



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
HIPOGLUCEMICA DE NANOMATRICES  $TiO_2$  CON  
EXTRACTO DE *Cecropia obtusifolia* EN RATAS  
DIABÉTICAS”

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. Q.F.B. REYES BRAVO RAMÓN ENRIQUE

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. JOSÉ ALBINO MORENO RODRIGUEZ.**

ASESORES DE TESIS:

**Dr. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA.**

**M.C. GENARO GUTIERREZ CARMONA.**

**Abril 2014**

## INDICE

## PÁGINA

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. Diabetes mellitus.....	8
2.2. Criterios para el diagnóstico de la DM2.....	10
2.3. Tratamiento para la DM.....	10
2.4. Modelos experimentales para el estudio de la DM.....	11
2.5. Las plantas medicinales como alternativa en el tratamiento en la DM.....	12
2.6. <i>Cecropia obtusifolia</i> (Coa): una planta con propiedades hipoglucemiantes.....	13
2.7. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de las hojas de Coa en modelos animales.....	14
2.8. Nanomatrices.....	16
2.8.1. Dióxido de titanio: componente de las nanomatrices.....	17
2.8.1.1. Métodos comunes para la preparación de óxidos.....	18
2.8.1.2. Método sol-gel.....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVO GENERAL.....	25
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
8. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
8.1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal.....	26
8.2. Extracto metanólico de <i>C. obtusifolia</i> .....	26
8.3. Síntesis de nanomatrices de TiO <sub>2</sub> -70.....	27
8.4. Síntesis de nanomatrices de Coa/TiO <sub>2</sub> -200.....	27
8.5. Técnicas de caracterización.....	28
8.5.1. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	29
8.5.2. Espectroscopia de difracción de rayos X (DRX).....	29
8.5.3. Espectroscopia de microscopia electrónica de barrido (SEM).....	30
8.5.4. Espