica, es decir, cuando todos los centros activos están ocupados por sustrato.

5.7 Validación

La validación de cada método se realizó estableciendo los siguientes parámetros, de acuerdo a lo que indican las guías de la ICH (2005); USP (2010) y Eli-Lilly (2007):

1. Linealidad.
2. Exactitud.
3. Precisión.
4. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.
5. Uniformidad de placa y variabilidad de la señal.
6. Factor Z.
7. Robustez.

Para llevar a cabo la validación, se tomó en cuenta como respuesta el porcentaje de reducción para los métodos antirradicalarios y el porcentaje de inhibición para los métodos enzimáticos. Dichos porcentajes se calcularon utilizando la Fórmula 1.

5.7.1 Linealidad.

La linealidad se evaluó por tres aproximaciones:

1. Se preparó una curva de calibración con estándares del control positivo en solvente, se utilizaron al menos 5 niveles de concentración. Se estudió la variación de la respuesta en función de la concentración del control positivo.
2. También se construyó una curva de calibración adicionando diferentes concentraciones del control positivo a un extracto. Se estudió la variación de la respuesta en función de la concentración del control positivo. Se evaluó el efecto de matriz mediante una prueba t, con el programa Excel, comparando las pendientes de esta curva y la de la aproximación 1.
3. Además, se realizó una curva de calibración con diluciones de la especie absorbente. Se estudió la variación de la absorbancia en función de la concentración de la especie absorbente.

En todos los casos se hicieron triplicados y se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación

de la recta. Se confirmó la relación lineal por medio de la inspección visual y el coeficiente de determinación (r^2).

5.7.2 Precisión.

La precisión se evaluó utilizando extractos adicionados con el control positivo a tres niveles de concentración por triplicado. Se calculó la Desviación estándar relativa en porcentaje (%DER), con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DER} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Fórmula 4

Dónde:

S = *Desviación estándar.*

\bar{x} = *media.*

Este procedimiento se evaluó el mismo día para determinar la precisión intradía, así como en días diferentes, para la precisión interdía.

5.7.3 Exactitud.

La exactitud se evaluó mediante porcentaje de error y evaluando la correlación entre la concentración calculada y la concentración real de los estándares.

El porcentaje de error se calculó utilizando muestras sin adicionar y muestras adicionadas con el control positivo a 3 niveles de concentración, por triplicado. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Error} = \frac{c_x^0 - c_x}{c_x^0} \times 100$$

Fórmula 5

Dónde:

c_x^0 = *cantidad adicionada del control positivo.*

c_x = *cantidad determinada experimentalmente del control positivo.*

La evaluación de la correlación entre la concentración calculada y la real de los estándares se llevó a cabo utilizando la ecuación de la curva de calibración a 5 niveles de concentración. En el eje de las abscisas se graficaron las concentraciones teóricas, mientras que en el eje de las ordenadas se graficaron las concentraciones calculadas. Se evaluó la exactitud por medio del valor de la pendiente, que debe ser cercano a 1.

5.7.4 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

El límite de cuantificación se determinó experimentalmente mediante una curva de regresión lineal, estableciendo así la máxima concentración de especie absorbente que el equipo puede cuantificar con exactitud y precisión.

De la misma forma, se estableció la mínima concentración de especie absorbente que se puede cuantificar con exactitud y precisión, es decir el límite máximo de cuantificación.

5.7.5 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.

La uniformidad de placa y variabilidad de la señal se evaluó a través de la medición de tres intensidades de señal, recomendadas en el protocolo de Eli-Lilly (2007) de acuerdo a la distribución presentada en la Figura 2:

1. Señal máxima: se obtiene con una concentración del control positivo que proporcione una reducción o inhibición del 20 % (CI₂₀).
2. Señal media: se obtiene con una concentración del control positivo que proporcione una reducción o inhibición del 50 % (CI₅₀).
3. Señal mínima: se obtiene con una concentración del control positivo que proporcione una reducción o inhibición del 80 % (CI₈₀).

5.7.5.1 Desviación Estándar Relativa de las Señales.

Las pruebas se realizaron con controles positivos en solvente preparados de forma independiente, así como en diferentes días. Se calculó el porcentaje de la desviación estándar relativa (% DER) para cada señal.

5.7.5.2 Desviación Estándar Relativa del Porcentaje de Inhibición o Reducción.

A partir de cada señal media se calculó el porcentaje de actividad mediante la siguiente ecuación:

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
B	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
C	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
D	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
E	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
F	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
G	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min
H	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min

Max: Señal Máxima, Med: Señal Media, Min: Señal Mínima

Placa 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
B	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
C	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
D	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
E	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
F	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
G	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
H	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med

Max: Señal Máxima, Med: Señal Media, Min: Señal Mínima

Placa 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
B	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
C	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
D	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
E	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
F	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
G	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
H	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max

Max: Señal Máxima, Med: Señal Media, Min: Señal Mínima

Figura 2. Diseño de Distribución de las Señales de la Especie Absorbente.

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\text{Señal del pozo}_{\text{media}} - \text{Promedio}_{\text{min}}}{\text{Promedio}_{\text{max}} - \text{Promedio}_{\text{min}}}$$

Fórmula 6

Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición o reducción para la señal media de cada placa.

$$\% \text{ Inhibición o Reducción} = 100 - \% \text{ Actividad}$$

Fórmula 7

Por último, se calculó la desviación estándar relativa de los porcentajes de inhibición o reducción con la fórmula 4.

5.7.5.3 Factor Z

Utilizando los datos de las señales Cl_{20} , Cl_{50} y Cl_{80} (Figura 2), se determinó el factor Z en todas las placas, mediante la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{\left(\text{Promedio}_{\text{max}} - 3S_{\text{max}} / \sqrt{n}\right) - \left(\text{Promedio}_{\text{min}} + 3S / \sqrt{n}\right)}{\text{Promedio}_{\text{max}} - \text{Promedio}_{\text{min}}}$$

Fórmula 8

Dónde:

S = *Desviación estándar.*

$\text{Promedio}_{\text{max}}$ = *Promedio de la señal máxima.*

$\text{Promedio}_{\text{min}}$ = *Promedio de la señal mínima.*

n = *Número de pruebas.*

5.7.6 Robustez.

La robustez se evaluó realizando pequeñas variaciones a los parámetros que mostraron un efecto significativo sobre la respuesta en la etapa de optimización. Se trabajó por triplicado. La evaluación se llevó a cabo utilizando una prueba de diferencia significativa honesta de tukey ($\alpha=0.05$), se compararon las medias de los porcentajes de inhibición o reducción obtenidas para las distintas condiciones evaluadas.

5.8 Método de Reducción del Radical Libre DPPH.

Para evaluar la actividad antirradicalaria se utilizó el ensayo de reducción del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), capaz de medir la capacidad de un compuesto para desactivar radicales libres mediante un espectrofotómetro, utilizando un control positivo apropiado, la reacción se muestra en la Figura 3 (Floegel et al., 2011).

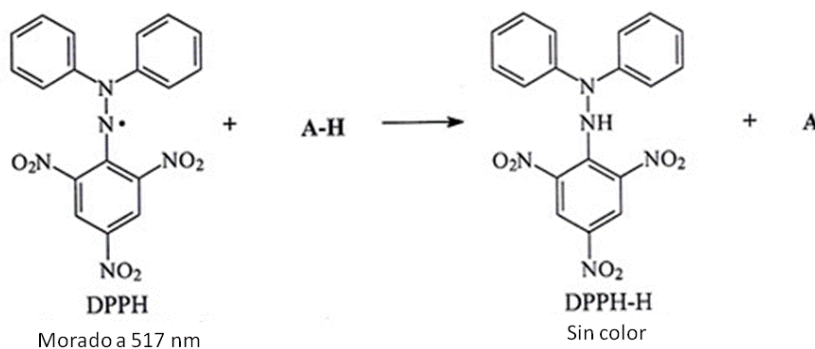


Figura 3. Reacción de Reducción del Radical Libre DPPH.

5.8.1 Optimización.

Con el propósito de determinar la Concentración Efectiva media de Quercetina, se realizó el método en macroduplicación reportado por Garza-Juarez, et al. (2011). Brevemente, 500 μL de quercetina (de diferentes concentraciones) se mezclaron con 500 μL de DPPH 125 μM en metanol. Después de incubarse 30 minutos en la oscuridad, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm. Se utilizó como blanco metanol y como control positivo quercetina. Se calculó el porcentaje de reducción (Fórmula 1).

Los porcentajes de reducción se graficaron en función a sus concentraciones. A partir de la curva de regresión, se interpoló la concentración que reduce efectivamente el 50 % del DPPH (CE_{50}).

Para iniciar propiamente la optimización se utilizó un diseño factorial de media fracción 2^{5-1} , sin bloques, aleatorizado, con punto central aleatorio y con una réplica, que se llevó a cabo con el programa computacional STATGRAPHICS XVI Centurion (Statpoint Technologies, Inc., EUA). Las variables incluidas en la optimización del método se presentan en la Tabla 1. Se realizaron 32 experimentos y se empleó el porcentaje de reducción como respuesta. Los datos obtenidos se analizaron y se obtuvo un diagrama de Pareto. Las variables que tuvieron un efecto significativo se optimizaron a través del método simplex secuencial básico, tal como se indica en la sección 5.5.

TABLA 1
CONDICIONES INICIALES DEL MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL LIBRE DPPH

Variable	Nivel 1	Nivel 2
Concentración de DPPH (μM)	500	60
Tiempo de incubación (min)	40	15
Oscuridad	Luz	Oscuridad
Solvente	Etanol	Metanol
Longitud de onda (nm)	540	450

5.8.2 Validación.

5.8.2.1 Linealidad.

Se evaluó la linealidad por tres diferentes aproximaciones como se describe en la sección 5.7.1:

1. Se evaluaron concentraciones del control positivo quercetina en etanol entre 0.122 y 250 $\mu\text{g/mL}$.
2. Se utilizó un extracto de *Jatropha dioica* que no presentó actividad antioxidante, al cual se le adicionaron concentraciones de quercetina entre 0.5 y 8 $\mu\text{g/mL}$.
3. Se utilizaron diluciones de DPPH en etanol entre 7 y 140 μM .

5.8.2.2 Precisión y Exactitud.

A un extracto de *J. dioica* que no posee actividad antioxidante se le añadió quercetina a 3 niveles de concentración (0.5, 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$), por triplicado. La

precisión y exactitud se calcularon como se mencionó en las secciones 5.7.2 y 5.7.3, respectivamente.

La evaluación de la correlación entre la concentración calculada y la concentración real se realizó con soluciones de quercetina entre 0.5 y 8 $\mu\text{g/mL}$.

5.8.2.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

Se realizó una curva de regresión lineal con concentraciones de quercetina entre 0.1 y 250 $\mu\text{g/mL}$ en etanol.

5.8.2.4 Uniformidad de placa y Variabilidad de señal.

De acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.7.5, se utilizaron las concentraciones de quercetina de 1.26, 4.33 y 7.41 $\mu\text{g/mL}$ para calcular las desviaciones estándar relativas de las señales, desviaciones estándar relativas de los porcentajes de inhibición y el factor Z.

5.8.2.5 Robustez.

Se evaluaron pequeñas variaciones en la concentración de la solución de DPPH y el solvente (Tabla 2). El análisis de los resultados se llevó a cabo por medio de una prueba de tukey ($\alpha=0.05$).

TABLA 2

VARIABLES PARA ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE DPPH

Concentración de DPPH (μM)	275
	285
Solvente	Agua (25 %)
	DMSO (0.25 %)
	DMSO (0.15 %)

5.9 Método de Reducción del Radical Libre ABTS.

El ensayo de reducción del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilenbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS) se basa en la transferencia de un electrón e involucra la reducción de un oxidante coloreado, la lectura es espectrofotométrica. La reacción se muestra en la Figura 4 (Floegel et al., 2011).

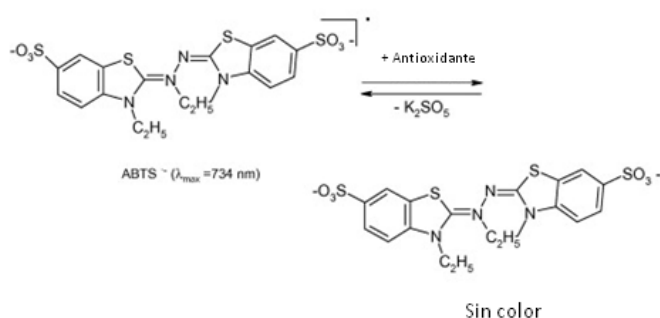


Figura 4. Reacción de Reducción del Radical Libre ABTS.

5.9.1 Optimización del Método de ABTS.

Con el propósito de determinar la Concentración Efectiva media de Trolox, se realizó el método en macroduplicación reportado por Puangpronpitag et al. (2008). Se generó el radical ABTS^{•+} mezclando soluciones acuosas de ABTS (7 mM) y de persulfato de potasio (2.4 mM). La solución resultante se mantuvo en la oscuridad por 12-16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se ajustó la solución del radical ABTS^{•+} con etanol, hasta conseguir una absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 734 nm.

El ensayo se llevó a cabo mezclando 10 μL de trolox (distintas concentraciones) con 990 μL de la solución ABTS^{•+} ($A=0.7$). Se incubó por 6

minutos. Se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro UV/Vis a 734 nm. Se utilizó como blanco etanol y como control positivo trolox. Se calculó el porcentaje de reducción (Fórmula 1) y la CE_{50} de la misma forma que para DPPH.

Para iniciar propiamente la optimización se utilizó el programa computacional STATGRAPHICS XVI Centurion (Statpoint Technologies, Inc., EUA) para generar un diseño factorial completo, 2^6 , sin bloques, aleatorizado y con una réplica. Las variables incluidas en la optimización del método se muestran en la Tabla 3. Se realizaron 128 experimentos y se empleó el porcentaje de reducción como respuesta. Los datos obtenidos se analizaron y se obtuvo un diagrama de Pareto. Las variables que tuvieron efecto significativo se optimizaron por un método simplex secuencial básico, como se indica en la sección 5.5.

5.9.2 Validación.

5.9.2.1 Linealidad.

Se evaluó la linealidad a través de las tres aproximaciones, siguiendo el procedimiento especificado en la sección 5.7.1:

1. Se evaluaron concentraciones de trolox en etanol entre 0.2 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA 3

CONDICIONES INICIALES DEL MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL LIBRE ABTS

Variable	Nivel 1	Nivel 2
Concentración de ABTS (%)	99	50
Ajuste de ABTS (Absorbancia)	0.8	0.7
Oscuridad	Oscuridad	Luz
Solvente	Amortiguador de fosfatos	Etanol
Tiempo de incubación (min)	30	1
Temperatura de incubación (°C)	37	25

2. Se adicionó trolox a concentraciones entre 0.2 y 10 µg/mL a un extracto de *J. dioica*.
3. Se utilizaron diluciones de ABTS⁺ en etanol entre 20 y 70 %.

5.9.2.2 Precisión y Exactitud.

Se adicionó con trolox un extracto de *J. dioica* a concentraciones de 1, 3 y 5 µg/mL, por triplicado. Se evaluó la precisión y exactitud de acuerdo al procedimiento descrito en las secciones 5.7.2 y 5.7.3, respectivamente.

La evaluación de la correlación entre la concentración calculada y la real, se llevó a cabo con soluciones de trolox entre 1 y 5 µg/mL.

5.9.2.3 Límites de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

Se realizó una curva de regresión lineal con concentraciones de trolox entre 0.2 y 10 µg/mL.

5.9.2.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.7.5, se utilizaron concentraciones de trolox de 1.22, 2.95 y 4.7 µg/mL para calcular las desviaciones estándar relativas de las señales, desviaciones estándar relativas de los porcentajes de reducción y el factor Z.

5.9.2.5 Robustez.

Se evaluaron pequeñas variaciones en la concentración y el ajuste de ABTS (Tabla 4), utilizando una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

TABLA 4
VARIABLES PARA ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE ABTS

Concentración de ABTS (%)	65
	75
Ajuste ABTS (Absorbancia)	0.65
	0.75
Solvente	Agua (25%)
	DMSO (0.25 %)
	DMSO (0.15 %)

5.10 Método de Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.

El método de inhibición de α -glucosidasa permite evaluar compuestos con potencial actividad antihiper glucémica y se basa en la detección del p-nitrofenol liberado del p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido por acción de la enzima α -glucosidasa a 405 nm. Cuando el compuesto o extracto de prueba inhibe la

enzima, se observa una disminución de la absorbancia. La reacción se muestra en la Figura 5.

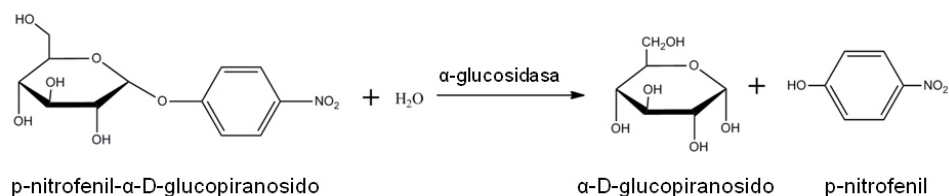


Figura 5. Reacción de α -Glucosidasa.

5.10.1 Optimización.

Con el propósito de determinar la Concentración Inhibitoria media de Acarbosa, se realizó el método en macroduplicación reportado por Apostolidis et al. (2011). Brevemente, 500 μ L de diferentes concentraciones de acarbosa (control positivo) se mezclaron con 250 μ L de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (0.415 mM en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.8). Se pre-incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 250 μ L de la enzima α -glucosidasa (concentración final 8.33 mU/mL en amortiguador de fosfatos). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 2 mL de Carbonato de sodio (concentración final 133.3 mM). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis a 405 nm. Se utilizó como blanco solución amortiguadora de fosfatos y como control positivo acarbosa. Se calculó el porcentaje de inhibición (Fórmula 1).

Los porcentajes de inhibición se graficaron en función a sus concentraciones. A partir de la curva de regresión, se interpoló la concentración que inhibe efectivamente el 50 % de la α -glucosidasa (CI_{50}).

Para iniciar propiamente la optimización se utilizó el programa computacional STATGRAPHICS XVI Centurion (Statpoint Technologies, Inc., EUA) para generar un método factorial fraccionado de un dieciseisavo de fracción 2^{9-4} , sin bloques, aleatorizado y con una réplica. Las variables incluidas en la optimización del método se muestran en la Tabla 5. Se realizaron 64 experimentos y se empleó el porcentaje de inhibición como respuesta. Los datos obtenidos se analizaron y se obtuvo un diagrama de Pareto. Las variables que tuvieron efecto significativo sobre la respuesta se optimizaron a través del método simplex secuencial básico.

5.10.2 Cinética Enzimática.

Se llevó a cabo una cinética enzimática variando las concentraciones finales de sustrato entre 2 y 476 $\mu\text{g/mL}$. Se calculó la Constante de Michaelis-Menten (K_m), la Velocidad inicial (V_0) y Velocidad máxima (V_{max}), tal como se indica en la sección 5.6.

TABLA 5

CONDICIONES INICIALES DEL MÉTODO DE α -GLUCOSIDASA

Variables	Nivel 1	Nivel 2
Concentración de la enzima (U/mL)	0.1	1.0
Concentración del sustrato (mM)	0.5	2.5
Concentración del amortiguador de fosfatos (mM)	50	100
pH	6.8	7.0
Temperatura de incubación (°C)	25	37
Tiempo de pre-incubación (min)	5	15
Tiempo de incubación	5	30
Concentración de albúmina (mg/mL)	0.1	2.0
Concentración de carbonato (m)	100	200

5.10.3 Validación.

5.10.3.1 Linealidad.

La linealidad se evaluó a través de las aproximaciones 1 y 2 descritas en la sección 5.7.1:

1. Se evaluaron concentraciones del control positivo acarbosa en concentraciones finales de 10 a 400 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador de fosfatos.
2. Se adicionaron entre 100 y 400 $\mu\text{g/mL}$ de acarbosa a un extracto de *J. dioica* que no posee actividad de inhibición enzimática.

5.10.3.2 Precisión y Exactitud.

A un extracto de *J. dioica* se le adicionó acarbosa a 3 niveles de concentración (99, 201 y 261 $\mu\text{g/mL}$), por triplicado. Se estableció la precisión y exactitud de acuerdo al procedimiento descrito en las secciones 5.7.2 y 5.7.3, respectivamente.

5.10.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

Se realizó una regresión lineal con concentraciones soluciones de acarbosa entre 10 y 400 $\mu\text{g/mL}$.

5.10.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección 5.7.5 con concentraciones de acarbosa de 100, 180 y 310 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador de fosfatos.

5.10.3.5 Robustez.

Se evaluaron pequeñas variaciones en la concentración del sustrato, la concentración de la enzima, y el tiempo y temperatura de incubación (Tabla 6). El análisis de los resultados se llevó a cabo por medio de una prueba de tukey.

TABLA 6

VARIABLES PARA ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE α -GLUCOSIDASA

Concentración del sustrato (μM)	101.5
	121.5
Concentración de enzima (U/mL)	0.45
	0.65
Temperatura de incubación ($^{\circ}\text{C}$)	35
	39
Tiempo de incubación (min)	15
	20
Solvente de la muestra	0.65 U/mL
	Etanol (25 %)
	DMSO (0.25 %)
	DMSO (0.15 %)

5.11 Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.

El ensayo de inhibición de α -amilasa, se inicia con la reacción enzimática sobre el almidón, en la que se producen azúcares reductores. Posteriormente, estos azúcares reductores se cuantifican por el método de Miller (1959), el cual se basa en la reacción entre estos azúcares y el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), produciéndose el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. El producto de reacción se detecta por un cambio de la coloración amarillo a rojo y se mide espectrofotométricamente a 540 nm. Si el compuesto prueba inhibe la enzima, no se debería presentar cambio de coloración. La reacción se muestra en la Figura 6.

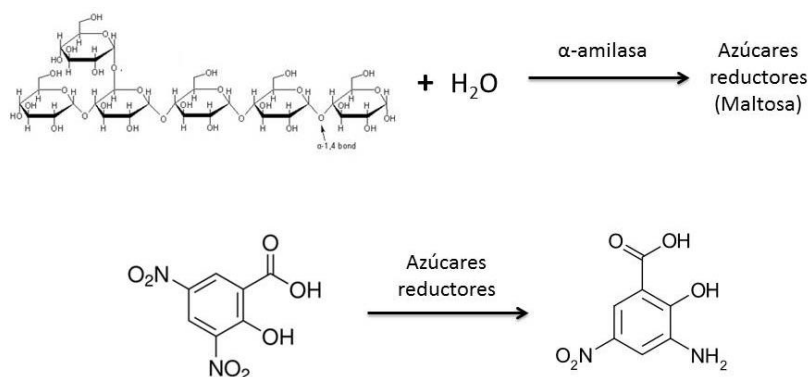


Figura 6. Reacción de la Enzima α -Amilasa y Reacción de Miller.

5.11.1 Optimización.

Con el propósito de determinar la Concentración Inhibitoria media de Acarbosa, se realizó el método reportado por Tundis et al. (2007). Brevemente, 500 μ L de distintas concentraciones de acarbose, se mezclaron con 250 μ L de α -amilasa (8 U/mL), 750 μ L de un amortiguador de fosfatos (20 mM pH 6.9 con

NaCl 6 mM) en un tubo. Se tomaron 500 μ L de esta mezcla y se agregaron 500 μ L de almidón (1 %). Se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción agregando 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se colocaron los tubos en un baño de agua en ebullición por 5 minutos. Se retiraron los tubos del baño de agua y se diluyeron con 10 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis a 540 nm. Se utilizó como blanco la solución amortiguadora de fosfatos y como control positivo acarbosa. Se calculó el porcentaje de inhibición (Fórmula 1) y la CI_{50} de la misma forma que para α -glucosidasa.

Se utilizó un diseño factorial fraccionado de media fracción 2^{6-1} , sin bloques, aleatorizado y con una réplica, que se llevó a cabo con el programa computacional STATGRAPHICS XVI Centurion (Statpoint Technologies, Inc., EUA). Las variables incluidas en la optimización del método se presentan en la Tabla 7. Se realizaron 64 experimentos y se empleó el porcentaje de inhibición como respuesta. Los datos obtenidos se analizaron y se obtuvo un diagrama de Pareto. Las variables que tuvieron un efecto significativo se optimizaron a través del método simplex secuencial básico.

5.11.2 Cinética Enzimática.

Se realizó la cinética enzimática variando las concentraciones de almidón entre 0.03 y 0.6 mg/mL. Se determinó K_m , V_0 y V_{max} , de acuerdo a la sección 5.6.

TABLA 7

CONDICIONES INICIALES DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA

Variable	Nivel 1	Nivel 2
Concentración de la enzima (U/mL)	0.15	2.49
Concentración de almidón (mg/mL)	0.51	0.99
Temperatura (°C)	25	37
Tiempo de pre-incubación (min)	5	10
Tiempo de incubación (min)	5	10
Tiempo en el baño de agua (min)	5	15

5.11.3 Validación.

5.11.3.1 Linealidad.

La linealidad se evaluó por dos aproximaciones.

1. Se utilizó acarbosa (control positivo) a concentraciones de 0.5 a 12 $\mu\text{g/mL}$ en solución de amortiguador de fosfatos.
2. Se adicionó acarbosa entre 0.5 a 12 $\mu\text{g/mL}$ a un extracto de *J. dioica*.

5.11.3.2 Precisión y Exactitud.

Un extracto de *J. dioica* se adicionó con acarbosa a 3 niveles de concentración: 1, 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$. Se siguió el procedimiento descrito en las secciones 5.7.2 y 5.7.3 para establecer la precisión y exactitud, respectivamente.

5.11.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

Se llevó a cabo una regresión lineal con soluciones de acarbosa de concentraciones entre 0.5 y 12 µg/mL.

5.11.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección 5.7.5, utilizando las concentraciones de acarbosa de 1.5, 2.5 y 5 µg/mL en amortiguador de fosfatos. Se determinaron las desviaciones estándar relativas de las señales, las desviaciones estándar relativas del porcentaje de inhibición y el factor Z.

5.11.3.5 Robustez.

Se evaluaron pequeñas variaciones en la concentración de la enzima, tiempo de pre-incubación, tiempo de incubación y tiempo en el baño de agua (Tabla 8). El análisis de los resultados se llevó a cabo por medio de una prueba de tukey ($\alpha= 0.05$).

TABLA 8
CONDICIONES DE ROBUSTEZ PARA EL MÉTODO DE α -AMILASA

Concentración de enzima (U/mL)	0.10
	0.20
Tiempo de pre-incubación (min)	5.2
	9.2
Tiempo de incubación (min)	4.5
	6.5
Tiempo de baño de agua (min)	10.6
	20.6
Solvente de la muestra	Etanol (25 %)
	DMSO (0.15 %)
	DMSO (0.25%)

5.12 Aplicación de los Ensayos Optimizados y Validados a Extractos de Plantas.

Una vez que todos los ensayos *in vitro* y a microescala fueron optimizados y validados, se utilizaron para evaluar la actividad de 30 diferentes extractos de plantas proporcionados amablemente por distintos miembros del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL.

5.12.1 Método de Reducción de DPPH.

Se pesó 1 mg de cada uno de los extractos y se disolvió en 1 mL de etanol, algunos de ellos se sonicaron para lograr su completa disolución. A continuación, se tomaron 100 μL de distintas concentraciones de extracto (concentraciones finales entre 0.13 a 250 $\mu\text{g/mL}$) y se mezclaron con 100 μL de DPPH (concentración final de 140 μM en etanol). Se incubó por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Multiskan FC Thermo Scientific. En cada experimento se incluyó un blanco de muestra que no contenía DPPH y un control negativo (0 % de reducción), al que no se le agregó ningún agente reductor. El porcentaje de reducción se calculó utilizando la Fórmula 1. Los porcentajes de reducción se graficaron en función a sus concentraciones. A partir de la curva se interpoló la concentración que reduce efectivamente el 50% del DPPH (CE_{50}).

El método de reducción de DPPH se aplicó a los extractos que se enlistan en la Tabla 9.

TABLA 9
EXTRACTOS DE PLANTAS UTILIZADOS EN LOS MÉTODOS DE DPPH Y ABTS

	Muestras
1	Extracto metanólico de <i>Juglans mollis</i>
2	Extracto de acetato de etilo de <i>J. mollis</i>
3	Extracto butanólico de <i>J. mollis</i>
4	Residuo acuoso de <i>Ceanothus caeruleus</i>
5	Extracto metanólico de <i>Quercus canbyira</i>
6	Extracto de <i>Turnera diffusa</i> (Marín)
7	Extracto metanólico 50 % de <i>Hamelia patens</i>
8	Extracto acuoso de <i>J. mollis</i>
9	Extracto butanólico de <i>H. patens</i>
10	Extracto de <i>Turnera diffusa</i> (Montemorelos)
11	Extracto metanólico 70% <i>H. patens</i>
12	Extracto <i>L. frutescens</i>
13	Extracto metanólico de oreganillo
14	Extracto 2
15	Extracto de metanol: agua (90:10) de <i>Salvia Texana</i>
16	Extracto metanólico precipitado de <i>H. patens</i>
17	Extracto metanólico 50% de <i>T. diffusa</i>
18	Extracto 1
19	Extracto de cardo <i>Persea americana</i>
20	Extracto metanol: agua (90:10) <i>Salvia beatiflora</i>
21	Extracto metanólico de <i>H. patens</i>
22	Extracto de Cáscara de uva victoria
23	Extracto crudo <i>H. patens</i>
24	Extracto 3
25	Extracto metanólico 100% <i>H. patens</i> metanol
26	Extracto hexánico de <i>H. patens</i>
27	Extracto de Cáscara y semilla de uva victoria
28	Extracto hidroalcolico 2 de <i>J. dioica</i>
29	Extracto 4
30	Extracto 5

5.12.2 Método de Reducción de ABTS.

Se disolvió 1 mg de cada uno de los extractos en 1 mL de etanol, algunos de ellos se sonicaron para lograr su completa disolución. Brevemente, 60 μL de diferentes concentraciones de extracto (concentración final 0.3 a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se mezclaron con 140 μL de la solución de ABTS^{*+} ($A= 0.7$). Se incubó por seis minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias en el lector de placas Multiskan FC, Thermo Scientific a 750 nm. En cada experimento se incluyó un blanco de muestra que no contenía ABTS^{*+} y un control negativo (0% reducción), al cual no se le añadió ningún agente reductor. El porcentaje de reducción se calculó utilizando la Fórmula 1. La CE_{50} se determinó como se describió en el método anterior.

El método de reducción de ABTS se aplicó a los extractos que se enlistan en la Tabla 9.

5.12.3 Método de Inhibición de α -Glucosidasa.

Se pesó 1 mg de cada uno de los extractos y se disolvió en 500 μL de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 6.8), algunos de ellos se sonicaron para lograr su completa disolución. Brevemente, se mezclaron 33 μL de diferentes concentraciones de extracto (concentración final 20.6 a 660 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 17 μL de p-NPG (concentración final de 33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), esta mezcla se incubó por 5 min a 37°C. Posteriormente se agregaron 17 μL de enzima α -glucosidasa (concentración final 46.75 mU/mL) y se incubó por 17.5 minutos a 37 °C. Finalmente se agregaron 133 μL de Carbonato de Sodio (concentración final

66.5 Mm). Se midió la absorbancia en un lector de placas a 405 nm. El valor de absorbancia del blanco de muestra o estándar se resta a los valores de absorbancia de su muestra o estándar. Se realizó un control negativo (sin inhibidor) para el cálculo del porcentaje de inhibición como se indica en la fórmula 1. La CI_{50} se determinó como en los métodos anteriores se determinó la CE_{50} .

El método de inhibición de α -glucosidasa se aplicó a los extractos que se enlistan en la Tabla 10.

5.12.4 Método de Inhibición de α -Amilasa.

Se pesó 1 mg de cada uno de los extractos y se disolvió en 1 mL de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 6.9), algunos de ellos se sonicaron para lograr su completa disolución. En un tubo se mezclaron con 100 μ L de diferentes concentraciones de extracto (concentraciones finales 6 a 200 μ g/mL) y 100 μ L de α -amilasa (concentración final 0.15 U/mL en amortiguador de fosfatos), y se incubó por 7.2 min a 37 °C. Se añadieron 100 μ L de almidón (concentración final 0.38 mg/mL) e incubaron por 5.5 min a 37 °C. Se agregaron 200 μ L de DNS (concentración final 19.2 mM) y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 15.6 min. Se enfriaron y transfirieron 100 μ L a una placa de 96 pozos y se diluyeron con 100 μ L de agua. Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Multiskan FC, Thermo Scientific. En cada experimento se incluyó un blanco de muestra o estándar (sin enzima). El valor de absorbancia del blanco de muestra o estándar se resta a los valores de absorbancia de su

TABLA 10

**EXTRACTOS DE PLANTAS UTILIZADOS EN LOS MÉTODOS DE α -
AMILASA Y α -GLUCOSIDASA**

	Muestra
E1	Residuo acuoso de <i>Ceanothus caeruleus</i>
E2	Extracto butanólico de <i>Juglans mollis</i>
E3	Extracto metanólico de <i>J. mollis</i>
E4	Extracto de acetato de etilo de <i>J. mollis</i>
E5	Extracto acuoso de <i>J. mollis</i>
E6	Extracto metanólico de uña de gato
E7	Extracto de Acetato de etilo 3
E8	Extracto metanólico de Hierba de San Nicolás
E9	Extracto hidroalcolico 2 de <i>J. dioica</i>
E10	Extracto metanólico de nogalillo
E11	Extracto butanólico de <i>H. patens</i>
E12	Extracto metanólico de <i>H. patens</i>
E13	Extracto crudo de <i>H. patens</i>
E14	Extracto metanólico 70% <i>H. patens</i>
E15	Extracto hexánico de <i>J. mollis</i>
E16	Extracto crudo de <i>Persea americana</i>
E17	Extracto de acetato de etilo de <i>H. Patens</i>
E18	Extracto metanólico 100% <i>H. patens</i> metanol
E19	Extracto hexánico de <i>H. patens</i>
E20	Extracto de metanol: agua (90:10) de <i>Salvia Texana</i>
E21	Extracto metanol: agua (90:10) <i>Salvia beatiflora</i>
E22	Extracto de Cáscara y semilla de uva victoria
E23	Extracto de Cáscara de uva victoria
E24	Extracto 1
E25	Extracto 2
E26	Extracto 3
E27	Extracto 4
E28	Extracto 5
E29	Extracto de Oreganillo 22
E30	Extracto de Higuera 12

muestra o estándar. Se realizó un control negativo (sin inhibidor) para el cálculo del porcentaje de inhibición como se indica en la fórmula 1. La CI_{50} se determinó como se indica en los métodos anteriores.

El método de inhibición de α -amilasa se aplicó a los extractos que se enlistan en la Tabla 10.

5.13 Evaluación de Extractos en Modelos *in vivo*.

5.13.1 Actividad Hepatoprotectora.

Los experimentos para determinar la actividad hepatoprotectora se llevaron a cabo en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario de la UANL. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

En el modelo de hepatoprotección se utilizaron ratas Wistar (machos y hembras) de un peso entre 100-200 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar. Todos los animales fueron tratados bajo la guía ética para protección animal de la Facultad de Medicina, UANL. El agua y alimento fue proporcionado *ad libitum*.

Un día antes de iniciar el procedimiento los especímenes se pusieron en ayuno. Se formaron 4 grupos con 5 ratas cada uno:

1. Grupo 1 (Control negativo, vehículo). Se administró el equivalente a 2 mL de aceite de oliva por kilogramo del animal (i.p.), 24 horas después se realizó la toma de sangre.
2. Grupo 2 (Control de toxicidad aguda). Se administró CCl₄ al 20% en aceite de oliva (2 mL/kg i.p.), 24 horas después se realizó la toma de sangre.
3. Grupo 3 (Control de hepatoprotección). Se administró Legalón® 50 mg/kg, disuelto en agua, por vía oral cada 24 horas por 7 días. El día 8 se administró CCl₄ al 20% en aceite de oliva (2mL/kg i.p.). El día 9 se realizó la toma de sangre.
4. Grupo 4 (Grupos de prueba). Se administraron los extractos en dosis de 100 mg/kg por vía oral cada 24 horas por 7 días. El día 8 se administró CCl₄ al 20% en aceite de oliva (2mL/kg i.p.). El día 9 se realizó la toma de sangre.

La sangre se colectó de la punta de la cola y se centrifugó a 1500 x g por 15 minutos para obtener el suero. Se determinó la actividad de las enzimas hepáticas alaninaaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST) en el equipo ILAB- 300 plus (Clinical Chemistry System) utilizando los kits correspondientes.

5.13.2 Actividad Antihiperglucemiante.

Los experimentos para determinar la actividad antihiperglucemiante *in vivo* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación

Farmacológica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

En el modelo de actividad antihiperglucemiante se utilizaron ratas Wistar machos, normoglucémicos con un peso promedio de 220 g. Todos los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Medicina (UAEM), a una temperatura entre 25 y 26 °C, con humedad relativa de 40 a 50 % y un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (07:00 am - 19:00 pm) durante todo el período del estudio, además se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales fueron tratados bajo los códigos de ética internacionales para el trato de animales de laboratorio.

Todos los especímenes tuvieron un ayuno de 5 horas previas al desarrollo experimental. Se formaron 5 grupos de 5 ratas cada uno:

1. Grupo 1 (Control negativo). Vehículo: agua (1 mL/Kg), vía oral (v.o.).
2. Grupo 2 (Control de hiperglucemia con almidón de maíz): Se administró 1g/kg de almidón de maíz en agua destilada, v.o.
3. Grupo 3 (Control antihiperglucemiante, compuesto puro): Se administró vía oral una mezcla de: 1 g/kg de almidón de maíz con 0.5 mg/kg de acarbosa en agua destilada.
4. Grupo 4 (Control antihiperglucemiante, extracto vegetal): Se administró vía oral una mezcla de: 1 g/kg de almidón de maíz con 0.5 mg/kg de un hidrolizado proteínico de leguminosa (PPHT) en agua destilada.

5. Grupo 5 (Grupo de prueba): Se administraron vía oral mezclas de: 1g/kg de almidón de maíz con dosis de 0.5, 2.5, 5 y 50 mg/kg de extracto en agua destilada.

Después del ayuno se registró la glucosa basal en sangre total (extraída de la punta de la cola) con ayuda de un glucómetro portátil (Optium Xceed, Abbot). Una vez realizada la administración vía oral de la carga de carbohidratos (almidón de maíz 1 g/kg) con o sin inhibidor (acarbosa, PPHT o extracto de prueba), se midió la glucosa a los 15, 30, 45, 60 y 120 min. Con los datos de cada grupo se construyeron curvas de glucemia normalizada con el programa Origin 8 y se determinó la reducción del pico de glucosa.

CAPITULO 6

RESULTADOS

6.1 Método de Reducción del Radical Libre DPPH.

6.1.1 Información Bibliográfica.

En la Tabla 11 se enlistan catorce referencias que utilizaron el mismo método de reducción del radical DPPH y quercetina como control positivo. Para la etapa de optimización se consideraron las condiciones experimentales en las que se observaron diferencias significativas, es decir, concentración de DPPH, tiempo de incubación, condiciones de trabajo y solvente.

TABLA 11

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO DE DPPH

Autor	Concentración DPPH (µM)	Tiempo incubación (min)	Oscu-ridad	λ (nm)	Solvente	CE₅₀ (µg/mL) de Quercetina	Método de referencia
Burits y Bucar, 2000	101.5	30	n.i.	517	meOH	1.31	Cuendet et al., 1997; Kirby y Schmidt, 1997
Siatka y Kašparová, 2010	60.0	30	si	517	meOH	1.4	Brand-Williams et al., 1995; Chen et al., 1999; Masuda et al., 1999
Iacopini et al., 2008	120.0	n.i.	n.i.	515	meOH	1.66	Brand-Williams et al., 1995
Pérez-Meseguer et al., 2010	125.0	30	si	517	etOH	2.35	Leu et al., 2006
Lee et al., 2009	60.0	c/15	n.i.	515	meOH	2.72	Brand-Williams et al., 1995
Maksimović et al., 2008	500.0	30	si	517	meOH	2.75	Cuendet et al., 1997
Ebrahimzadeh et al., 2010	100.0	15	n.i.	517	meOH	5.2	n. i.
Jiang et al., 2006.	100.0	c/15	n.i.	517	meOH	6.337	Sang et al., 2002; Lu y Yeap Foo, 2000
Lam et al., 2012	1.0	30	si	517	meOH	6.48	Tagashira y Ohtake, 1998
Beevi et al., 2010	101.5	30	n.i.	517	meOH	11	Tagashira y Ohtake, 1998
Quispe et al., 2012	60.0	30	n.i.	517	meOH	29.3	Simirgiotis et al., 2009
Sadek et al., 2009	5000.0	no indica	n.i.	515	meOH	36	Brand-Williams et al., 1995
Roussis et al., 2008	60.0	40	n.i.	515	meOH	1600	Larrauri et al., 1998
Ghasemi et al., 2009	100.0	15	n.i.	517	meOH	19300	Ebrahimzadeh y Hosseinimehr, 2008; Ebrahimzadeh et al., 2008a; Ebrahimzadeh et al., 2008b

CI₅₀: Concentración efectiva media. DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. etOH: Etanol. meOH: Metanol. λ: Longitud de onda. n.i.: no indicado.

Además, se evaluó la longitud de onda, ya que en el equipo con el que se realizó este trabajo no cuenta con el filtro recomendado de 517 nm.

6.1.2 Optimización.

A partir del método en macrodilución de DPPH se obtuvo la concentración efectiva media (CE_{50}) de quercetina; 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se utilizó para realizar los experimentos de optimización.

Como resultado de los experimentos del diseño factorial de media fracción (2^{5-1}) se obtuvo el diagrama de Pareto (Figura 7), con el cual se estableció que la concentración de DPPH, la longitud de onda, el solvente y la interacción entre ellas, son las condiciones que producen una variación significativa en la respuesta.

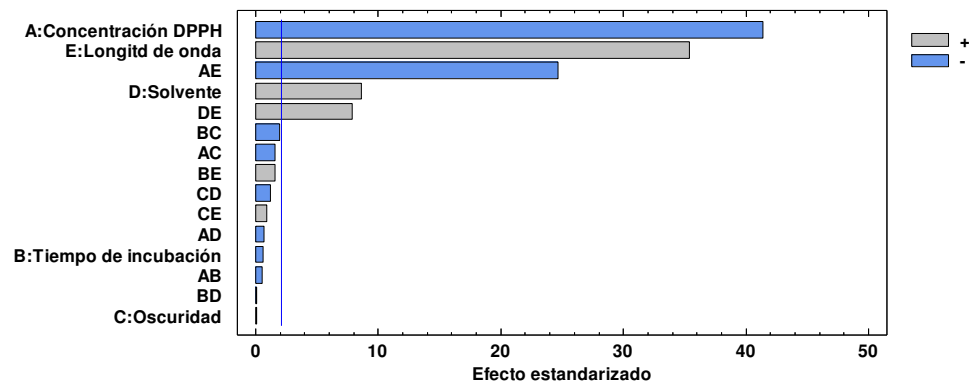


Figura 7. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Ensayo de DPPH.

De acuerdo al método simplex secuencial básico se plantearon 4 experimentos (Fórmula 2, sección 5.5). Se utilizaron los mismos niveles altos y bajos que en el diseño factorial (Tabla 1), además de los valores medios de

esas condiciones. Se realizaron los experimentos y se calculó el porcentaje de reducción de DPPH, los resultados se presentan en la Tabla 12.

TABLA 12
EXPERIMENTO SIMPLEX SECUENCIAL BÁSICO PARA EL
MÉTODO DE DPPH

Experimento	[DPPH] (μM)	λ (nm)	Solvente	% Reducción	Abs	Abs _{Control}
1	60	450	Metanol	29.2	0.0880	0.1280
2	500	450	Metanol	7.4	0.6480	0.6920
3	280	540	Metanol	24.4	0.6170	0.8440
4	280	540	Etanol	33	0.5160	0.7500

λ : Longitud de onda. Abs: Absorbancia

Como resultado del método simplex secuencial básico se decidió que las condiciones del experimento número 4 son las óptimas.

En la Tabla 13 se presenta el método resultado del proceso de optimización.

TABLA 13
MÉTODO OPTIMIZADO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL LIBRE DPPH

	Blanco	Control negativo	Blanco de muestra	Muestra
Etanol	100 μL	100 μL	100 μL	
DPPH (280 μM)		100 μL		100 μL
Muestra Problema (diferentes concentraciones)	100 μL		100 μL	100 μL
	Incubar por 15 min. en oscuridad			
	Medir Abs a 540 nm			

Abs: Absorbancia

6.1.3 Validación.

6.1.3.1 Linealidad.

La linealidad se evaluó por 3 diferentes enfoques:

1. En la Figura 8 se presenta la curva de regresión obtenida con los porcentajes de reducción de DPPH en función de las concentraciones de quercetina. Se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9941 y una pendiente de 9.7588. El rango lineal se estableció entre 0.5 y 8 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, equivalentes a 7.2 - 121.7 μM de DPPH. La CE_{50} fue de $4.3 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ de quercetina.
2. En la figura 9 aparece la curva de calibración obtenida con los porcentajes de reducción de DPPH en función de la quercetina adicionada a un extracto. El coeficiente de determinación fue de 0.9914 y el valor de la pendiente de 9.8482. El rango lineal fue de 0.5 a 8 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, equivalente a 7.04 - 125 μM de DPPH. La CE_{50} fue de $4.3 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ de quercetina.
3. En la figura 10 se muestra la curva de calibración de DPPH en etanol. Se obtuvo un r^2 de 0.9987. El rango lineal fue de 7 a 140 μM de DPPH.

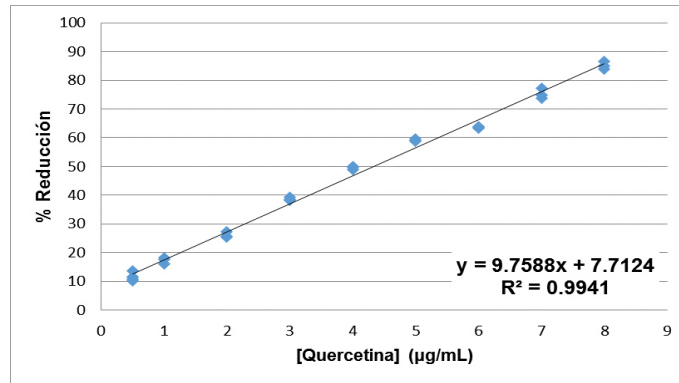


Figura 8. % Reducción de DPPH por Quercetina. $\lambda = 540 \text{ nm}$.

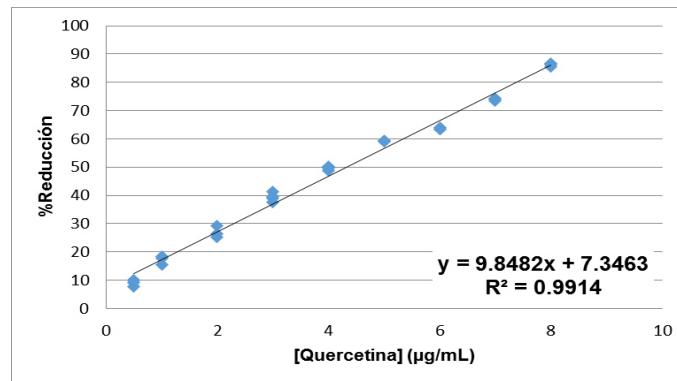


Figura 9. % Reducción de DPPH por el extracto Adicionado con Quercetina. $\lambda = 540 \text{ nm}$.

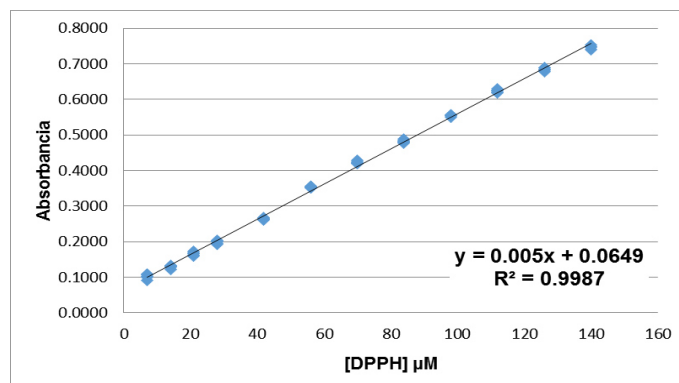


Figura 10. Curva de Calibración de DPPH en etanol. $\lambda = 540 \text{ nm}$.

6.1.3.2 Precisión y Exactitud.

En la Tabla 14 se muestran los resultados para la evaluación de precisión (intradía e interdía) y exactitud de este método.

En la Figura 11 se presenta la curva de regresión para la evaluación de la correlación entre la concentración de quercetina calculada y la real. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9914 y una pendiente de 0.9961.

TABLA 14
PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO DE DPPH

Nivel de Adición	[Quercetina] µg/mL	% DER	% DER (interdía)	% Error
Alta	8	1.75	2.64	1.55
Media	4	6.80	6.79	-5.19
Baja	0.5	1.57	2.64	-5.81

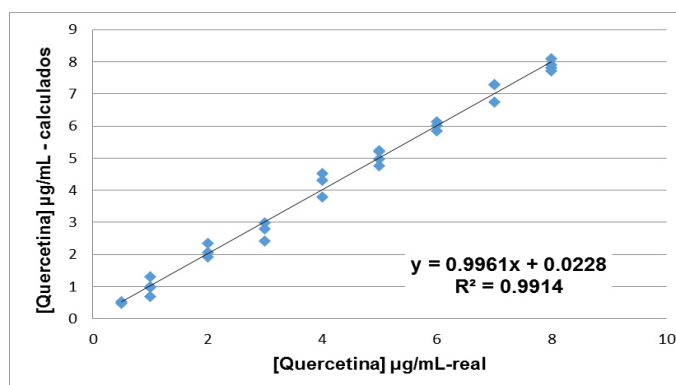


Figura 11. Evaluación de la Correlación de Concentración de Quercetina Calculada y Real por el Método de DPPH.

6.1.3.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

Se estableció que 0.5 µg/mL de quercetina (correspondientes a 121.7 µM de DPPH) es el límite de cuantificación para este método. El límite máximo de

cuantificación a una concentración de 8 µg/mL de quercetina (correspondientes a 9.22 µM de DPPH).

6.1.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.

En la Tabla 15 se presenta la desviación estándar relativa para cada señal, en las diferentes placas. Se calculó la % DER de inhibición y % DER para la señal media de cada una de las placas (Tabla 16).

TABLA 15

DESVIACION ESTANDAR RELATIVA DE LAS SEÑALES DE DPPH

	% DER Día 1			% DER Día 2		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Señal Máxima (CI₂₀)	1.39	1.22	2.13	9.47	6.96	4.11
Señal Media (CI₅₀)	5.77	5.74	2.04	6.06	3.57	3.14
Señal Mínima (CI₈₀)	12.7	6.60	4.56	1.77	1.98	0.73

TABLA 16

DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LOS PORCENTAJES DE REDUCCIÓN

	Día 1		Día 2	
	% Reducción	% DER	% Reducción	% DER
Placa 1	42.56	13.88	45.86	13.66
Placa 2	41.69	13.53	44.70	7.98
Placa 3	42.19	5.27	45.55	7.21

Se calculó el factor Z en cada placa. En todos los casos el factor Z fue mayor 0.94. Los resultados se presentan en la Tabla 17.

TABLA 17
FACTOR Z PARA EL MÉTODO DE DPPH

	Día 1	Día 2
	Factor Z	Factor Z
Placa 1	0.94	0.96
Placa 2	0.97	0.96
Placa 3	0.97	0.98

6.1.3.5 Robustez.

En la Tabla 18 se presentan los resultados de robustez del método optimizado evaluados con la prueba de Tukey.

TABLA 18
ROBUSTEZ PARA EL MÉTODO DE DPPH

Variable Óptima	Cambios a variable óptima	Resultado
[DPPH] (280 mM)	285	% Reducción No son diferentes
	275	% Reducción No son diferentes
Solvente (Etanol)	Agua (25 %)	% Reducción No son diferentes
	DMSO (0.25 %)	% Reducción No son diferentes
	DMSO (0.15 %)	% Reducción No son diferentes

6.2 Método de Reducción del Radical Libre ABTS.

6.2.1 Información Bibliográfica.

En la Tabla 19 se enlistan 11 referencias en que se utilizó el mismo fundamento para la reducción del radical libre ABTS (Figura 4) y que además

utilizaron como control positivo trolox. De estos antecedentes se eligió optimizar las variables experimentales con modificaciones: concentración de ABTS (ajuste a una absorbancia), cantidad de ABTS, solvente, luz u oscuridad, tiempo y temperatura de incubación.

6.2.2 Optimización.

A partir del método en macrodilución de ABTS se obtuvo la concentración efectiva media (CE_{50}) de trolox; 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se utilizó para realizar los experimentos de optimización.

Como resultado del diseño factorial completo se obtuvo un diagrama de Pareto (Figura 12), con el que se seleccionaron las condiciones con mayor efecto sobre la respuesta en este método: concentración de ABTS (ajuste de absorbancia y porcentaje) y solvente, así como la interacción con la condición de trabajo (luz/oscuridad).

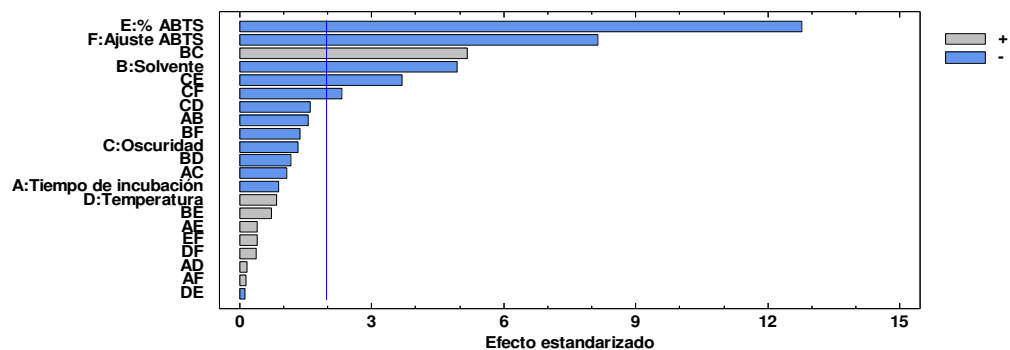


Figura 12. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Método de ABTS.

TABLA 19

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA EL MÉTODO DE ABTS

Autor	Ajuste de Abs. ABTS	Concentración de ABTS (%)	Tiempo incubación (min)	Solvente	Oscuridad	Temperatura de incubación (°C)	CE ₅₀ (µg/mL) de Trolox	Método de referencia (que usaron los autores)
Kamatou et al., 2010	n.i.	95.0	4	n.i.	n.i.	n.i.	2.43	Moolla et al., 2007
Snijman et al., 2009	Abs=0.7	95.0	4	Etanol	n.i.	30	2.85	Re et al., 1999
Tapondjou et al., 2011	Abs=0.7	90.0	1	AF	n.i.	30	3.13	Esparza-Rivera et al., 2006
Tan et al., 2003	n. i.	99.5	12	AF	n.i.	30	3.88	Re et al., 1999
Puangpronpitag et al., 2008	Abs=0.7	99.0	6	n.i.	n.i.	ni	5.05	Re et al., 1999
Wu et al., 2007	Abs=0.8	87.5	ni	Etanol	n.i.	ni	11.31	Re et al., 1999
Ponou et al., 2010	Abs=0.8	n.i.	30	AF	si	37	19.898	Re et al., 1999
Chung et al., 2011	Abs=0.8	50.0	6	Metanol	si	n.i.	22.51	Thana et al., 2008
Kim et al., 2010	Asb=0.7	90.0	6	Etanol	si	Amb.	23.53	Re et al., 1999
Ng et al., 2009	n.i.	82.0	ni	AF	n.i.	n.i.	29.104	Re et al., 1999
Boussaada et al., 2007	Abs=0.7	99.0	6	AF	si	37	273	Re et al., 1999; Tiwari & Tripathi, 2007

Abs: Absorbancia. ABTS: ácido 2-2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). AF: Amortiguador de Fosfato de potasio. CE₅₀: Concentración efectiva media. n.i.: no indicado.

De acuerdo al método simplex secuencial básico se plantearon inicialmente 5 experimentos, aunque en total se realizaron 6. Se determinaron los porcentajes de reducción. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

TABLA 20
SIMPLEX SECUENCIAL BÁSICO PARA EL MÉTODO ABTS

Experimento	Ajuste ABTS (Abs)	Concentración ABTS (%)	Solvente	Oscuridad	% Reducción
1	0.7	50	Etanol	Luz	72
2	0.7	50	AF	Oscuridad	66
3	0.7	50	AF	Luz	36
4	0.8	99	Etanol	Oscuridad	31
5	0.8	99	Etanol	Luz	17
6	0.65	25.5	AF	Oscuridad	98

Abs: Absorbancia. AF: amortiguador de fosfatos.

Los mejores porcentajes de reducción se obtuvieron en el experimento 6, sin embargo, la concentración de ABTS fue demasiado baja, con valores de absorbancia bajos, por lo que fue descartado también. Se decidió tomar las condiciones del primer experimento y realizar una optimización clásica de la concentración de ABTS.

Concentraciones entre 70 y 90 % de ABTS fueron evaluadas adicionando la misma concentración de trolox en todos los casos (3 µg/mL). La prueba se realizó por triplicado. Los resultados aparecen en la Tabla 21.

La mejor condición fue utilizar concentración de ABTS al 70%, ya que obtuvo el porcentaje de reducción cercano al 50 % y valores de absorbancia aceptables para el control negativo.

TABLA 21
OPTIMIZACIÓN DEL PORCENTAJE DE ABTS

% ABTS	Abs control negativo	% Reducción	% DER
90	0.5645	40.76 ± 2.6	6.46
80	0.4811	41.92 ± 3.8	9.21
70	0.4362	49.37 ± 3.4	7.08

Abs: Absorbancia. % DER: Desviación estándar relativa.

En la Tabla 22 se presenta el método resultado del proceso de optimización.

TABLA 22
MÉTODO OPTIMIZADO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL LIBRE ABTS

	Blanco	Control negativo	Blanco de muestra	Muestra
Etanol	140 µL	60 µL	140 µL	
ABTS (Abs = 0.7)		140 µL		140 µL
Muestra Problema (diferentes concentraciones)			60 µL	60 µL
	Incubar por 6 min. en oscuridad			
	Medir Abs a 750 nm			

Abs: Absorbancia

6.2.3 Validación.

6.2.3.1 Linealidad.

Se estableció la linealidad tomando en cuenta tres aproximaciones diferentes:

1. En la Figura 13 se presenta la curva de regresión obtenida con los porcentajes de reducción de ABTS^{•+} en función de las concentraciones de trolox. Se estableció el intervalo lineal para éste método entre 0.25 a 6 µg/mL de trolox, equivalente a 2.9 – 70 % de ABTS. Se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9947 y una pendiente de 16.54. La CE_{50} fue de 3.13 ± 0.08 µg/mL de trolox.
2. En la figura 14 se presenta la curva de regresión que se obtuvo con los porcentajes de reducción de ABTS^{•+} en función del trolox adicionado a un extracto. El coeficiente de determinación fue de 0.995, la pendiente de 14.734 y el intervalo lineal de 0.25 a 6 µg/mL de trolox, equivalente a 5.25 – 66 % de ABTS. La CE_{50} fue de 3 ± 0.05 µg/mL de trolox.
3. En la Figura 15 se muestra la curva de calibración de ABTS^{•+} en etanol, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9991 y un rango lineal entre 1 y 70% de ABTS. En la Figura 15 se presenta la curva de calibración.

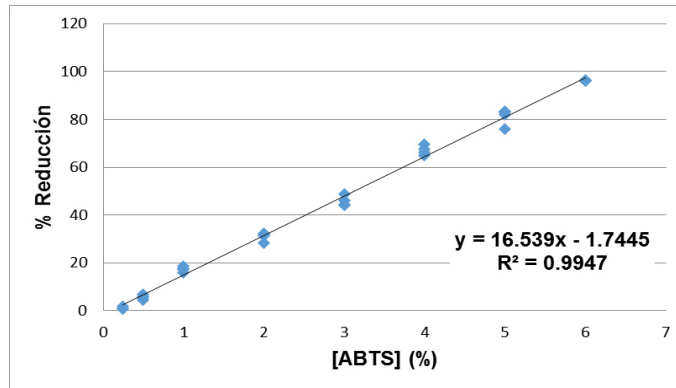


Figura 13. Porcentaje de Reducción de ABTS con Trolox. $\lambda = 750 \text{ nm}$.

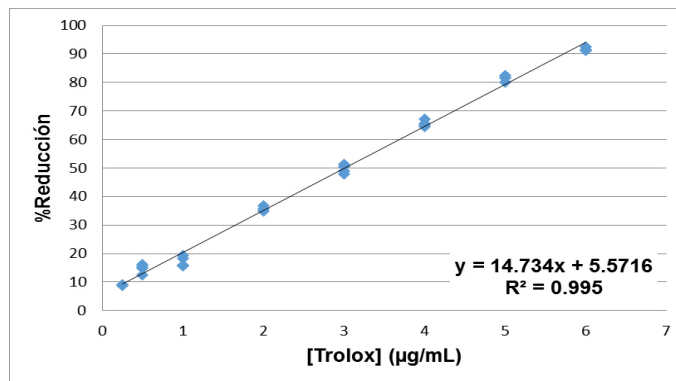


Figura 14. Porcentajes de Reducción de ABTS con Extracto Adicionado con Trolox. $\lambda = 750 \text{ nm}$.

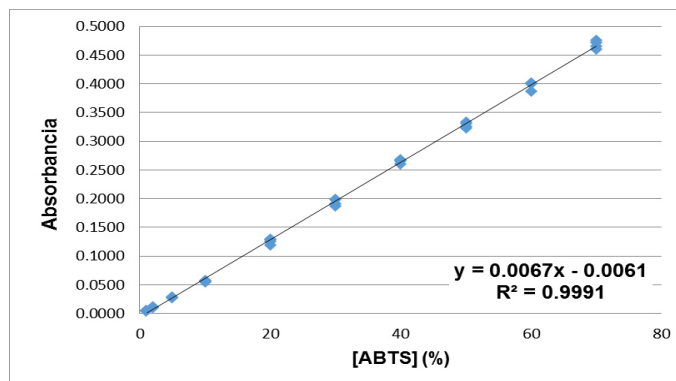


Figura 15. Curva de Calibración de ABTS en Etanol. $\lambda = 750 \text{ nm}$.

6.2.3.2 Precisión y Exactitud.

En la Tabla 23 se presentan los resultados de la evaluación de precisión y exactitud. Además, en la Figura 16 se muestra la curva de regresión para la evaluación de la correlación entre la concentración de trolox calculada y real. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9948 y una pendiente de 1.0029.

TABLA 23

PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO DE ABTS

Nivel de Adición	[Trolox] µg/mL	% DER	% DER (interdía)	% Error
Alta	5	6.34	0.77	-0.20
Media	3	2.32	1.62	-1.98
Baja	1	9.75	3.02	-1.82

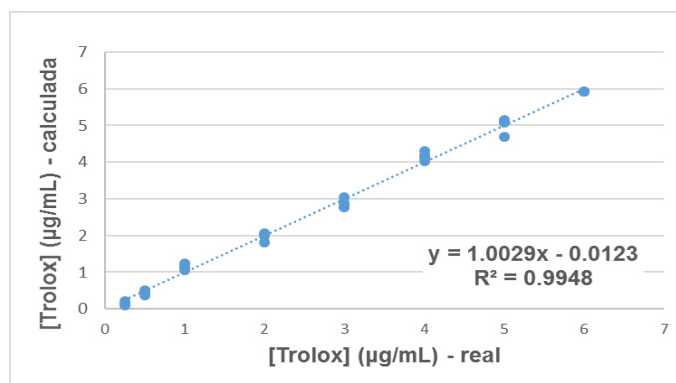


Figura 16. Evaluación de la Correlación de Concentración de Trolox Calculada y Real por el Método de ABTS.

6.2.3.3 Limite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

El límite de cuantificación se estableció en 0.157 µg/mL de trolox, equivalentes a 70 % de ABTS. El límite máximo de cuantificación se estableció en 6 µg/mL de trolox, equivalentes a 3.57 % de ABTS.

6.2.3.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de Señal.

En la Tabla 24 se presenta la DER para cada señal, en las diferentes placas. Se calculó el porcentaje de reducción y la DER para la señal media de cada placa. Los resultados se observan en la Tabla 25.

TABLA 24

DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LAS SEÑALES DE ABTS

	% DER Día 1			% DER Día 2		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Señal Máxima (CE₂₀)	13.09	11.18	13.16	2.17	2.56	2.99
Señal Media (CE₅₀)	5.08	5.08	5.56	2.99	2.62	2.96
Señal Mínima (CE₈₀)	3.34	4.64	5.43	5.54	3.29	7.16

TABLA 25

DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LOS PORCENTAJES DE REDUCCIÓN DE ABTS

	Día 1		Día 2	
	% Reducción	% DER	% Reducción	% DER
Placa 1	49.55	13.44	51.66	4.51
Placa 2	51.95	12.35	49.90	7.24
Placa 3	50.19	13.81	49.07	4.12

Se calculó el factor Z de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.7.5.3. Los resultados se presentan en la Tabla 26.

TABLA 26
FACTOR Z PARA EL MÉTODO DE ABTS

	Día 1	Día 2
	Factor Z	Factor Z
Placa 1	0.93	0.94
Placa 2	0.91	0.95
Placa 3	0.89	0.93

6.2.3.5 Robustez.

En la Tabla 27 se presentan los resultados de robustez evaluados con la prueba de Tukey.

TABLA 27
EVALUACIÓN DE ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE ABTS

Variable Óptima	Cambios a variable óptima	Resultados
Ajuste ABTS (Abs=0.7)	0.65	% Reducción No son diferentes
	0.75	% Reducción No son diferentes
[ABTS] (70 %)	65	% Reducción No son diferentes
	75	% Reducción No son diferentes
Solvente (Etanol)	Agua (25 %)	% Reducción Son diferentes
	DMSO (0.25 %)	% Reducción Son diferentes
	DMSO (0.15 %)	% Reducción No son diferentes

Abs: Absorbancia. Agua: concentración final en el pozo 25%. DMSO: concentraciones finales en el pozo.

6.3 Método de Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.

6.3.1 Información Bibliográfica.

En la Tabla 28 se enlistan 13 referencias que utilizaron el mismo método de inhibición de α -glucosidasa, y acarbosa como control positivo.

6.3.2 Optimización del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.

A partir del método en macrodilución de α -glucosidasa se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de acarbosa; 198 $\mu\text{g/mL}$, la cual se utilizó para realizar los experimentos de optimización.

Como resultado de los experimentos del diseño factorial se obtuvo un diagrama de Pareto (Figura 17), con el cual se estableció que la concentración de enzima, temperatura de incubación, así como la interacción entre concentración de enzima y sustrato, y concentración de enzima y tiempo de incubación, son las condiciones que producen una variación significativa en la respuesta. La concentración del sustrato se optimizó con una cinética enzimática.

TABLA 28

CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

Autor	Enzima (U/mL)	p-NPG (mM)	AF (M)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo incubación (min)	Otros componentes	CI ₅₀ (mg/mL) de Acarbosa	Método de referencia
Ren et al., 2011	0.040	0.5	n. i.	6.8	37	5/30	0.1 M Carbonato de sodio	< 0.010	Kim et al., 2004
Apostolidis et al., 2010	1.000	5	0.1	6.9	25	10/5	n. i.	0.00037	n.i.
Lee et al., 2008	3.000	2	n. i.	6.5	37	10/35	n. i.	0.029	Pistia-Brueggeman y Hollingsworth, 2001
Wang et al., 2012	1.000	5	0.1	6.9	25	10/5	n. i.	0.15	Apostolidis y Lee, 2010
Wu et al., 2011	0.500	n.i.	0.1	6.9	37	10/60	n. i.	0.27	Chapdelaine et al., 1978; Matsui et al., 1996
Chan et al., 2010	0.032	2	0.1	7	37	20	n. i.	0.437	Matsui et al., 1996
Choudhary et al., 2010	0.250	0.7	0.05	6.9	37	n. i.	n. i.	0.504	Matsui et al., 1996
Heo et al., 2009	0.700	5	0.1	7	Ambiente	5/5	2g/L albúmina bovina+0.2g/l NaN ₃	0.678	Watanabe et al., 1997
Lee et al., 2010	0.700	5	0.1	7	Ambiente	5/5	2g/L albúmina bovina+0.2g/l NaN ₃	0.678	Watanabe et al., 1997
Kang et al., 2011	0.200	2.5	n. i.	6.8	37	15/15	0.2 M Carbonato de sodio	0.894	Kang et al., 2009
Kang et al., 2012	0.200	2.5	n. i.	6.8	37	15/15	0.2 M Carbonato de sodio	1.081	Kang et al., 2011; Li et al., 2011
Subramanian et al., 2008	0.100	n. i.	0.1	7	ambiente	5/5	2g/L albúmina bovina+0.2g/l NaN ₃	6.2	Kim et al., 2000
Linwei et al., 2012	0.075	3	0.67	6.8	37	30	0.1 M Carbonato de sodio	10	Kim et al., 2004
Shai et al., 2010	0.600	2.9	n. i.	6.9	25	5	hirvió 2 min	17	Matsui et al., 1996
Hou et al., 2009	0.010	10	n. i.	n. i.	37	30	0.1 M Carbonato de sodio	n. i.	Matsui et al., 1996

AF: Amortiguador de Fosfatos. CI₅₀: Concentración inhibitoria media. NaN₃: Azida de Sodio. n.i.: no indicado. p-NPG: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido.

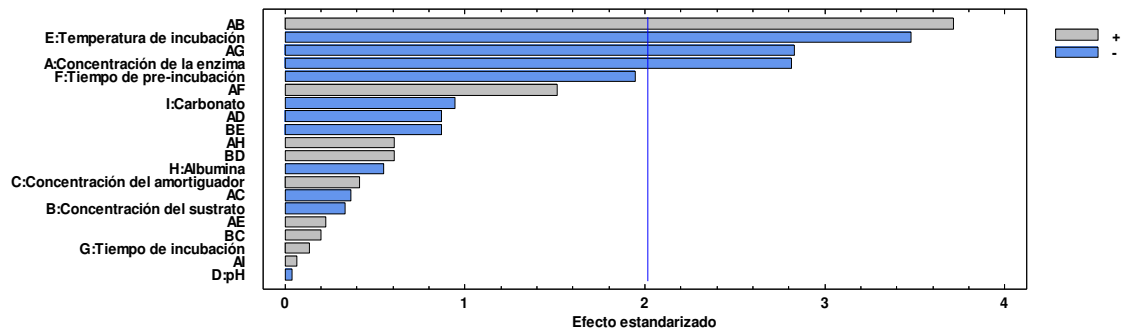


Figura 17. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.

En el método simplex secuencial básico se plantearon inicialmente 4 experimentos y se llegó hasta 7. Se determinaron los porcentajes de inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 29. Las condiciones que produjeron el mejor porcentaje de inhibición fueron las del experimento 4.

TABLA 29

EXPERIMENTO SIMPLEX SECUENCIAL BÁSICO PARA EL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

Experimento	Enzima	Tiempo	Temperatura	% Inhibición	$Abs_{Control\ 100\%}$ $Act.enzimática$
1	0.1	5	25	82.2	0.110
2	1	5	25	75.0	0.288
3	0.55	30	25	37.7	0.392
4	0.55	17.5	37	59.1	0.431
5	1.3	30	33	21.0	0.2957
6	0.6	30	37	51.4	0.426
7	0.1	22	33	88.7	0.319

Abs: Absorbancia

6.3.3 Cinética Enzimática.

La concentración óptima de sustrato se estableció con el valor de K_m . Se realizó una cinética enzimática, donde se utilizaron las condiciones óptimas establecidas para el método y se varió la concentración final del sustrato entre 2 y 476 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Se calculó una gráfica de doble recíproco (Figura 19). Utilizando la ecuación de la recta se calcularon, por extrapolación, el valor de K_m y el de V_{max} . Los resultados se presentan en la Tabla 30.

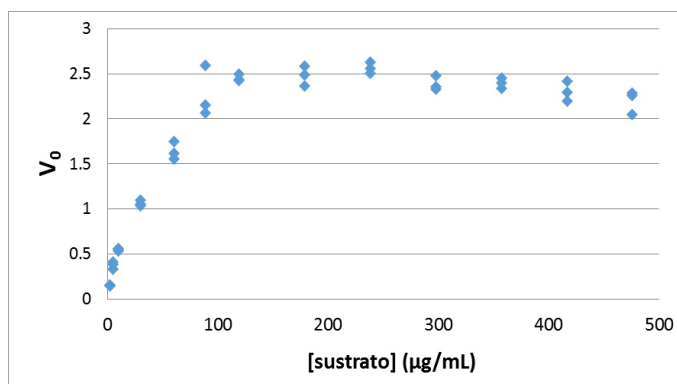


Figura 18. Cinética Enzimática de α -Glucosidasa sobre p-NPG. *Temperatura: ambiente. $\lambda = 405 \text{ nm}$.*

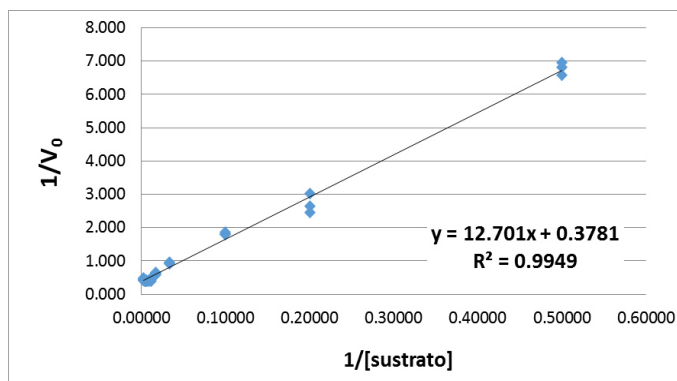


Figura 19. Gráfica de Lineweaver-Burke de α -Glucosidasa.

TABLA 30**VALORES DE K_m Y V_{max} PARA LA ENZIMA α -GLUCOSIDASA**

Vmax	2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$	8.6 $\mu\text{M}/\text{min}$
Km	33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	111.5 μM

En base a estos resultados, la concentración final de sustrato óptima para el método es de 33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (111.5 μM).

En la Tabla 31 se presenta el método resultado de la optimización.

TABLA 31**MÉTODO OPTIMIZADO DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA**

	Blanco	Control negativo	Blanco de muestra	Muestra
Amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 6.8)	17 μL	50 μL	17 μL	
Muestra Problema (diferentes concentraciones)			33 μL	33 μL
p-NPG (395.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	17 μL	17 μL	17 μL	17 μL
Incubar por 5 min a 37 °C				
Enzima α -glucosidasa (0.55 U/mL)		17 μL		17 μL
Incubar por 17.5 min a 37 °C				
Carbonato de sodio (100 mM)	133 μL	133 μL	133 μL	133 μL
Medir Abs a 405 nm				

Abs: Absorbancia. p-NPG: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido.

6.3.4 Validación del Método de Inhibición de α -Glucosidasa.

6.3.4.1 Linealidad.

La linealidad se evaluó utilizando dos diferentes estrategias:

1. Se utilizaron diferentes concentraciones de acarbosa, por triplicado. En la Figura 20 se presenta la curva de regresión. Se obtuvo un valor de r^2 de 0.994 y una pendiente de 0.147. El rango lineal se estableció entre 100 y 310.2 $\mu\text{g/mL}$ de acarbosa. La CI_{50} fue de $180.2 \pm 2.48 \mu\text{g/mL}$ de acarbosa.
2. Un extracto de *J. dioica* fue adicionado con diferentes concentraciones de acarbosa por triplicado. En la Figura 21 se presenta la curva de regresión. El valor de r^2 fue de 0.9917 y el valor de la pendiente de 0.1598. El rango lineal fue de 99 a 260.7 $\mu\text{g/mL}$. La CI_{50} fue de $164.31 \pm 1.65 \mu\text{g/mL}$ de acarbosa.

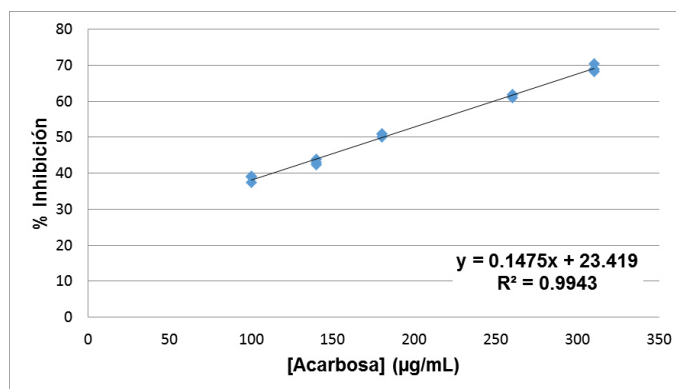


Figura 20. Porcentajes de Inhibición de α -Glucosidasa por Acarbosa. $\lambda = 405 \text{ nm}$.

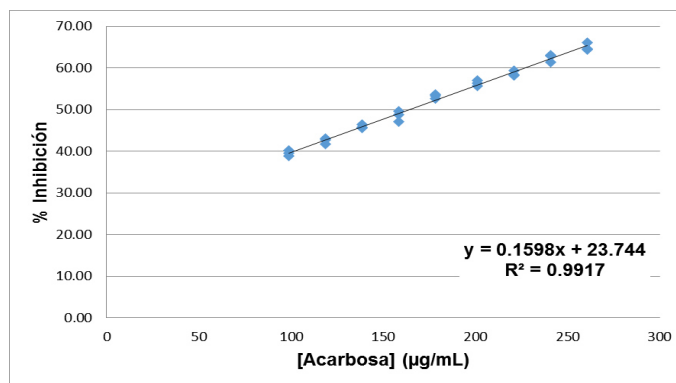


Figura 21. Porcentaje de Inhibición de α -Glucosidasa por un Extracto Adicionado con Acarbosa. $\lambda = 405 \text{ nm}$.

6.3.4.2 Precisión y Exactitud.

En la Tabla 32 se muestran los resultados del cálculo de precisión y exactitud. En la Figura 22 se presenta la curva de regresión para la evaluación de la correlación entre la concentración de acarbose calculada y la real. Se obtuvo un valor de r^2 de 0.995 y una pendiente de 1.

TABLA 32

PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

Nivel de Adición	[Acarbosa] µg/mL	% DER	% DER (interdía)	% DER
Alta	260.7	1.644	1.32	-0.17
Media	201.3	1.60	1.15	-2.57
Baja	99	1.53	1.76	-1.53

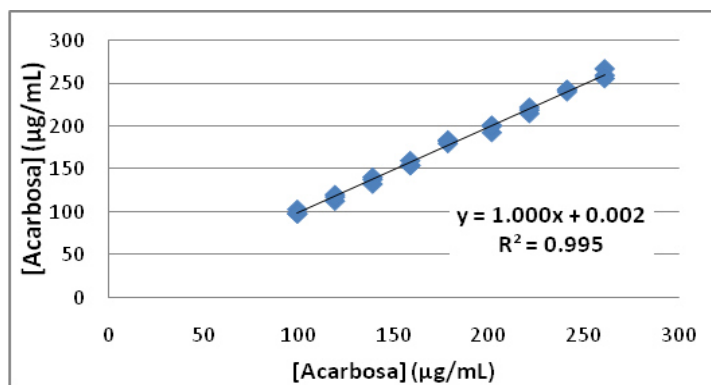


Figura 22. Evaluación de la Correlación de Concentración de Acarbosa Calculada y Real por el Método de Inhibición de α -Glucosidasa

6.3.4.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo de Cuantificación.

Se estableció el límite de cuantificación de este método en 99 $\mu\text{g/mL}$ de acarbosa y el límite máximo de cuantificación en 310.2 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.4.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.

En la Tabla 33 se muestra la desviación estándar relativa para cada una de las señales en las 3 placas.

TABLA 33

DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LAS SEÑALES DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

	% DER Día 1			% DER Día 2		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Señal Máxima (CI_{38})	1.41	1.99	1.53	2.96	3.45	2.01
Señal Media (CI_{50})	2.10	1.44	1.05	3.22	3.71	3.43
Señal Mínima (CI_{70})	4.32	2.39	2.24	6.69	5.59	5.77

Se calculó el porcentaje de Inhibición y la desviación estándar relativa para la señal media de cada placa. Los resultados se presentan en la Tabla 34.

Se calculó el factor Z y los resultados se muestran en la Tabla 35.

TABLA 34
DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

	Día 1		Día 2	
	% Inhibición	% DER	% Inhibición	% DER
Placa 1	63.48	5.78	65.21	8.87
Placa 2	63.92	4.11	62.94	10.71
Placa 3	64.43	2.92	64.92	9.45

TABLA 35
FACTOR Z PARA EL MÉTODO DE α -GLUCOSIDASA

	Día 1	Día 2
	Factor Z	Factor Z
Placa 1	0.96	0.93
Placa 2	0.96	0.92
Placa 3	0.97	0.94

6.3.4.5 Robustez.

Se evaluó la robustez como se indica en la sección 5.10.3.5. Los resultados se presentan en la Tabla 36.

TABLA 36
EVALUACIÓN DE ROBUSTEZ PARA EL MÉTODO DE
INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA

Variable Óptima	Cambios a variable óptima	Resultados
Concentración del sustrato (111.5 μ M)	101.5	%Inhibición Son diferentes
	121.5	% Inhibición Son diferentes
Concentración de Enzima (0.55 U/mL)	0.45	% Inhibición Son diferentes
	0.65	% Inhibición Son diferentes
Temperatura de incubación (37 °C)	35	% Inhibición Son diferentes
	39	% Inhibición No son diferentes
Tiempo de incubación (17.5 minutos)	15	% Inhibición Son diferentes
	20	% Inhibición No son diferentes
Solvente de la muestra (Amortiguador de fosfatos)	Etanol (25 %)	% Inhibición No son diferentes
	DMSO (0.25 %)	% Inhibición No son diferentes
	DMSO (0.15 %)	% Inhibición No son diferentes

6.4 Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.

6.4.1 Información Bibliográfica.

En la Tabla 37 se enlistan 8 referencias que utilizaron el mismo método de inhibición de la enzima α -amilasa y acarbosa como control positivo.

6.4.2 Optimización.

A partir del método en macrodilución de α -amilasa se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de acarbosa; 0.6 μ g/mL, la cual se utilizó para realizar los experimentos de optimización.

Como resultado de los experimentos del diseño factorial se obtuvo un diagrama de Pareto (Figura 23), con el cual se estableció que la concentración la enzima, los tiempos de preincubación, incubación y calentamiento en baño de agua, son las condiciones que producen una variación significativa en la respuesta.

De acuerdo al método simplex secuencial básico se plantearon 10 experimentos en total. Los resultados se muestran en la Tabla 38.

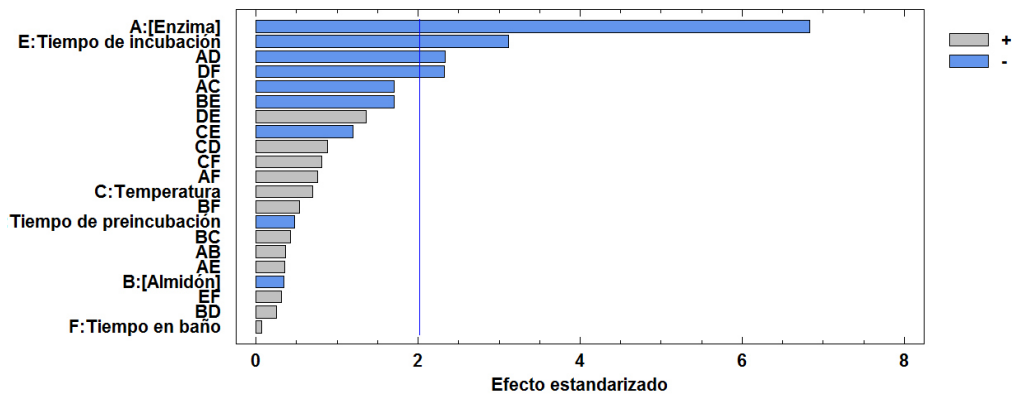


Figura 23. Diagrama de Pareto Obtenido en la Optimización del Método de Inhibición de α -Amilasa.

TABLA 37

CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA α -AMILASA

Referencia	Enzima (U/mL)	Almidón (mg/mL)	AF (M)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo incubación (min)	Tiempo en agua 100°C (min)	λ (nm)	DNS Mm	CI ₅₀ (mg/mL) de Acarbosa	Método de referencia
Apostolidis et al., 2010	0.52	0.4	0.02	6.9	25	10/10	5	540	n.i.	0.00068	n. i.
Satpathy et al., 2011	0.20	0.4	0.02	6.9	25	10/10	5	540	n.i.	0.00156	McCue y Shetty, 2004
Hou et al., 2009	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	37	5	15	540	n.i.	0.00182	No establece
Subramanian et al., 2008	1.00	1	0.02	6.9	25	10/10	5	540	96	14.9	Apostolidis et al., 2007
Wu et al., 2011	0.11	0.22	0.02	6.9	25	10/10	5	540	96	47.5	Gillard et al., 1977; Kwon et al., 2006
Ha et al., 2011	n.i.	n.i.	0.02	6.9	25	10/10	5	540	n.i.	< 0.03228	Kwon et al., 2007
Wang et al., 2012	0.14	0.29	0.02	6.9	25	10/10	5	540	n.i.	< 0.15	Ranilla et al., 2010
Vadivel et al., 2011	0.03	0.07	0.02	6.9	25	10/30	5	540	n.i.	> 1.0	n. i.

AF: Amortiguador de fosfatos. CI₅₀: Concentración inhibitoria media. DNS: ácido dinitro salicílico. n.i: no indicado.

TABLA 38

EXPERIMENTO SIMPLEX SECUENCIAL BÁSICO PARA EL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA

Experimento	Enzima (U/mL)	Tiempo preincubación (min)	Tiempo de incubación (min)	Tiempo en baño maría (min)	% Inhibición	A_{Control} 100%Act.enzimática
1	0.5	5	5	5	41.38	1.474
2	8.3	5	5	5	-1.12	2.935
3	4.4	10	5	5	-6.64	0.542
4	4.4	7.5	10	5	6.76	2.794
5	4.4	7.5	7.5	15	9.63	2.211
6	4.4	2.5	8.75	10	-11.44	2.901
7	6.35	12.5	5	5	10.38	1.436
8	0.5	10.63	7.81	8.75	46.13	1.084
9	0.5	7.2	5.5	15.6	52.87	0.906
10	0.5	7.0	7.0	5.9	45.61	1.048

Las condiciones del experimento número 9 fueron las que presentaron el mejor resultado y son las que se establecieron como óptimas.

6.4.3 Cinética Enzimática.

Se determinó la concentración óptima de sustrato por medio del valor de K_m , determinada por una cinética. Los resultados se presentan en la Figura 24.

Se realizó una gráfica de doble recíproco, (Figura 25), con la ecuación de la recta se calcularon por extrapolación los valores de K_m y V_{max} . Los resultados se muestran en la Tabla 39. De acuerdo a estos resultados, se estableció la concentración óptima de almidón: 0.38 mg/mL (1.11 mM).

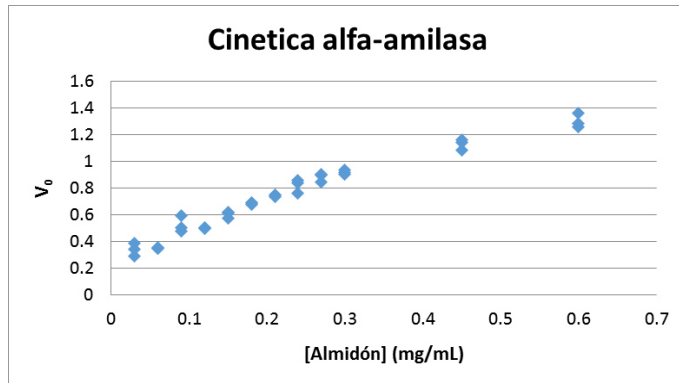


Figura 24. Cinética Enzimática de α -Amilasa Sobre Almidón. *Temperatura = ambiente, $\lambda = 540 \text{ nm}$.*

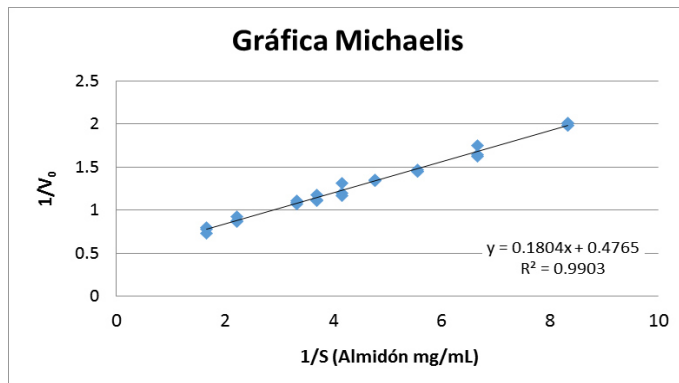


Figura 25. Gráfica de Lineweaver-Burke para la α -Amilasa Sobre Almidón.

TABLA 39

VALORES DE K_m Y V_{max} PARA LA ENZIMA α -AMILASA

V_{max}	2.1 mg/mL/min	6.13 mM/min
K_m	0.38 mg/mL	1.11 mM

En la Tabla 40 se presenta el método resultado del proceso de optimización.

TABLA 40

MÉTODO OPTIMIZADO DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA

	Blanco	Control negativo	Blanco de muestra	Muestra
Amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 6.9)	100 μ L	100 μ L	100 μ L	
Muestra Problema(diferentes concentraciones)			100 μ L	100 μ L
Enzima α -amilasa (1.5 U/mL)		100 μ L		100 μ L
Incubar por 7.2 min a 37 °C				
Almidón (3.8 mg/mL)	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubar por 5.5 min a 37 °C				
DNS (96 mM)	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Colocar en baño de agua hirviendo por 15.6 min				
Transferir 100 μ L a microplaca				
Agua	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Medir Abs a 540 nm				

Abs: Absorbancia. DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico.

6.4.4 Validación del Método de Inhibición de α -Amilasa.

6.4.4.1 Linealidad.

Se evaluó la linealidad tomando en cuenta dos estrategias:

1. Se evaluaron diferentes concentraciones de acarbosa, por triplicado. En la Figura 26 se muestra la curva de regresión. Se obtuvo un r^2 de 0.9906 y una pendiente de 7.5784. El rango lineal se determinó entre 1.5 y 5 μ g/mL. La CI_{50} fue de 1.61 ± 0.06 μ g/mL.

2. Se adicionaron distintas concentraciones de acarbosa a un extracto de *J. dioica*. En la Figura 27 se presenta la curva de regresión. El r^2 fue de 0.9947 y el valor de la pendiente fue de 11.493. El rango lineal fue de 1 a 5 $\mu\text{g/mL}$. La CI_{50} fue de $2.9 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$.

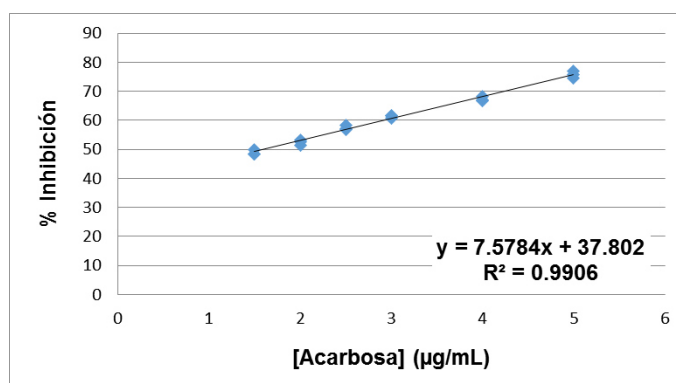


Figura 26. Porcentaje de Inhibición de α -Amilasa con Acarbosa. $\lambda = 540 \text{ nm}$.

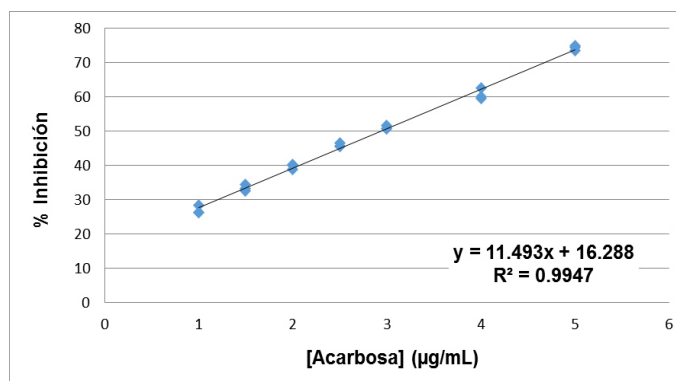


Figura 27. Porcentaje de Inhibición de α -Amilasa con Extracto Adiccionado con Acarbosa. $\lambda = 540 \text{ nm}$.

6.4.4.2 Precisión y Exactitud.

En la Tabla 41 se presentan los resultados para la evaluación de precisión y exactitud.

Se realizó una curva de regresión para la evaluación de la correlación entre la concentración de acarbosa calculada y la real. Se obtuvo un r^2 de 0.9947 y una pendiente de 1. En la Figura 28 se muestran la curva de regresión obtenida.

TABLA 41

PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA

Nivel de Adición	[Acarbosa] $\mu\text{g/mL}$	% DER	% DER (interdía)	% Error
Alta	5	0.99	1.68	-0.96
Media	2.5	1.09	1.39	-3.08
Baja	1	4.27	3.67	-5.46

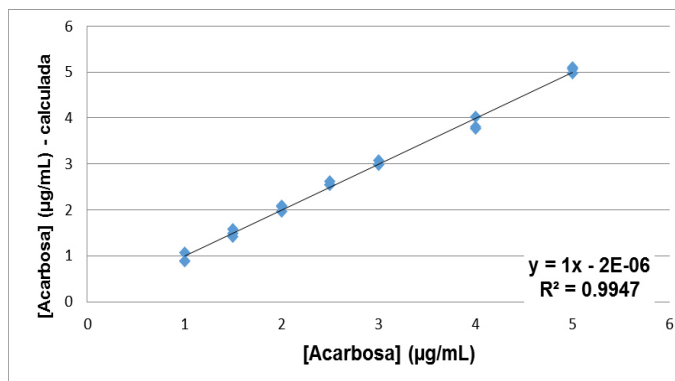


Figura 28. Evaluación de la Correlación de Concentración de Acarbosa Calculada y Real por el método de inhibición de α -amilasa.

6.4.4.3 Límite de Cuantificación y Límite Máximo.

Se determinó el límite de cuantificación de este método en 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de acarbosa y el límite máximo de cuantificación en 5 $\mu\text{g/mL}$.

6.4.4.4 Uniformidad de Placa y Variabilidad de la Señal.

En la Tabla 42 se presenta la desviación estándar relativa para cada una de las señales en las 3 placas. Se realizó el cálculo de porcentaje de inhibición y la desviación estándar relativa para la señal de CI_{50} de cada placa. Los resultados se observan en la Tabla 43.

Se calculó el factor Z y los resultados se presentan en la Tabla 44.

TABLA 42

DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LAS SEÑALES DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA

	% DER Día 1			% DER Día 2		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Señal Máxima (CI_{50})	1.88	2.18	2.96	1.97	2.17	3.13
Señal Media (CI_{60})	1.50	2.05	1.78	1.61	2.24	3.19
Señal Mínima (CI_{70})	3.09	3.29	4.00	3.57	4.29	5.02

TABLA 43

DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DEL MÉTODO DE α -AMILASA

	Día 1		Día 2	
	% Inhibición	% DER	% Inhibición	% DER
Placa 1	69.9	4.13	64.57	4.39
Placa 2	64.77	5.81	64.95	6.33
Placa 3	67.68	4.77	68.54	8.51

TABLA 44
FACTOR Z PARA EL MÉTODO DE α -AMILASA

	Día 1	Día 2
	Factor Z	Factor Z
Placa 1	0.96	0.95
Placa 2	0.95	0.95
Placa 3	0.94	0.93

6.4.4.5 Robustez.

Los resultados de la evaluación de la robustez se presentan en la Tabla 45.

TABLA 45
EVALUACIÓN DE ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA

Variable Óptima	Cambios de la variable óptima	Resultados
Concentración de enzima (0.15 U/mL)	0.20	% Inhibición son diferentes
	0.10	% Inhibición no son diferentes
Tiempo de pre-incubación (7.2 min)	9.2	% Inhibición no son diferentes
	5.2	% Inhibición no son diferentes
Tiempo de incubación (5.5 min)	4.5	% Inhibición no son diferentes
	6.5	% Inhibición no son diferentes
Tiempo en baño de agua (15.6 min)	10.6	% Inhibición son diferentes
	20.6	% Inhibición no son diferentes
Solvente de la muestra (Amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.9)	Etanol (25%)	% Inhibición no son diferentes
	DMSO (0.5%)	% Inhibición no son diferentes
	DMSO (0.25%)	% Inhibición no son diferentes

6.7 Aplicación de los Ensayos Optimizados y Validados a Extractos de

Plantas.

6.7.1 Evaluación de la Potencial Actividad Antirradicalaria.

Los métodos de reducción de radicales libres DPPH y ABTS optimizados y validados (secciones 5.12.1 y 5.12.2, respectivamente), fueron aplicados para determinar la actividad antirradicalaria *in vitro* de 30 extractos de plantas. El rango de CE_{50} para DPPH varió entre 6.03 a $> 250 \mu\text{g/mL}$, mientras que para ABTS fue de 1.06 a $> 150 \mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en la Tabla 46.

6.7.2 Evaluación de la Potencial Actividad Antihiper glucémica.

Los métodos de inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa optimizados y validados (secciones 5.12.3 y 5.12.4, respectivamente), fueron aplicados para determinar la actividad antihiper glucémica *in vitro* de 30 extractos de plantas. El rango de CI_{50} para α -glucosidasa varió entre 17.7 a $> 660 \mu\text{g/mL}$, mientras que para α -amilasa fue de 3.74 a $> 50 \mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en la Tabla 47.

TABLA 46

ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA *in vitro* DE EXTRACTOS DE PLANTAS

Muestras	DPPH		ABTS	
	CE ₅₀ (µg/mL)	DE	CE ₅₀ (µg/mL)	DE
1	6.03	0.20	2.28	0.21
2	6.06	0.24	1.06	0.02
3	7.30	1.02	1.97	0.04
4	14.69	1.11	4.18	0.15
5	21.74	0.47	5.33	0.14
6	23.97	0.68	10.00	0.30
7	26.75	0.69	9.14	0.15
8	30.28	0.88	8.57	0.11
9	>31.25		15.31	0.41
10	34.92	0.60	13.32	0.31
11	47.16	0.30	14.11	0.48
12	51.14	0.91	27.05	0.58
13	53.52	2.13	16.90	0.47
14	54.80	0.09	32.60	0.91
15	56.94	1.90	28.44	0.96
16	59.78	1.28	11.25	0.39
17	80.41	2.37	21.75	0.56
18	83.64	1.86	13.64	0.40
19	88.40	1.66	42.99	1.47
20	92.10	1.93	25.42	0.39
21	119.79	2.01	35.42	1.80
22	147.47	1.79	21.31	0.39
23	197.31	4.29	43.21	1.64
24	213.10	5.65	>75	
25	240.33	0.01	55.88	2.38
26	>250		85.02	2.44
27	>250		62.41	0.88
28	>250		24.05	0.76
29	>250		>150	
30	>250		>150	
Quercetina	4.3	0.05		
Trolox			3.00	0.05

CE₅₀: Concentración efectiva media. DE: Desviación estándar.

TABLA 47

ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCÉMICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE PLANTAS

Muestra	α -glucosidasa		α -amilasa	
	IC ₅₀ (μ g/mL)	DE	IC ₅₀ (μ g/mL)	DE
E1	17.7	1.67	13.97	0.91
E2	27.9	0.21	12.29	0.53
E3	33.2	0.31	>50	
E4	53.3	4.83	>50	
E5	74.5	0.58	8.75	0.22
E6	107.9	2.01	4.75	0.04
E7	141.9	6.37	>50	
E8	>330		9.09	0.60
E9	>330		>50	
E10	>330		>50	
E11	>330		6.33	0.81
E12	>330		3.74	0.19
E13	>330		>50	
E14	>330		>50	
E15	>330		>50	
E16	>330		>50	
E17	>330		>50	
E18	>330		>50	
E19	>330		>50	
E20	>660		>50	
E21	>660		>50	
E22	>660		>50	
E23	>660		>50	
E24	>660		>50	
E25	>660		>50	
E26	>660		>50	
E27	>660		>50	
E28	>660		>50	
E29	>660		>50	
E30	>660		>50	
Acarbosa	164.31	1.65	2.9	0.03

(IC₅₀): Concentración inhibitoria media. (DE): Desviación estándar.

6.8 Evaluación de Actividad Biológica de Plantas *in vivo*.

6.8.1 Actividad Hepatoprotectora.

Se evaluó la actividad hepatoprotectora de diez extractos de acuerdo al protocolo descrito en la sección 5.13.1.

En la Tabla 48 se presentan los resultados de la prueba de Dunnett ($P < 0.05$) para los grupos control y extractos analizados. Todos los extractos evaluados disminuyeron significativamente los niveles de ALT comparados con el grupo control de toxicidad aguda (CCl_4), mientras que el Legalón[®] no mostró efecto. Los extractos 25, 26, 29 y 30, así como el control positivo (Legalón[®]) disminuir significativamente los niveles de AST en comparación con el grupo de toxicidad aguda.

TABLA 48

ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE EXTRACTOS DE PLANTAS (n=4)

	Tratamiento	ALT (U/L)		AST (U/L)			
		Media	DEM	Media	DEM		
Día 2: Medidas basales.	Control negativo	Aceite mineral	112.0	30.8	187.8	41.3	
	Control de toxicidad aguda		117.0	22.7	375.8	121.2	
	Control positivo	Legalón®	88.8	13.7	201.0	37.7	
	Extractos con actividad antirradicalaria <i>in vitro</i>	1		100.0	13.5	357.5	37.5
		2		95.0	17.1	295.0	11.9
		3		112.5	4.8	292.5	40.5
		4		87.5	14.9	275.0	14.4
		5		85.0	15.6	225.0	19.4
	Extractos sin actividad antirradicalaria <i>in vitro</i>	25		90.0	12.3	267.5	21.4
		26		65.0	2.9	230.0	42.6
		27		130.0	26.8	350.0	52.1
		29		92.5	6.3	392.5	84.2
		30		90.0	4.1	260.0	40.6
	Día 9: Después de 7 días de tratamiento.	Control positivo	Legalón®	95.0	12.6	275.0	14.4
		Extractos con actividad antirradicalaria <i>in vitro</i>	1		122.5	13.2	315.0
2				100.0	14.1	285.0	54.2
3				110.0	9.1	352.5	55.7
4				125.0*	19.2	250.0	54.9
5				100.0*	16.8	265.0	35.2
Extractos sin actividad antirradicalaria <i>in vitro</i>		25		102.5	8.5	357.5	30.9
		26		97.5	14.4	285.0	64.4
		27		110.0	10.8	325.0	59.2
		29		125.0	10.4	285.0	18.9
	30		142.5	14.4	215.0	15.6	

TABLA 48 (CONTINÚA)

		Tratamiento	ALT (U/L)		AST (U/L)	
			Media	DEM	Media	DEM
Día 10: Después de administración de CCl ₄ .	Control negativo	Aceite mineral	81.0	16.5	287.0**	80.6
	Control de toxicidad aguda	CCl ₄	1590.0	143.6	2107.5	755.5
	Control positivo	Legalón® + CCl ₄	1395.3	398.5	721.0**	103.1
	Extractos con actividad antirradicalaria <i>in vitro</i>	1 + CCl ₄	270.0**	102.7	1257.5	445.8
		2 + CCl ₄	262.5**	85.4	1250.0	457.1
		3 + CCl ₄	360.0**	158.1	1447.5	607.4
		4 + CCl ₄	390.0**	151.5	1426.7	298.9
		5 + CCl ₄	342.5**	52.8	1530.0	219.3
	Extractos sin actividad antirradicalaria <i>in vitro</i>	25 + CCl ₄	550.0**	358.7	830.0**	260.7
		26 + CCl ₄	297.5**	84.0	955.0**	208.4
		27 + CCl ₄	350.0**	117.5	1445.0	211.4
		29 + CCl ₄	390.0**	107.3	832.5**	198.6
		30 + CCl ₄	260.0**	51.2	547.5**	87.8

DEM: Desviación estándar de la media. ALT: alanino aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa. CCl₄: tetracloruro de carbono. *: Diferencia significativa con los niveles basales (Día 1 vs. Día 8). **: Diferencia significativa con el control de toxicidad aguda (CCl₄). Prueba de Dunnett, P<0.05.

6.8.2 Actividad Antihiper glucemiante.

La actividad antihiper glucemiante de catorce extractos fue evaluada en un modelo *in vivo*, utilizando almidón de maíz como fuente de carbohidratos.

En la Figura 29 se presentan los resultados de glucemia normalizada para los grupos y para los extractos E1, E2, E3, E4 y E5. Mientras que, en la Figura 30 se presentan solo los picos de glucemia a los 15 minutos después de la administración de almidón.

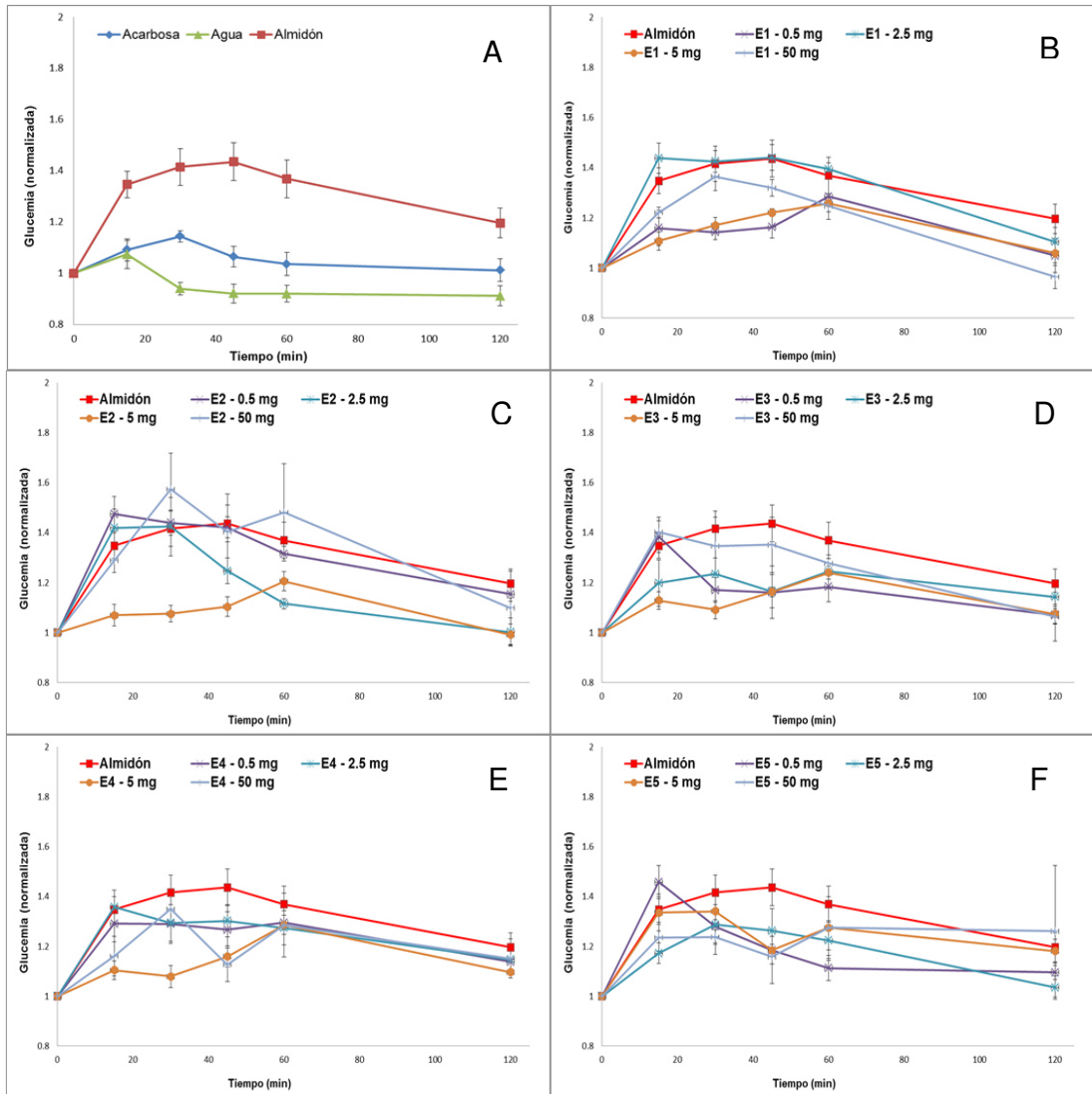


Figura 29. Cinética de Glucemia Promedio Normalizada para Controles y Extractos Inhibidores de α -Glucosidasa. (n=5). A: controles; B: E1; C: E2; D: E3; E: E4; F: E5.

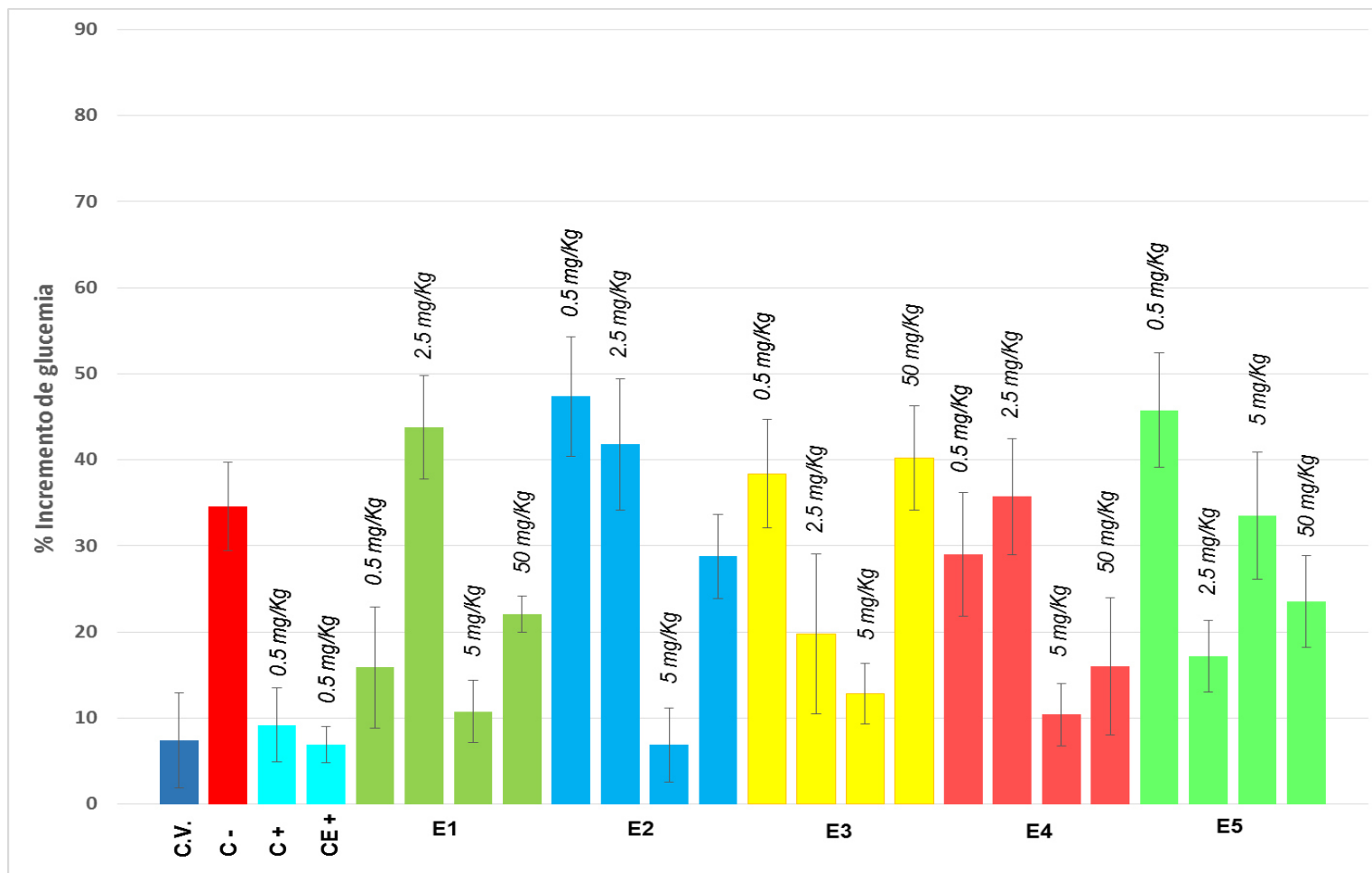


Figura 30. Pico Glucémico a los 15 min Obtenido para Controles y Extractos Inhibidores de α -Glucosidasa administrados vía oral. C.V.: vehículo; C-: almidón, 1g/kg; C+: acarbosea 0.5 mg/kg + almidón 1g/kg; CE+: PPHT (hidrolizado proteínico de leguminosa) 0.5 mg/kg + almidón 1g/kg; E1, E2, E3, E4 y E5: extractos de prueba en concentraciones 0.5, 2.5, 5, 50 mg/kg + almidón 1g/kg. n=5, promedio \pm DEM.

En la Figura 31 se presentan los resultados de glucemia normalizada para los extractos E5, E6, E8, E11 y E12. En la Figura 32 se presentan los picos de glucemia para estos mismos extractos después de 15 minutos de la administración de almidón.

En la Figura 33 se muestran los resultados de glucemia normalizada para los extractos E20, E21, E22, E23 y E29. En la Figura 34 se presentan los picos de glucemia a los 15 minutos de la administración de almidón, para los mismos extractos.

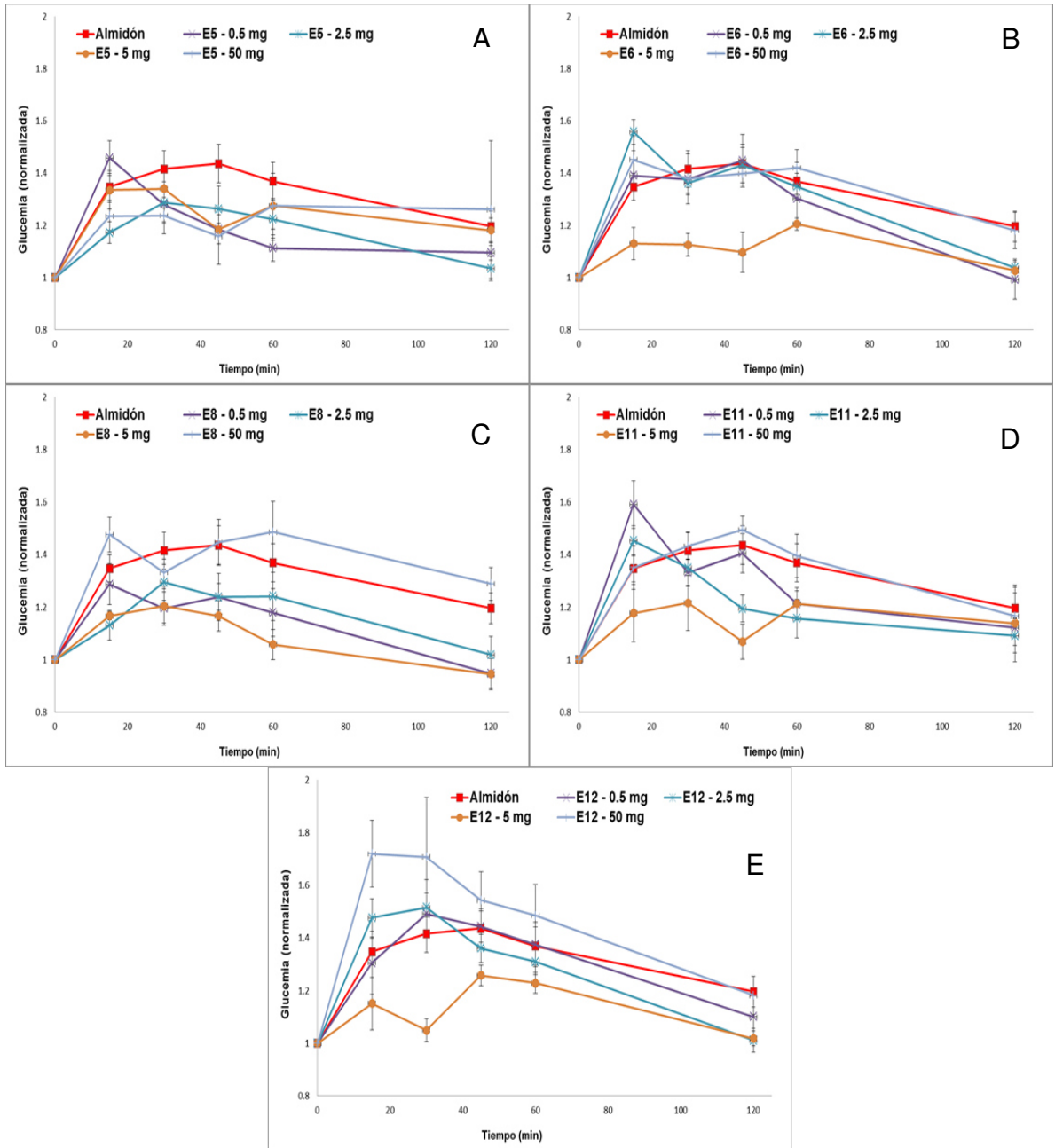


Figura 31. Cinética de Glucemia Promedio Normalizada para Extractos Inhibidores de α -Amilasa. (n=5). A: E5; B: E6; C: E8; D: E11; E: E12.

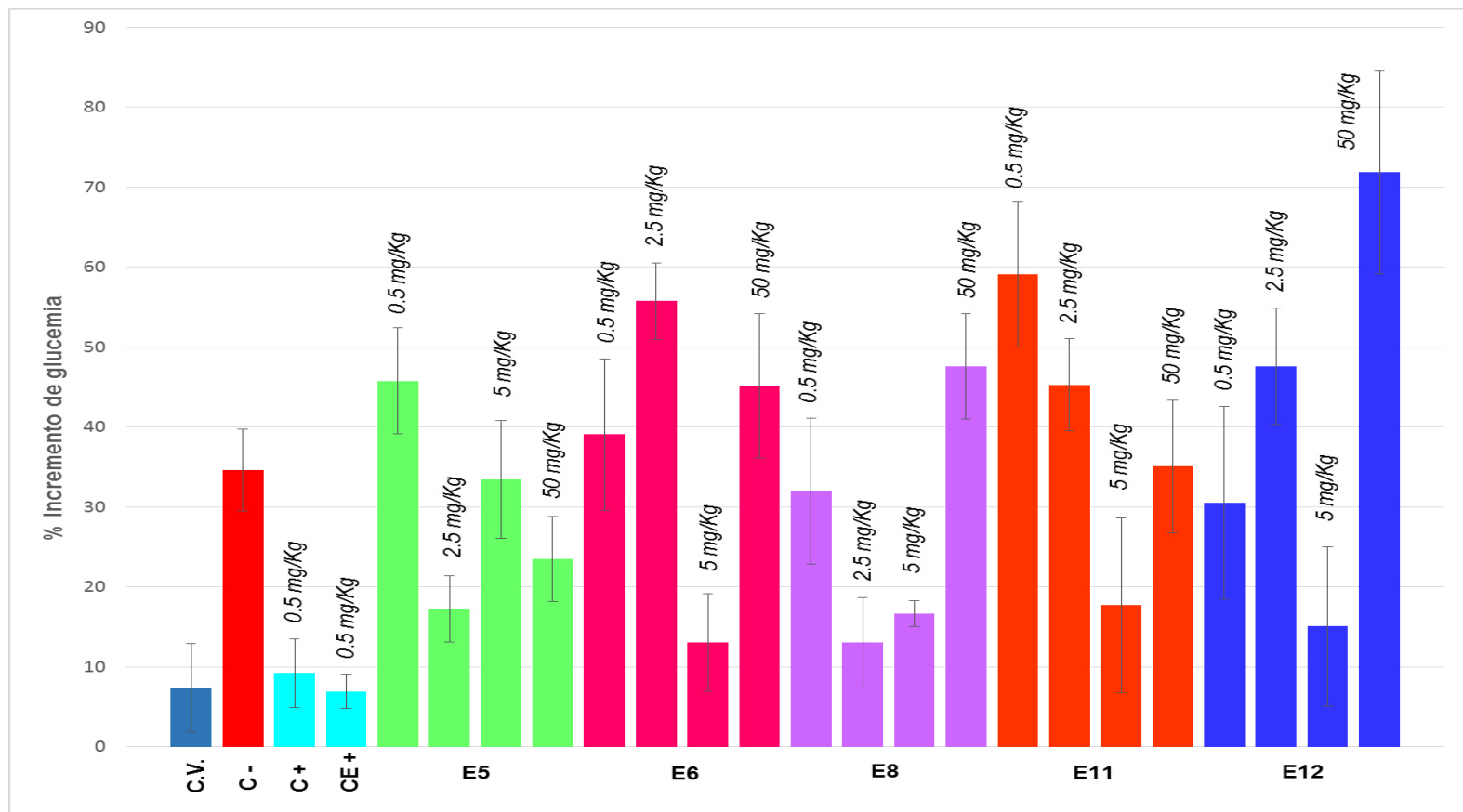


Figura 32. Pico Glucémico a los 15 min Obtenido para los Controles y Extractos Inhibidores de α -Amilasa administrados vía oral. C.V.: vehículo; C-: almidón, 1g/kg; C+: acarbosa 0.5 mg/kg + almidón 1g/kg; CE+: PPHT (hidrolizado proteínico de leguminosa) 0.5 mg/kg + almidón 1g/kg; E5, E6, E8, E11, E12: extractos de prueba en concentraciones 0.5, 2.5, 5, 50 mg/kg + almidón 1g/kg. n=5, promedio \pm DEM.

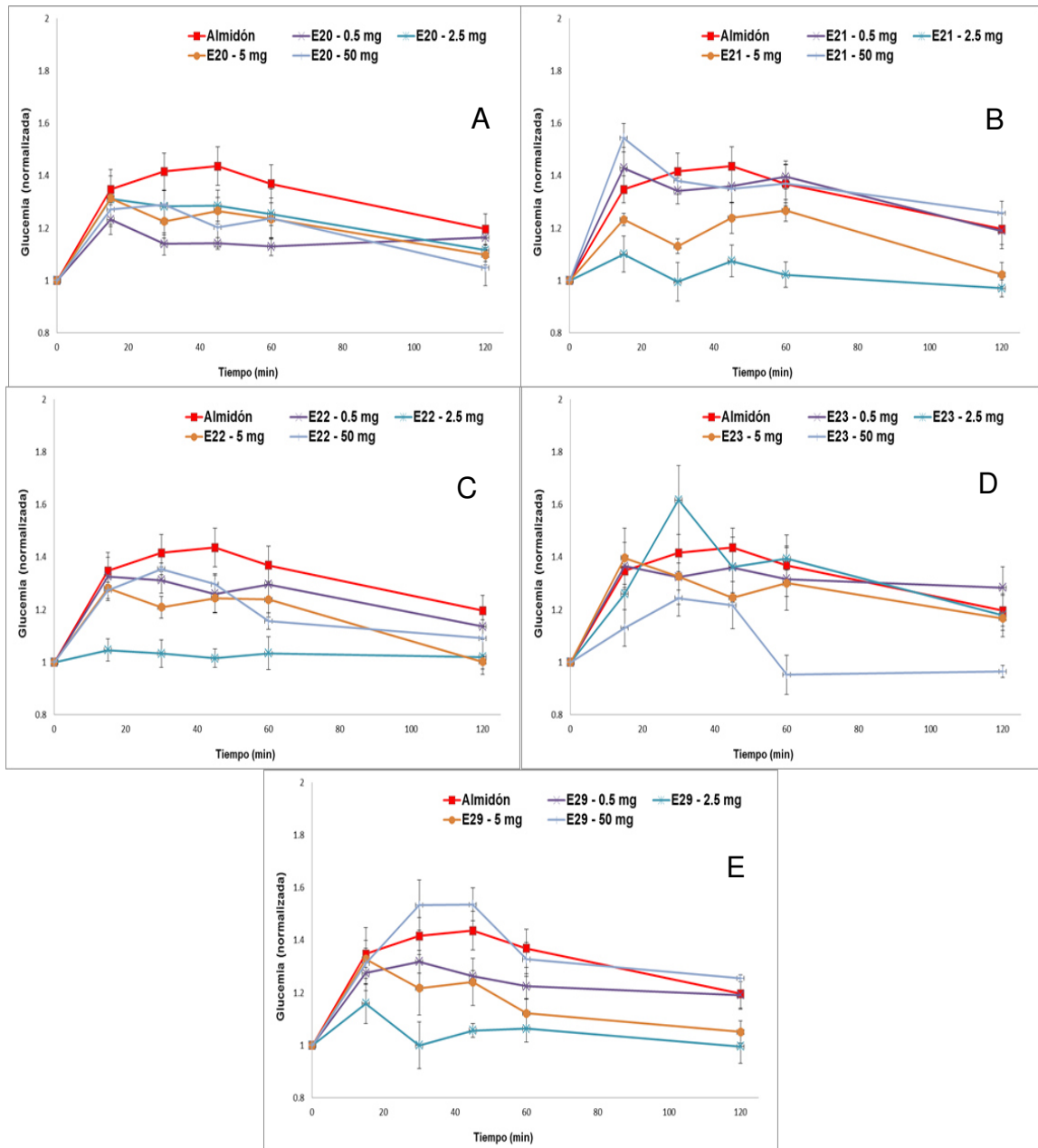


Figura 33. Cinética de Glucemia Promedio Normalizada para Extractos Sin Actividad Inhibitoria. (n=5). A: E20; B: E21; C: E22; D: E23; E: E29.

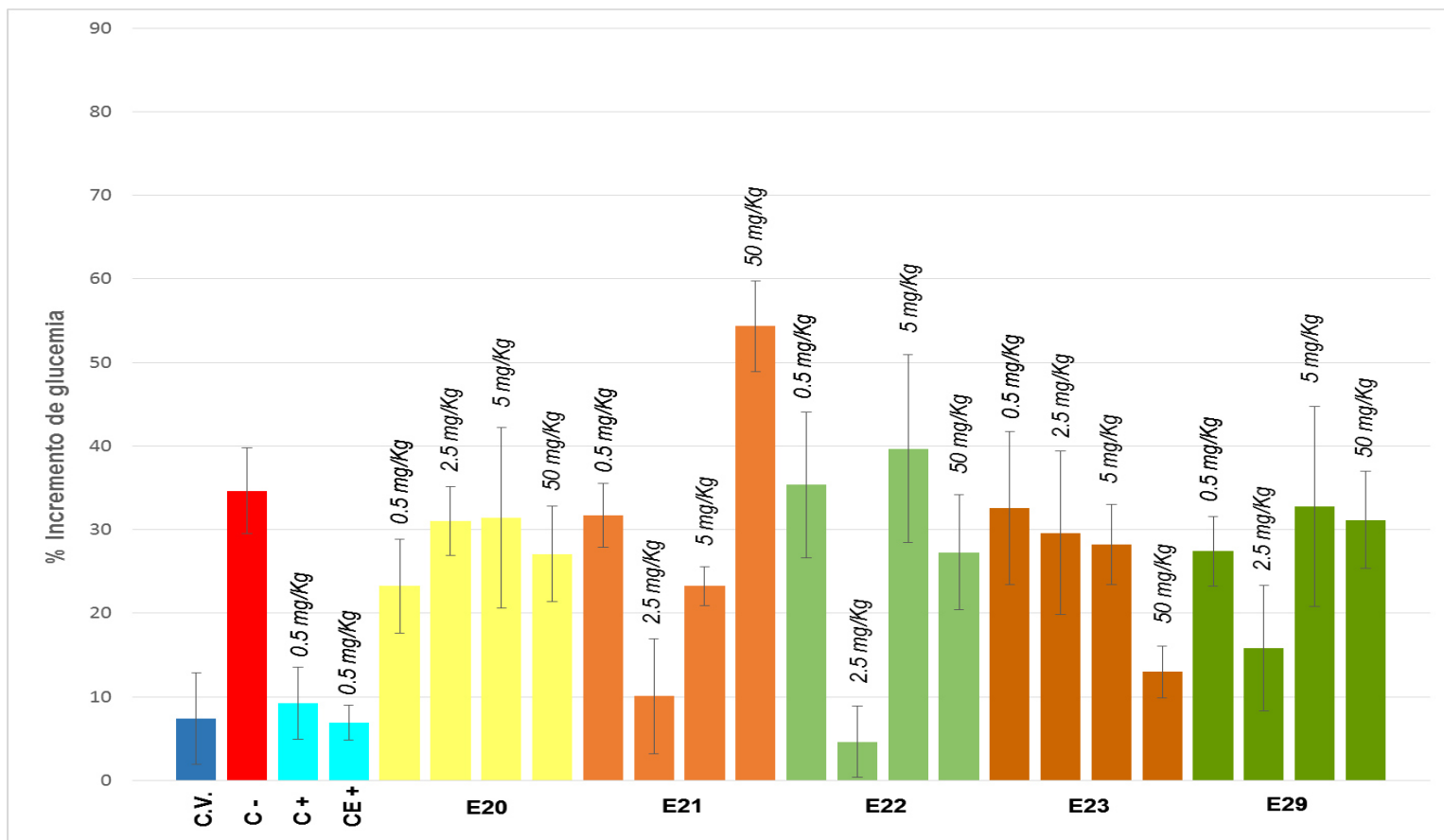


Figura 34. Pico Glucémico a los 15 min Obtenido para los Extractos Sin Actividad Inhibitoria administrados vía oral.
 C.V.: vehículo; C-: almidón, 1g/kg; C+: acarbosa 0.5 mg/kg + almidón 1g/kg; CE+: PPHT (hidrolizado proteínico de leguminosa) 0.5 mg/kg + almidón 1g/kg; E20, E21, E22, E23, E29: extractos de prueba en concentraciones 0.5, 2.5, 5, 50 mg/kg + almidón 1g/kg.
 n=5, promedio \pm DEM

CAPITULO 7

DISCUSION

Los métodos de alto rendimiento son una herramienta ampliamente utilizada en el descubrimiento de nuevos fármacos, pues gracias a que son métodos *in vitro* a microescala ofrecen ventajas como rapidez, reducción de costos y residuos, además de disminuir los animales de experimentación (Szymański et al., 2012; Martis et al., 2011; Schroeder et al., 2011).

Aunque el propósito de los métodos de alto rendimiento es generar datos confiables que sean relevantes para su aplicación en humanos, se sabe que la principal desventaja ha sido su baja correlación con los resultados *in vivo*. Lo cual puede deberse a que en los ensayos *in vitro* sólo se toma en cuenta un solo mecanismo para la actividad evaluada, mientras que en los modelos *in vivo* intervienen una gran cantidad de factores.

En la literatura puede encontrarse con frecuencia que se realizaron “pequeñas variaciones” a los métodos de referencia, sin tomar en cuenta como estas modificaciones pueden afectar la respuesta final. Esta situación dificulta comparar los resultados entre ensayos que deberían ser iguales. Por lo que, habrá falta de concordancia entre referencias bibliográficas de controles positivos (CE_{50} o CI_{50}) en un ensayo *in vitro* que utiliza la misma metodología y, por tanto, se contribuye a la falta de relevancia de este tipo de ensayos. Debido a esto, la primera etapa del presente trabajo consistió en realizar una búsqueda bibliográfica de un método reportado para cada actividad y analizar las diferencias en las condiciones experimentales y las concentraciones efectivas medias para determinar las concentraciones de los controles positivos reportados.

Se identificaron y optimizaron las variables del método que presentaron mayor efecto sobre la respuesta, para lo cual se utilizó un método factorial fraccionado (excepto para la optimización del método de ABTS) que permitió tener un buen compromiso entre el número de experimentos que se tienen que

realizar y la información que se obtiene. Los resultados se evaluaron utilizando un diagrama de Pareto.

Dicho diagrama se basa en el principio de Pareto, el cual afirma que en todo grupo de elementos o factores que contribuyen a un mismo efecto, unos pocos son responsables de la mayor parte de dicho efecto. El análisis de Pareto es por tanto una comparación cuantitativa y ordenada de elementos o factores según su contribución a un determinado efecto. Este diagrama se evalúa en base a una línea de significancia (línea vertical que atraviesa el diagrama), la cual sirve para visualizar la frontera entre los “pocos vitales” (causantes del 80% de la variación de la respuesta) y los “muchos triviales” (causantes del 20% de la variación de la respuesta) (Fundibeq, 2015). Una vez identificadas las variables significativas, se llevó a cabo un método simplex secuencial básico, con el que se determinaron las mejores condiciones para obtener la respuesta óptima.

Cabe mencionar que, en el proceso de optimización, si bien se trató en la mayoría de los casos de ensayos biológicos, se tomaron en cuenta los aspectos técnicos de la cuantificación, en este caso la espectrofotometría UV-Vis, ya que para lograr obtener resultados confiables, se deben tomar en cuenta sus especificaciones y limitantes. Un ejemplo muy claro es el error fotométrico. Cuando los valores de transmitancia son altos, el poder radiante y el incidente son aproximadamente iguales y el error relativo en la medición de la absorbancia es muy grande. Mientras que, si los valores de transmitancia son muy bajos, el poder radiante que llegará al detector será demasiado pequeño y

las determinaciones no serán exactas. De esta forma, puede inferirse que hay un intervalo medio de absorbancias en el que existe mayor exactitud en las mediciones. Tomando en cuenta la incertidumbre en la medición de la absorbancia (error fotométrico de cada instrumento), se pueden realizar curvas que permiten establecer que, la mayor exactitud en las medidas de absorbancia está en el intervalo entre 0.2 y 0.8. Por lo que se recomienda ajustar las concentraciones para que las medidas de absorbancia estén dentro de este rango óptimo (Skoog et al., 2008).

En el caso de los ensayos enzimáticos, se realizó una cinética enzimática con el fin de establecer la concentración óptima de sustrato que debía utilizarse en cada método, tal como lo sugiere el protocolo de Eli-Lilly (2007).

Un problema común cuando se trabaja con productos naturales, es el efecto de matriz, que en química analítica se define como el efecto de todos los componentes de la muestra, distintos al analito, en una cuantificación del analito. (IUPAC, 1989). Cuando se aplica un método analítico, el efecto de matriz se traduce en una diferencia de sensibilidad, al comparar una curva de calibración en solvente frente a una que se realiza en una muestra (extracto en este caso). La sensibilidad es la variación de la señal analítica frente a la concentración, es decir, la pendiente de la curva de calibración (IUPAC, 1997). Por lo tanto, la diferencia entre las pendientes de una curva de calibración en solvente y en la matriz de la muestra, indica la presencia de un efecto de matriz, el cual es un efecto indeterminado de las especies que están en la muestra y

afectan la sensibilidad. En el presente trabajo se evaluó esta diferencia entre las pendientes por medio de una prueba t.

En la literatura se encontraron muy pocos reportes de ensayos a los que se les realice una validación analítica, que permita establecer parámetros de exactitud, precisión, especificidad, linealidad y robustez, tal como lo recomiendan las guías internacionales como ICH o USP (ICH, 2005b; USP, 2010); o los parámetros que recomienda la Guía para el Desarrollo de Ensayos de Alto Rendimiento de Eli-Lilly (2007), como lo son la uniformidad de placa y variabilidad de señal, para asegurar que la posición de la placa en la que se realice el experimento no afectará la respuesta. También dentro de la Guía de Eli-Lilly se recomienda determinar el factor Z, que es un parámetro ampliamente aceptado entre la comunidad que trabaja con ensayos de alto rendimiento como una forma de evaluar el desempeño estadístico de un ensayo. El factor Z es una combinación de las ventanas de señal y variabilidad que indican relativamente la separación de la señal y el fondo. Por esta razón en el presente trabajo se validaron todos los parámetros recomendados en las diferentes guías, para garantizar la confiabilidad y calidad de los resultados obtenidos.

Entre los métodos que se reportan en la literatura para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, los más utilizados debido a su simplicidad y rapidez son aquellos que involucran la reducción de radicales libres. Los ensayos más destacados de este tipo son DPPH y ABTS, ya que son sencillos de implementar y se consiguen resultados reproducibles (Dudonné et al., 2009a).

7.1 Método de Reducción del Radical Libre DPPH.

En la literatura se encontraron referencias que utilizaron diferentes controles positivos, o bien no utilizaban ningún control. Se seleccionaron aquellas que utilizaron quercetina como control positivo, por ser el compuesto más utilizado. Sin embargo, como ya se ha mencionado, en estas referencias se encontró una gran variabilidad en los valores de Concentración Efectiva media (CE_{50}) para quercetina, que van desde 1.31 hasta 19300 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 11), aunque se trata del mismo método con algunos cambios, estos evidentemente afectan el resultado del ensayo. Por ejemplo, Iacopini et al. (2000) reportaron una CE_{50} de 1.66 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, Lee et al. (2009) reportaron 2.72 y Sadek et al. (2009) 36 $\mu\text{g/mL}$, interesantemente los tres utilizaron el método reportado por Brand Williams et al. (1995).

Para iniciar con la etapa de optimización, primero se determinó la CE_{50} de quercetina con un método en tubo que se realizaba con anterioridad en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Química Analítica. Se optimizaron las condiciones experimentales que en la búsqueda bibliográfica reportaban mayor variabilidad; además de la longitud de onda de lectura ya que, si bien en las referencias se establecía una longitud de onda de 517 nm, esto no fue técnicamente posible en el lector de placas (Thermo Scientific, Multiskan FC) que se utilizó, pues cuenta con un sistema de filtros para la selección de la longitud de onda, por lo que se evaluaron los dos filtros más cercanos a la longitud de onda reportada.

Después de realizar los experimentos del diseño factorial se obtuvo el diagrama de Pareto que mostró las condiciones e interacciones que fueron las que causaban el mayor efecto sobre la respuesta (Figura 7) y, por lo tanto, con las que se continuó el método simplex secuencial básico. Las respuestas en el método simplex fueron tomados como los porcentajes de reducción más cercanos al 50 %, siempre que el valor absorbancia del control con 0 % de reducción fuera mayor a 0.4.

El primer paso en el método simplex (Tabla 12, sección 6.1.2) fue descartar el conjunto de condiciones experimentales con el menor porcentaje de reducción (experimento 2) y se calcularon nuevas condiciones experimentales para el experimento 5 con la Fórmula 3. El resultado de este cálculo fue un valor negativo para la concentración de DPPH. A partir de los resultados de porcentaje de reducción de los experimentos 1, 3 y 4, ya que fueron las que produjeron el valor más cercano al 50 %, que además presentaba resultados aceptables de absorbancia para el control ($A = 0.7500$). Se decidió que las condiciones del experimento número 4 fueron las óptimas.

En la validación se evaluó la linealidad utilizando tres aproximaciones y en todos los casos el método fue lineal. No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de regresión, ni en las CE_{50} de quercetina en etanol y de extracto adicionado, por lo que en este método no se presentó efecto de matriz al utilizar *J. dioica*. Se determinó el rango lineal de 7.2 a 121.7 μM de DPPH equivalente a un rango de absorbancia entre 0.1009 y 0.6733. La CE_{50} que se determinó por este método fue $4.3 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$, sin

embargo no es comparable con los reportes de la literatura, ya que como se comprobó experimentalmente en este trabajo, solo pueden compararse datos que se hayan obtenido bajo las mismas condiciones. Por lo que se sugiere que, al realizar modificaciones, sin importar su magnitud, se debe comprobar por algún método estadístico (por ejemplo, prueba de tukey) que no produce diferencia significativa en la respuesta.

La precisión se evaluó el mismo día y en días diferentes, como se sugiere en las guías de validación de métodos analíticos. En todos los casos se presentaron desviaciones estándar relativas menores a 6.8%, por lo que el método se considera preciso, tanto intradía como interdía (Tabla 14).

La exactitud se evaluó por dos diferentes formas: por medio del porcentaje de error, siendo en todos los casos menor al 5.81 % (Tabla 14) y por la evaluación de la correlación de concentraciones de quercetina (control positivo), donde se obtuvo una pendiente cercana a 1 y un coeficiente de determinación mayor a 0.99 que indican que el método es exacto (Figura 11).

Se estableció el límite de cuantificación y el límite máximo de cuantificación experimentalmente, tomando en cuenta las 3 curvas realizadas para la determinación de linealidad. La menor concentración de DPPH que se puede determinar con exactitud y precisión es de 121.7 μM , mientras que la máxima concentración de DPPH es 7.2 μM . Es importante tomar en cuenta estos valores al momento de reproducir el método.

En la prueba de robustez se determinó que el método es robusto si la concentración de DPPH varía 5 μ M. Además, se evaluó el efecto de solvente, ya que es común que los extractos naturales sean acuosos o bien sea necesario disolverlos en DMSO debido a su composición. Se comprobó por medio de la prueba de tukey ($\alpha=0.05$) que se puede utilizar 25% de agua y hasta 0.25% de DMSO (Tabla 18).

La uniformidad de placa y variabilidad de señal se evaluó siguiendo el protocolo de Eli Lilly (2007) para ensayos de alto rendimiento, con el fin de asegurar que la respuesta no es afectada por la posición de la placa en que se realice una prueba o por las concentraciones con las que se trabaje. En todos los casos se obtuvieron % DER menores a 14 %. De acuerdo al protocolo mencionado, se considera que la variabilidad es aceptable.

El factor Z fue determinado con valores mayores a 0.94. Un ensayo con con valores ≥ 0.5 se considera excelente con una ventana de detección grande. En general, el método optimizado de reducción de DPPH en microplaca fue lineal, preciso, exacto y con una amplia ventana de detección.

7.2 Método de Reducción del Radical Libre ABTS

En la búsqueda bibliográfica del método de reducción del radical libre ABTS se tomó en cuenta que las referencias utilizaran el mismo método, aunque presentaran las ya mencionadas variaciones en condiciones experimentales. El control positivo fue trolox. Se encontraron reportes de CE_{50} desde 2.43 hasta 273 μ g/mL (Tabla 19). Siete autores reportaron que se

basaron en el mismo método reportado por Re (1999), sin embargo las CE_{50} reportada en dichos artículos varían desde 2.85 a 29.10 $\mu\text{g/mL}$.

La literatura menciona que la solución del radical ABTS no se prepara solamente pesando y disolviendo un reactivo, sino que el radical se genera mezclando ABTS y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en agua y reposando esta solución entre 12 y 16 horas, por lo que no se puede hablar de la concentración en función de peso/volumen. Es por eso que cuando se habla de concentración, se menciona que se realizó un ajuste en la absorbancia, es decir, que la solución con el radical ABTS^{*+} se diluye hasta alcanzar el valor deseado. En lo referente a los % ABTS, se refiere al volumen de la solución de ABTS^{*+} que se utiliza en el volumen total del experimento.

La etapa de optimización inició con la determinación de la CE_{50} de trolox con un método en tubo, con este valor se realizaron los siguientes experimentos. Se realizó un experimento factorial fraccionado, sin embargo no fue posible identificar las condiciones críticas del método, por lo que se llevó a cabo un método factorial completo, con un mayor número de experimentos.

El diagrama de Pareto indicó las variables experimentales que tuvieron mayor influencia sobre la respuesta (Figura 12). Se continuó la optimización por medio del método simplex secuencial básico.

Se siguieron las reglas del método simplex, tomando en cuenta los porcentajes de reducción, sin embargo, las condiciones a las que se consiguió el mejor resultado (experimento 6, Tabla 20) presentaron valores de

absorbancia muy bajos para el control de 0% de actividad, del cual se parte para determinar el % reducción de las muestras problema. Un bajo valor de absorbancia significa que se tienen concentraciones muy bajas del analito absorbente (ABTS⁺) que proporciona el color (de hecho, en la práctica se trata de una solución casi transparente) por lo que cualquier problema presentaría falsos positivos.

Por esta razón se evaluaron concentraciones más altas de ABTS por medio de un método de optimización clásica, utilizando las mismas concentraciones de trolox y las condiciones del experimento 1 (Tabla 21), que mostraron los mejores resultados. De esta forma se estableció que la concentración de ABTS a la que se presentaban los mejores resultados, fue 70%.

Con el método optimizado, se evaluó la linealidad por tres aproximaciones. En todos los casos el coeficiente de determinación (r^2) fue satisfactorio y se considera que este método es lineal, dentro de los rangos determinados. Además, para evaluar el efecto de matriz se compararon las pendientes de la curva de calibración de trolox en solvente (Figura 13) y en extracto adicionado (Figura 14), siendo significativamente diferentes. Esta diferencia en las pendientes, indica que existe un efecto de matriz, por lo que se sugiere que al determinar la CE_{50} de una muestra se realice un blanco de muestra. Se estableció el rango lineal de entre 5.25 y 66 % de ABTS y se determinó una CE_{50} 2.96 ± 0.05 $\mu\text{g/mL}$ de trolox.

El método fue preciso tanto intradía e interdía, ya que todas las desviaciones estándar relativas fueron menores a 9.75 %. El ensayo fue exacto, produciendo porcentajes de error menores a 2 % y por medio de la correlación entre la concentración real de estándares de trolox y la concentración calculada que dio una pendiente de 1 y un r^2 de 0.9949.

Se estableció el límite de cuantificación en 5.25 % y el límite máximo de cuantificación en 66 % de ABTS.

Se determinó que el método es robusto dentro de los límites evaluados para la concentración de ABTS. El ajuste de absorbancia se puede variar entre ± 0.05 y 5 %, sin que haya cambios significativos en la respuesta. Se evaluó el efecto de solvente en este ensayo y se estableció que puede utilizarse DMSO hasta en un 0.15 % y que no debe utilizarse agua, pues esto afectará el porcentaje de reducción.

La uniformidad de placa y variabilidad produjeron desviaciones estándar relativas menores a 13.1 %.

El factor Z fue determinado con valores mayores a 0.89, por lo que se puede considerar un ensayo excelente.

7.3 Método de Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.

En la búsqueda bibliográfica para el método de α -glucosidasa, se consideraron las referencias que usaran un mismo método y acarbosa como control positivo. Acarbosa es un medicamento con actividad antihiper glucémica

que tiene como mecanismo de acción la inhibición de enzimas digestivas como la α -glucosidasa. Las CI_{50} reportadas varían entre 0.00037 y 17 mg/mL (Tabla 28). Interesantemente los autores, que utilizaron el método reportado por Matsui (1996), reportan valores de CI_{50} desde 0.27 a 17 mg/mL.

Antes de iniciar la optimización, se analizó el uso de carbonato de sodio para terminar la reacción enzimática. La actividad de α -glucosidasa se basa en la detección del p-nitrofenol a 405 nm (pKa 7.2), el cual es liberado del sustrato, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (Figura 5). Si al terminar la reacción se agrega carbonato, se tendrá un medio básico (pH 10) y por lo tanto el producto que se formará será p-nitrofenóxido. Si no se utiliza carbonato habrá una mezcla de p-nitrofenol y p-nitrofenóxido. Se realizó un barrido para conocer los espectros que se presentarían en ambas condiciones y se determinó que los espectros fueron considerablemente diferentes y que 405 nm es la longitud de onda de máxima absorción del p-nitrofenóxido. Por esta razón es necesario utilizar carbonato de sodio. Las referencias que no utilizaban carbonato fueron descartadas.

Para iniciar con la etapa de optimización, se determinó la CI_{50} de acarbosa con un método en tubo, este valor se utilizó en los experimentos posteriores. A continuación se llevó a cabo un método factorial fraccionado. Los resultados se evaluaron con un diagrama de Pareto (Figura 17) y las condiciones que resultaron significativas se optimizaron con un método simplex secuencial básico. Las mejores respuestas para el simplex se eligieron en base al porcentaje de inhibición, pero tomando en cuenta el control de 0% de inhibición,

cuya absorbancia debía encontrarse por encima de 0.4 (error fotométrico). Las mejores condiciones se obtuvieron con el experimento 4 (Tabla 29).

Se realizó una cinética enzimática para determinar la concentración de sustrato que debe utilizarse en el ensayo: La guía de Eli Lilly (2007) recomienda utilizar concentraciones de sustrato iguales o menores al valor de K_m , pues si el extracto que se evalúa presenta inhibición competitiva, concentraciones de sustrato mayores a K_m harán que se dificulte la identificación de este tipo de inhibidores. En el ensayo de inhibición de α -glucosidasa, se estableció una concentración de sustrato de 33.6 $\mu\text{g/mL}$ (111.5 μM).

Se evaluó la linealidad del método optimizado por dos aproximaciones distintas y en ambos casos se obtuvieron coeficientes de determinación mayores a 0.99, por lo que se consideran lineales, dentro de los rangos establecidos. Se encontró diferencia significativa entre las pendientes de la curva de regresión de acarbosa en solvente y en extracto; por lo que se considera que existe efecto de matriz.

Se estableció que el método fue preciso tanto intradía como interdía, ya que los coeficientes de variación fueron menores a 1.8 %.

Se calculó el porcentaje de error, menor a -1.53 %, lo que indica que el método es exacto. Además, en la correlación de concentraciones de acarbosa calculada y real se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.995 y una

pendiente de 1.0001, que indica una fuerte correlación, por lo que se confirma que el método fue exacto.

Se estableció la mínima respuesta se obtuvo utilizando la concentración de acarbosa de 99 $\mu\text{g/mL}$ y la máxima es de 310.2 $\mu\text{g/mL}$.

La prueba de robustez indicó que en este método la respuesta no se ve afectada si la temperatura de incubación es de hasta 39 °C y el tiempo de incubación llega a ser de 20 minutos. Sin embargo, es importante controlar la concentración del sustrato y la enzima, además la temperatura de incubación no debe ser menor a 37 °C y el tiempo de incubación no debe ser menor a 17.5 minutos, ya que pequeñas diferencias ocasionan cambios significativos en la respuesta. Se evaluó el uso de diferentes proporciones de solventes, y se determinó que pueden utilizarse concentraciones de etanol hasta 25 % y DMSO hasta 0.25 %.

La prueba de uniformidad de placa y variabilidad de señal, la desviación estándar relativa fue menor al 7 % en todos los casos. El factor Z fue mayor a 0.96, por lo que se considera un ensayo excelente.

7.4 Método de Inhibición de la Enzima α -Amilasa.

Para seleccionar los antecedentes bibliográficos para el método de α -amilasa, se tomó en cuenta que se utilizara como fundamento la reacción enzimática entre almidón (sustrato) y la enzima α -amilasa, además, que los azúcares reductores que se producen fueran cuantificados por el método de

Miller (Tabla 37). Así mismo, que utilizaran como control positivo acarbosa. Las CI_{50} reportadas estuvieron entre 0.00068 y 47.5 mg/mL.

El presente trabajo tiene como objetivo la optimización y validación de métodos a microescala, sin embargo, en este caso el método de Miller (reacción entre los azúcares reductores y el ácido 3, 5–dinitrosalicílico) se debe llevar a cabo en un baño de agua hirviendo. Este paso fue imposible de realizar en microplaca, ya que se evapora un volumen significativo y esto afecta de manera importante la respuesta. Por esta razón se optó por llevar a cabo la reacción en un tubo de ensaye y transferir a una microplaca.

Para iniciar con la etapa de optimización, se determinó la CI_{50} de acarbosa en un método en tubo, con macrodiluciones. Posteriormente el método se optimizó con un método factorial fraccionado. Los resultados se evaluaron con un diagrama de Pareto (Figura 23). Las condiciones significativas se optimizaron con un método simplex secuencial básico. Se eligió el conjunto de condiciones que presentó un porcentaje de inhibición cercano al 50 % y un control de 0% de inhibición con absorbancias mayores a 0.4, es decir, el experimento 9 (Tabla 38). La concentración de sustrato, se determinó con una cinética enzimática en 0.38 mg/mL (1.11 mM) de almidón.

Se evaluó la linealidad utilizando dos aproximaciones y en ambas el método fue lineal ($r^2 > 0.99$). Se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de regresión de acarbosa en solvente y en extracto

adicionado, así como en los valores de CI_{50} , lo que indica que se presentó interferencia de matriz.

El método fue preciso intradía e interdía, con desviaciones estándar relativas menores a 5 %. El ensayo se considera exacto, con porcentajes de error menores a 6 %. Se confirmó la exactitud del método con la correlación de concentraciones de acarbosa reales y calculadas. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9947 y una pendiente de 1, lo cual confirma la exactitud del ensayo.

Se estableció que este método es robusto para variaciones de dos minutos en la preincubación y un minuto en la incubación. En cuanto a la concentración de la enzima, es necesario que la concentración no exceda 0.15 U/mL. El tiempo en el baño de agua no deberá ser menor a 15.6 min. Además, en este método es posible utilizar como solventes hasta 25 % de etanol y hasta 0.5% de DMSO, sin que se vea afectada la respuesta.

Las desviaciones estándar relativas de la prueba de uniformidad de placa y variabilidad de señal fueron menores a 5.02. El factor Z fue determinado con valores mayores a 0.94.

7.5 Aplicación de los Ensayos Optimizados y Validados a Extractos de Plantas.

7.5.1 Evaluación de la Actividad Antirradicalaria.

Se evaluó la capacidad antirradicalaria de 30 extractos tanto por el método de reducción del radical libre DPPH, como por el de ABTS. Aunque presentaron

distintos valores de CE_{50} , los extractos que tuvieron mayor actividad (menor CE_{50}) en el método de DPPH, también lo tuvieron por ABTS. Los extractos que presentaron baja actividad (mayor CE_{50}) lo hicieron por ambos métodos. Estos resultados coinciden con lo encontrado en la bibliografía, donde si bien se evaluaron otras muestras, ambos ensayos muestran respuestas similares y son capaces de distinguir los extractos activos de aquellos que no lo son (Floegel et al., 2011; Dudonné et al., 2009b).

Debido a que se trata de extractos de plantas en proceso de aislamiento biodirigido, se consideraron como activos los extractos que presentaron CE_{50} menores a 100 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de DPPH y menores a 50 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de ABTS. En base a este criterio, entre 20 y 23 extractos presentaron actividad antirradicalaria, lo cual puede deberse a que es común que los extractos de plantas contengan compuestos polifenólicos, conocidos por presentar propiedades antioxidantes.

Aunque ambos métodos se basan en la inhibición de un radical libre, se recomienda llevar a cabo ambos cuando se desee evaluar la actividad de un extracto. Tal como se observó en el caso del extracto 9 (Tabla 46) no fue posible determinar la CE_{50} por el método de DPPH, ya que el intervalo lineal se situó por debajo del 50 % de reducción. Lo mismo sucedió con el extracto 24, pero en el método de ABTS. Es posible que en ambos casos se trate de un efecto de matriz. Sin embargo, es importante observar que para ambas muestras se pudo determinar la CE_{50} por alguno de los métodos.

7.5.2 Evaluación de la Inhibición Enzimática.

Con los métodos de inhibición enzimática optimizados y validados, se evaluó la actividad de 30 extractos de plantas. Se consideraron como activos aquellos que presentaron valores de CI_{50} menores a 300 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de glucosidasa y menores a 25 unidades en el caso de amilasa.

Aunque se esperaba que un mismo extracto presentara actividad inhibitoria sobre las dos enzimas, esto no sucedió así en todos los casos. Solo 4 de los extractos tuvieron actividad inhibitoria sobre las dos enzimas. Aunque hubo otros 6 que presentaron actividad inhibitoria sobre una enzima y no sobre la otra (Tabla 47).

7.6 Evaluación de Extractos por Modelos *in vivo*.

Debido a que los extractos naturales son una fuente importante de compuestos con actividad biológica es necesario su estudio, para confirmar los beneficios de las plantas sobre las terapias existentes. Dichos estudios incluyen la elucidación de los mecanismos de acción, los efectos terapéuticos y la evidencia de su actividad (Jelodar et al., 2007).

Las pruebas *in vivo* son necesarias para justificar los resultados positivos *in vitro*, ya que no siempre existe correlación, pues en el modelo *in vitro* se evalúa un sólo mecanismo de acción (Ali et al., 2013). Es posible que la falta de correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo* se deba a la falta de optimización y validación analítica, que permita evitar falsos positivos. A partir

de los extractos evaluados por los métodos *in vitro*, se seleccionaron 10 de ellos, cinco con la mejor actividad (CE_{50} o CI_{50} bajas) y cinco con los peores resultados (CE_{50} o CI_{50} altas) para someterlos a evaluación en modelos *in vivo*.

7.6.1 Actividad Hepatoprotectora.

Los radicales libres y el estrés oxidativo se han asociado con numerosas enfermedades hepáticas, como cirrosis, daño al tejido hepático y carcinoma (Lim et al., 2016). El modelo de exposición a CCl_4 es el más común en la investigación del efecto hepatoprotector de extractos naturales. El CCl_4 causa toxicidad hepática aguda y crónica, que resulta en esteatosis, necrosis celular y cirrosis. Si bien el daño hepático inducido por CCl_4 es poco común, tiene los mismos factores patogénicos que existen en otras enfermedades hepáticas causadas por virus o medicamentos, por lo que la inducción de daño con CCl_4 es un ensayo representativo en el estudio de antioxidantes de origen natural (Tong et al., 2015).

El modelo de daño hepatocelular por CCl_4 involucra la formación de radicales libres de triclorometilo (CCl_3), los cuales son altamente reactivos y letales, ya que se convierten en el radical peroxi triclorometilo (CCl_3OO^*) por la vía del citocromo P450, resultando en una condición de estrés oxidativo. Esto inicia la autoxidación de lípidos por la vía de unión a los ácidos de la membrana citoplásmica poliinsaturada, conduciendo al daño en la membrana celular y eventualmente al daño hepático (Wahid et al., 2016).

Los niveles elevados en plasma de enzimas como AST y ALT están asociados al daño hepático, ya que rompe las funciones de transporte de los hepatocitos. El daño en las células hepáticas libera una variedad de enzimas localizadas en el citosol, a la sangre, lo cual causa el incremento de los niveles de las enzimas en suero. La estimación de las enzimas en suero es el marcador cuantitativo que se utilizó en este trabajo como indicador del daño hepatocelular (Ghosh et al., 2016).

El Legalón[®] (silimarina) se utilizó como control positivo, y está compuesto de un complejo de flavonoides obtenido de *Silybum marianum*. El efecto hepatoprotector de este producto natural se ha atribuido previamente a sus propiedades antioxidantes (Wahid et al., 2016).

Se evaluaron 10 extractos naturales utilizando un modelo en ratas a las que se les indujo daño hepático con CCl₄ (Tabla 48).

La comparación de los niveles basales de las enzimas AST y ALT contra los niveles después de administrar por 7 días el control positivo o el extracto de prueba, demostró que los extractos 4 y 5 causaron efectos adversos (Tabla 42).

Después de la administración de CCl₄, el grupo de toxicidad aguda presentó niveles elevados de las enzimas AST y ALT, significativamente diferentes a los niveles que presentó el grupo control negativo, por lo que se determinó que la administración de la dosis utilizada de CCl₄ provocó daño hepático.

Todos los extractos estudiados redujeron los niveles de la enzima ALT de manera significativa, comparados con el control de toxicidad aguda, mientras que el Legalón® pareció no tener efecto positivo al tiempo evaluado.

El grupo al que se le administró Legalón® y los extractos 25, 26, 29 y 30 disminuyeron de forma significativa los valores de la enzima AST en comparación con el grupo de toxicidad aguda.

La enzima ALT es más específica de daño hepático que AST, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, se encuentra en corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos (García Martín, 1998). Desde este punto de vista, parece ser que todos los extractos evaluados presentaron algún grado de hepatoprotección al reducir los niveles de ALT.

Todos los extractos que tuvieron efecto *in vitro*, también lo tuvieron en el ensayo *in vivo*, lo cual permite asumir que el mecanismo de acción de los extractos 1, 2, 3, 4 y 5 es a través de la reducción de radicales libres. Sin embargo, extractos sin actividad antirradicalaria *in vitro* presentaron actividad *in vivo*.

Aunque pareciera que hay una falta de selectividad, es importante remarcar que solo se evaluó una dosis *in vivo*, por lo que debe considerarse que es necesario evaluar otras dosis, un mayor número de muestras o, controles para evaluar dicho efecto, antes de cualquier conclusión.

7.6.2 Actividad Antihiperglucemiante.

En la actividad antihiperglucemiante se evaluó la capacidad de los extractos de plantas para disminuir el pico de glucemia en sangre que se produce por la administración de una fuente de carbohidratos, en este caso almidón. Estudios clínicos han reportado que la hiperglucemia postprandial es un factor de riesgo independiente y directo de enfermedades cardiovasculares en individuos diabéticos y no diabéticos (Gerich, 2003).

El manejo de la hiperglicemia postprandial se puede lograr por medio de la inhibición de dos vías fisiológicas: la digestión de polisacáridos en monosacáridos por las enzimas digestivas; y la absorción intestinal de monosacáridos por los transportadores intestinales de glucosa (Yusoff et al., 2015).

El proceso de digestión de carbohidratos se basa en la degradación enzimática de azúcares complejos (polisacáridos) a monosacáridos, siendo los más abundantes glucosa, fructosa y galactosa. Estos productos de digestión son absorbidos por el intestino delgado e ingresan a la sangre para ser distribuidos a todas las células del organismo (Seeley et al., 2003).

Los carbohidratos no sufren ninguna transformación química en el estómago. Es en el intestino delgado donde ocurre la mayor parte de la digestión de los carbohidratos, ya que ahí se secretan los fluidos producidos por el páncreas y algunas células de las paredes del intestino, que llevan en solución enzimas específicas para hidrolizar carbohidratos, como la α -amilasa

pancreática y la α -glucosidasa (ejemplos de ella: glucoamilasa, sacarasa, maltasa e isomaltasa). En el intestino delgado queda una mezcla de monosacáridos provenientes de carbohidratos complejos. Estas unidades son absorbidas por las células de las paredes intestinales, pasando hacia la sangre y a través del sistema porta-hepático, son conducidas hacia el hígado, el cual recibe una mezcla de monosacáridos. Es importante mencionar que en condiciones normales no ingresan a la sangre carbohidratos complejos (Martínez Guerra, 2002).

Cuando un organismo vivo expuesto a una muestra prueba ocurre la disminución del pico glucémico dentro de los primeros 15 minutos después de la administración de almidón, se puede asumir, que el mecanismo de acción es a través de la inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa. La disminución de glucemia en tiempos prolongados sugiere otros mecanismos, entre ellos la acción hipoglucémica de la insulina.

Los controles positivos acarbosa y PPHT utilizados en este estudio presentaron la mayor inhibición a una dosis de 0.5 mg/Kg. A esta misma dosis, el único extracto que presentó efecto similar fue el E1, el cual inhibió la α -glucosidasa *in vitro*.

Los extractos E3, E5 y E8 (que mostraron inhibición *in vitro* contra α -glucosidasa y α -amilasa) disminuyeron el incremento de glucemia a los 15 minutos, a dosis de 2.5 mg/Kg en comparación con el control negativo (almidón). Los extractos E1, E2, E3, E4, E6, E8, E11 y E12 a la dosis de 5

mg/Kg disminuyeron el pico glucémico de forma significativa a los 15 minutos. Al utilizar dosis de 50 mg/Kg, los extractos que mostraron efecto antihiper glucémico a los 15 minutos fueron E1, E4 y E5. Estos hallazgos sugieren que no hubo efecto dosis-respuesta (Figuras 29, 30, 31 y 32).

Por otro lado, de los extractos que no presentaron actividad inhibitoria *in vitro*, el extracto E21 mostró efecto antihiper glucémico a la dosis de 2.5 y 5 mg/Kg, el E22 y E29 a dosis de 2.5 mg/Kg y E23 a 50 mg/Kg. Aunque no se observó efecto dosis-respuesta (Figura 33 y 34).

Todos los extractos con actividad inhibitoria *in vitro* presentaron algún grado de actividad antihiper glucémica *in vivo*. Interesantemente a la dosis de 5mg/Kg 8 de los 9 extractos con acción inhibitoria *in vitro* presentó efecto *in vivo*, aunque también 1 de los 5 inactivos lo presentó. El efecto antihiper glucémico *in vivo* de los extractos inactivos contra α -amilasa y α -glucosidasa en parte puede ser debida a la inhibición de los transportadores de glucosa intestinales, mecanismo que debe ser evaluado en los modelos farmacológicos adecuados, como el saco intestinal invertido.

Diversos trabajos que estudian la relación de ensayos *in vitro* de inhibición enzimática con ensayos *in vivo* de tolerancia aguda al almidón, concuerdan con los resultados del presente trabajo, ya que encuentran correlación, pero no en todas las dosis (Pulbutr et al., 2016; Beejmohun et al., 2014; Afifi et al., 2015).

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

1. 23 extractos mostraron actividad antirradicalaria utilizando los métodos *in vitro* a microescala, optimizados y validados.
2. Diez extractos demostraron actividad hepatoprotectora en modelos *in vivo*.
3. 10 extractos mostraron inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa utilizando los métodos *in vitro* a microescala optimizados y validados.
4. Nueve extractos mostraron actividad antihiper glucemiante en modelos *in vivo*.

CAPITULO 9

PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios interlaboratorio con los métodos optimizados y validados en este trabajo, para establecer la precisión intermedia.
2. Evaluar diferentes dosis de los extractos incluidos en los modelos *in vivo*, así como otros extractos con actividad *in vitro*.

3. Aplicar los métodos validados a una mayor cantidad de extractos, para aumentar el número de muestras
4. Optimizar y validar ensayos con otras dianas, que indiquen las actividades biológicas incluidas en el presente trabajo o bien, de otras actividades biológicas.
5. Evaluar el efecto de los extractos con actividad antihiperoglucémica (activos e inactivos contra α -amilasa y α -glucosidasa) sobre el transporte intestinal de glucosa, mediante el modelo farmacológico del saco intestinal invertido.

BIBLIOGRAFIA

- Afifi, F.U., Kasabri, V., Litescu, S.C., Abaza I.M. *In vitro* and *in vivo* comparison of the biological activities of two traditionally and widely used *Arum* species from Jordan: *Arum dioscoridis* Sibth & Sm. and *Arum palaestinum* Boiss. *Natural Product Research*. 30, (16): 1–10. (2015).
- Ali, R.B., Atangwho I.J., Kuar, N., Ahmad, M., Mahmud, R., Asmawi, M. *In vitro* and *in vivo* effects of standardized extract and fractions of *Phaleria macrocarpa* fruits pericarp on lead carbohydrate digesting enzymes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13 (39): 1–11. (2013)
- Altekar, M., Homon, C.A., Kashem, M.A., Mason, S.W., Nelson, R.M., Patnaude, L.A., Yingling, J., Taylor, P.B. Assay optimization: a statistical design of experiments approach. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 11(1): 33–41. (2006).
- AOAC. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. p.1–38. (2002).
- Apostolidis, E., Li, L., Lee, C., Seeram, N.P. *In vitro* evaluation of phenolic-enriched maple syrup extracts for inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes relevant to type 2 diabetes management. *Journal of Functional Foods*. 3 (2): 100–106. (2011).
- Apostolidis, E., Kwon, Y.I. y Shetty, K.,(2007) Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8 (1): 46–54. (2007).
- Apostolidis, E. y Lee, C.M. *In vitro* potential of *Ascophyllum nodosum* phenolic antioxidant-mediated alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibition. *Journal of Food Science*. 75 (3): H97-102. (2010).
- Beejmohun, V., Peytavy-Izard, M., Mignon, C., Muscente-Paque, D., Deplanque, X., Ripoll, C. y Chapal N. Acute effect of Ceylon cinnamon extract on

- postprandial glycemia: alpha-amylase inhibition, starch tolerance test in rats, and randomized crossover clinical trial in healthy volunteers. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14 (1): 1-11. (2014).
- Beevi, S.S., Narasu, M.L. y Gowda, B.B. Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant foods for human nutrition*. 65 (1): 8–17. (2010).
- Boussaada, O., Chriaa, J., Nabli, R., Ammar, S., Saidana, D., Mahjoub, M.A., Chraeif, I., Helal, A.N., Mighri, Z. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts of *Evax pygmaea* (Asteraceae) growing wild in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24 (8): 1289–1296. (2008).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28 (1): 25–30. (1995).
- Burits, M. y Bucar, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 14: 323–328. (2000).
- Champe, P.H.R. Bioquímico., Editorial Wolters Kluwer, 4ta ed., España, (2007).
- Chan, H.H., Sun, H.D., Reddy, M.V.B., Wu, T.S. Potent alpha-glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. *major*. *Phytochemistry*. 71: 1360–1364. (2010).
- Chapdelaine, P., Tremblay, R.R. y Dubé, J.Y.,(1978) p-nitrophenol-alpha-D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen. *Clinical Chemistry*. 24 (2): 208–211. (1978).
- Chen, Y., Wang, M., Rosen, R.T y Ho, C.T. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Active Components from *Polygonum multiflorum* Thunb . *Journal of agricultural and food chemistry*. 47, pp.2226–2228. (1999).
- Choudhary, M.I., Shah, S.A.A., Rahman, A., Khan S.N., Khan, M.T.H. Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from fungal hydroxylation of tibolone and hydroxytibolones. *Steroids*. 75 (12): 956–66. (2010).

- Christodouleas, D., Fotakis, C., Papadopoulos, K., Yannakopoulou, E., Calokerinos, C. Development and validation of a chemiluminogenic method for the evaluation of antioxidant activity of hydrophilic and hydrophobic antioxidants. *Analytica chimica acta*. 652 (1–2): 295–302. (2009).
- Chung, Y.M., Wang, H.C., El-Shazly, M., Leu, Y.L., Cheng, M.C., Lee, C.L., Chang, F.R., Wu, Y.C. Antioxidant and tyrosinase inhibitory constituents from a desugared sugar cane extract, a byproduct of sugar production. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59 (17): 9219–25. (2011).
- Cuendet, M., Hostettmann, K. y Potterat, O. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*. 80: 1144–1152. (1997).
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (5): 1768–1774. (2009).
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S. M., Nabavi, S.F., Eslami, B., Rahmani, Z. Antioxidant and antihaemolytic activities of the leaves of *Keefe cumin* (*Laser trilobum* L) Umbelliferae. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (5): 441–449. (2010).
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. y Bekhradnia, A.R. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*. 7 (18): 3188–3192. (2008).
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. y Hafezi, S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology*. 32 (1): 43–49. (2008).
- Ebrahimzadeh, M. y Hosseinimehr, S. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sellowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*. 1: 7–14. (2008).
- Eli-Lilly. *Guidance for Assay Development & HTS Version 5 Section I: Introduction*. (2007).

- Esparza-Rivera, J.R., Stone, M.B., Stushnoff, C., Pilon-Smits, E., Kendall, P.A. Effects of ascorbic acid applied by two hydrocooling methods on physical and chemical properties of green leaf lettuce stored at 5 ° C. *Journal of Food Science*. 71 (3): 270–276. (2006).
- Fallarero, A., Hanski, L. y Vuorela, P. How to translate a bioassay into a screening assay for natural products: general considerations and implementation of antimicrobial screens. *Planta Medica*, 80 (14): 1182–1199. (2014).
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S.I., Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24 (7): 1043–1048. (2011).
- Fundibeq. Diagrama de pareto. pp.1–20.
http://www.fundibeq.org/opencms/export/sites/default/PWF/downloads/gallery/methodology/tools/diagrama_de_pareto.pdf. (Accesado 15 de octubre 2016).
- García Martín, M. y Zurita Molina, A. Transaminasas: Valoración y significación clínica. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP*. pp.267–275. (1998).
- Garza-Juárez, A.; Salazar-Cavazos, M.de L.; Salazar-Aranda, R.; Pérez-Meseguer, J.; Waksman de Torres, N. Correlation between the chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (damiana). *Planta Medica* 2011, 77, 958-63.
- Gerich, J.E.,(2003) Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Archives of Internal Medicine*. 163 (11): 1306–1316. (2003).
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y. y Ali, M. Antioxidant activity , phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakintan Journal of Pharmaceutial Science*. 22 (3); 277–281. (2009).
- Ghosh, N., Chaki, R., Pal, M., Mandal, S.C. Hepatoprotective activity of methanol extract of *Litsea glutinosa* against hepatotoxin induced toxicity. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 16 (2): 139–146. (2016).

- Gillard, B.K., Marksman, H.C. y Feig, S.A. Direct spectrophotometric determination of alpha-amylase activity in saliva, with p-nitrophenyl alpha-maltoside as substrate. *Clinical chemistry*. 23 (12): 2279–82. (1977).
- Granados-Guzmán, G. Waksman de Torres, N., Castro-Ríos, R., Salazar-Aranda, R. Ensayos de alto rendimiento utilizados en farmacognosia: Selección, optimización y validación de métodos de inhibición enzimática por espectrofotometría UV-visible. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2 (1): 1–13. (2014).
- Ha, K.S. Jo, S.H., Kang, B.H., Apostolidis, E., Lee, M. S., Jang, H.D., Kwon, Y.I. *In vitro* and *in vivo* antihyperglycemic effect of 2 Amadori rearrangement compounds, arginyl-fructose and arginyl-fructosyl-flucose. *Journal of Food Science*. 76 (8): H188–H193. (2011).
- Heo, S.J., Hwang, J.Y., Choi, J.I., Han, J.S., Kim, H.J., Jeon, Y.J. Diploretrohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*. 615 (1–3): 252–6. (2009).
- Hou, W. Li, Y., Zhang, Q., Wei, X., Peng, A., Chen, L., Wei, Y. Triterpene acids isolated from *Lagersotroemia speciosa* leaves as α -glucosidase inhibitors. *Phytotherapy Research*. 23 (5): 614–618. (2009).
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21 (8): 589–598. (2008).
- ICH,(2005) Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (November 1996).
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (the Gold Book). 2da. Edición. Editores: McNaught y A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications. (1997).
- Jelodar, G., Mohsen, M. y Shahram, S. Effect of walnut leaf, coriander and pomegranate on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan

- induced diabetic rats. *African Journal of Traditional. Complementary and Alternative Medicines*. 4 (3): 299–305. (2007).
- Jiang, H. Ji, B., Liang, J., Zhou, F., Yang, Z., Zhang, H. Comparison on the antioxidant capacity of selected fruits and vegetables and their separations. *Chemistry of Natural Compounds*. 42 (4): 333–335. (2006).
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M. y Steenkamp, P. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*. 119 (2): 684–688. (2010).
- Kang, W., Song, Y. y Gu, X. α -glucosidase inhibitory *in vitro* and antidiabetic activity *in vivo* of *Osmanthus fragrans*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6 (14): 2850–2856. (2012).
- Kang, W., Zhang, L. y Song, Y. Alpha-glucosidase inhibitors from *Luculia pinciana*. *China journal of Chinese materia medica*. 34 (4): 406–9. (2009)
- Kang, W.-Y., Song, Y.-L. y Zhang, L. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L. *Medicinal Chemistry Research*. 20 (7): 809–816. (2011).
- Kim, J., Kwon, C. y Son, K. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 64 (11): 2458–2461. (2000).
- Kim, S.I., Sim, K.H. y Choi, H.-Y. A comparative study of antioxidant activity in some Korean medicinal plant used as food materials. *Molecular & Cellular Toxicology*. 6 (3): 279–285. (2010).
- Kim, Y.M., Wang, M.H. y Rhee, H.I. A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate research*. 339 (3): 715–7. (2004).
- Kirby, A.J. y Schmidt, R.J. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs I. *Journal of ethnopharmacology*. 56: 103–108. (1997).
- Konigsberg Fainstein, M.,(2008) *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones Médicas*. Editorial Manual Moderno, 1a. ed., México. (2008).

- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Kim, Y.C., Shetty, K. Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: In vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Medicinal Food*. 10 (2): 266–275. (2007).
- Kwon, Y.I.I., Vatter, D.A. y Shetty, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 15 (1): 107–18. (2006)
- Lam, K.W. Tham, C.L., Liew, C.Y., Syahida, A., Abdul Rhaman, M.B., Israf, D.A. Lajis, N.H. Synthesis and evaluation of DPPH and anti-inflammatory activities of 2,6-bisbenzylidenecyclohexanone and pyrazoline derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 21 (3): 333–344. (2012).
- Larrauri, J.A., Sánchez-Moreno, C. y Saura-Calixto, F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *Journal of agricultural and food chemistry*. 46: 2694–2697. (1998).
- Lee, C.Y., Sharma, A., Cheong, J.E., Nelson, J.L. Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 19 (22): 6326–30. (2009).
- Lee, S.H., Park, M.H., Heo, S.J., Kang, S.M., Ko, S.C., Han, J.S., Jeon, Y.J. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits alpha-glucosidase and alpha-amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food and chemical toxicology*. 48 (10): 2633–7. (2010).
- Lee, S.S., Lin, H.C. y Chen, C.K. Acylated flavonol monorhamnosides, alpha-glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis*. *Phytochemistry*. 69 (12): 2347–53. (2008).
- Leu, S.J., Leu, S.J., Lin, Y.P., Lin, R.D., Wen, C.L., Cheng, K.T., Hsu, F.L., Lee, M.H. Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. formosana in the field of skin care. *Biological & pharmaceutical bulleti*. 29 (4): 740–745. (2006).
- Li, Y., Li, C., Xu, Q., Kang, W. (2011) Antioxidant, α -glucosidase inhibitory activities in vitro and alloxan-induced diabetic rats protective effect of

- Indigofera stachyodes* Lindl. root. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (14): 3321–3328. (2011).
- Lim, D.W., Kim, H., Park, J.Y., Kim, J.E., Moon, J.Y., Park, S.D., Park, W.H. *Amomum cardamomum* L. ethyl acetate fraction protects against carbon tetrachloride-induced liver injury via an antioxidant mechanism in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16 (1): 1–10. (2016).
- Linwei, D., Peibo, L., San, L.C.B., Wa, C.Y., Dingzhou, X., Kwok-Pui, F., Weiwei, S. Mechanistic studies on the antidiabetic activity of a polysaccharide-rich extract of *Radix Ophiopogonis*. *Phytotherapy research*. 26 (1):101–5. (2012).
- Lu, Y. y Yeap Foo, L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*. 68 (1): 81–85. (2000).
- Lutz, M.W., Menius, J.A., Choi, T.D., Laskody, R.G., Domanico, P.L., Goetz, A.S., Saussy, D.L. et al. Experimental design for high-throughput screening. *Drug Discovery Today*. 1 (7): 277–286. (1996).
- Macarrón, R. y Hertzberg, R.P. Design and implementation of high throughput screening assays. *Molecular biotechnology*. 47 (3): 270–85. (2011).
- Maksimović, Z. In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. *Industrial Crops and Products*. 28 (3): 356–360. (2008).
- Martínez Guerra, J.J. *Bioquímica*. 1a. Edición, Universidad Autónoma de Aguascalientes. (2002).
- Martis, E.A., Radhakrishnan, R. y Badve, R.R. High-Throughput Screening : The Hits and Leads of Drug Discovery- An Overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 1 (1): 2–10. (2011).
- Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of agricultural and food chemistry*. 47: 1749–1754. (1999).

- Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., Osajima, Y. In Vitro Surven of a-Glucosidase Inhibitory Food Components. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60 (12): 2019–2022. (1996).
- McCue, P.P. y Shetty, K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 13 (1): 101–106. (2004).
- Mercado, H.R. y Santoyo, S.M.,(2005) *Manual de Diseño Experimental Estadístico*, San Nicolas de los Garza, N.L., UANL-Facultad de Ciencias Biologicas. (2005).
- Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426–428. (1959).
- Moolla, A., Van Vuuren, S.F., Van Zyl, R.L., Viljoen, A.M. Biological activity and toxicity profile of 17 *Agathosma* (Rutaceae) species. *South African Journal of Botany*. 73 (4): 588–592. (2007).
- Ng, L.T., Ko, H.H. y Lu, T.M. Potential antioxidants and tyrosinase inhibitors from synthetic polyphenolic deoxybenzoins. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 17 (13): 4360–6. (2009).
- OMS. *A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements Part 2 : Validation VACCINE SUPPLY AND QUALITY*, Ginebra. (1997).
- IUPAC. IUPAC Gold Book. *Nomenclature for automated and mechanised analysis*. <http://goldbook.iupac.org/M03759.html> (1989).[Accesado el 19 de octubre de 2016].
- Pérez-Meseguer, J., Garza-Juárez, A., Salazar-Aranda, R., Salazar-Cavazos, M.L., de la Torre Rodríguez, Y.C., Rivas-Galindo, V., Waksman de Torres, N. Development and validation of an HPLC-DAD analytical procedure for quality control of damiana (*Turnera diffusa*), using an antioxidant marker isolated from the plant. *Journal of AOAC International*. 93 (4): 1161–8. (2010).
- Pietta, P.G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7): 1035–1042. (2000).

- Pistia-Brueggeman, G. y Hollingsworth, R.I. A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. *Tetrahedron*. 57 (42): 8773–8778. (2001).
- Ponou, B.K., Teponno, R.B., Ricciutelli, M., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Barboni, L., Tapondjou, L.A. Dimeric antioxidant and cytotoxic triterpenoid saponins from *Terminalia ivorensis* A. Chev. *Phytochemistry*. 71: 2108–15. (2010).
- Puangpronpitag, D., Areejitranusorn, P., Boonsiri, P., Suttajit, M., Yongvanit, P. Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg. seeds and marcs. *Journal of food science*. 73 (9): C648-53. (2008).
- Pulbutr, P. Nualkaew, S., Rattanakiat, S., Cushnie, B., Jaruchotikamol, A. Inhibitory actions of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. Leaf ethanolic extract and its phytochemicals against carbohydrate-digesting enzymes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6 (2): 93–99. (2016).
- Quispe, C., Viveros-Valdez, E. y Schmeda-Hirschmann, G. Phenolic constituents of the Chilean herbal tea *Fabiana imbricata* R. et P. *Plant foods for human nutrition*. 67 (3): 242–6. (2012).
- Ranilla, L.G. Kwon, Young I., Apostolidis, E., Shetty, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*. 101 (12): 4676–4689. (2010).
- Re, R. Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26 (9/10): 1231–1237. (1999).
- Ren, S., Xu, D., Pan, Z., Gao, Y., Jiang, Z., Gao, Q. Two flavanone compounds from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds, one previously unreported, and appraisal of their α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry*. 127 (4): 1760–1763. (2011).

- Rod R. Seeley, Stephens, T.D. y Tate, P.,(2003) *Anatomia & Fisiologia*. 6ta. Edición. Editorial Lusociência, McGraw-Hill. (2003).
- Roussis, I.G., Lambropoulos, I., Tzimas, P., Gkoulioti, A., Marinos, V., Tsoupeis, D., Boutaris, I. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21 (8): 614–621. (2008).
- Sabaté, L.G. y Tomás, X. Optimización secuencial en Química: Método Simplex. *Revista Boliviana de Química*. 14: 7–21. (1997).
- Sadek, E.S., Makris, D.P. y Kefalas, P. Polyphenolic composition and antioxidant characteristics of kumquat (*Fortunella margarita*) peel fractions. *Plant foods for human nutrition*. 64 (4): 297–302. (2009).
- Sang, S., Cheng, X., Stark, R.E., Rosen, R.T., Yang, C.S., Ho, C.T. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10 (7): 2233–2237. (2002).
- Satpathy, G., Tyagi, Y.K. y Gupta, R.K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. *Food Research International*. 44 (7): 2076–2087. (2011).
- Schroeder, K., Bremm, K .D., Alépée, N., Bessems, J.G.M., Blaauboer, B., Boehn, S.N., Burek, C., Coecke, S., Gombau, L., Hewitt, N.J., Heylings, J., Huwyler, J., Jaeger, M., Jagelavicius, M., Jarrett, N., Ketelslegers, H., Kocina, I., Koester, J., Kreysa, J., Note, R., Poth, A., Radtke, M., Rogiers, V., Scheel, J., Schulz, T., Steinkellner, H., Toeroek, M., Whelan, M., Winkler, P., Diembeck. Report from the EPAA workshop: in vitro ADME in safety testing used by EPAA industry sectors. *Toxicology in vitro*. 25 (3): 589–604. (2011).
- Shai, L.J., Masoko, P., Mokgotho, M.P., Magano, S.R., Mogale, A.M., Boaduo, N., Eloff, J.N. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African Journal of Botany*. 76 (3): 465–470. (2010).
- Siatka, T. y Kašparová, M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid

contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. *Molecules*. 15 (12): 9450–61. (2010).

Simirgiotis, M.J., Caligari, P.D.S. y Schmeda-Hirschmann, G. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 115 (2): 775–784. (2009).

Skoog, D.A., Crouch, S.R. y Holler, F.J. *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*. 5ta edición. Cengage Learning Latin America. (2008).

Snijman, P.W., Joubert, E., Ferreira, D., Li, X.C., Ding, Y., Green, I.R., Gelderblom, W.C. Antioxidant activity of the dihydrochalcones Aspalathin and Nothofagin and their corresponding flavones in relation to other Rooibos (*Aspalathus linearis*) Flavonoids, Epigallocatechin Gallate, and Trolox. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (15): 6678–84. (2009).

Stevenson, R.L. Bioassays 2011 | American Laboratory. <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/19109-Bioassays-2011/>. (2011). [Accesado el 27 de octubre de 2016].

Subramanian, R., Asmawi, M.Z. y Sadikun, A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta biochimica Polonica*. 55 (2): 391–8. (2008).

Szymański, P., Markowicz, M. y Mikiciuk-Olasik, E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *International journal of molecular sciences*. 13 (1): 427–52. (2012).

Tagashira, M. y Ohtake, Y. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta medica*. 64 (6): 555–558. (1998).

Tan, D., Hardeland, R., Manchester, L.C., Poeggeler, B., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Reiter, R.J. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *Journal of Pineal Research*. 34: 249–259. (2003).

Tapondjou, L., Nyaa, L.B.T., Tane, P., Ricciutelli, M., Quassinti, L., Bramucci, M.,

- Lupidi, G., Ponou, B.K., Barboni, L. Cytotoxic and antioxidant triterpene saponins from *Butyrospermum parkii* (Sapotaceae). *Carbohydrate research*. 346 (17): 2699–704. (2011).
- Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*. 99 (8): 3110–3115. (2008).
- Tiwari, O.P. y Tripathi, Y.B. Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn. *Food Chemistry*. 100 (3): 1170–1176. (2007).
- Tong, J., Yao, X., Zeng, H., Zhou, G., Chen, Y., Ma, B., Wang, Y. Hepatoprotective activity of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds in vitro and in vivo carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. 174: 355–363. (2015).
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Statti, G.A., Menichini, F. Inhibitory effects on the digestive enzyme alfa-amylase of three *Salsola* species (Chenopodiaceae) in vitro. *Pharmazie*. 62 (6): 473–475. (2007).
- USP. BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION. In *United States Pharmacopeia*. pp. 1–25. (2010).
- Vadivel, V., Nandety, A. y Biesalski, H.K. Antioxidant Potential and Health Relevant Functionality of Traditionally Processed *Cassia hirsuta* L. Seeds: An Indian Underutilized Food Legume. *Plant Foods for Human Nutrition*. 66 (3): 245–253. (2011).
- Vogel, H.G. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Springer. (2002).
- Wahid, A., Hamed, A.N., Eltahir, H.M., Abouzied, M.M. Hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Salix subserrata* against CCl₄-induced chronic hepatotoxicity in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16 (1): 263. (2016).

- Wang, Y., Huang, S., Shao, S., Qian, L., Xu, P. Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α -amylase in vitro. *Industrial Crops and Products*. 37 (1): 520–526. (2012).
- Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H., Ryoya, N. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61 (1): 177–178. (1997).
- White, R.E. High -Throughput Screening in Drug Metabolism and Pharmacokinetic Support of Drug Discovery. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40 (2): 133–57. (2000).
- Wu, C., Huang, M., Lin, Y., Ju, H., Ching, H. Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*. 104 (4): 1464–1471. (2007).
- Wu, T., Zhou, X., Deng, Y., Jing, Q., Li, M., Yuan, L. In vitro studies of *Gynura divaricata* (L.) DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Journal of ethnopharmacology*. 136 (2): 305–8. (2011).
- Yusoff, N., Ahmad, M., Al-Hindi, B., Widyawati, T., Yam, M., Mahmud, R., Razak, K., Asmawi, M. Aqueous extract of *Nypa fruticans* Wurmb. vinegar alleviates postprandial hyperglycemia in normoglycemic rats. *Nutrients*. 7 (8): 7012–7026. (2015).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Graciela Granados Guzmán

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

Tesis: OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE ENSAYOS *IN VITRO* A MICRO ESCALA INDICADORES DE ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA Y ANTIHIPERGLUCÉMICA EN EXTRACTOS DE PLANTAS

Campo de Estudio: Química Analítica, Bioensayos.

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 25 de Mayo de 1981, hija de Manuel Granados Vera y Graciela Guzmán Briones.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2003.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Orientación en Química Biomédica en 2008, reconocida como alumno distinguido del posgrado en 2007.

Experiencia Profesional: Profesor a nivel bachillerato de las asignaturas de Química general, Química II, Biología II, Nanotecnología y Biotecnología II en el Instituto de Innovación Académica y Liderazgo de Monterrey, A.C. del 2009 al 2010.

Personal profesional no docente en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL desde 2010, colaboradora en las materias de Análisis Instrumental y Análisis Instrumental Aplicado en pregrado. Responsable del laboratorio de Técnicas de Separación y colaborador en la impartición del curso de Métodos de Investigación Biomédica en posgrado.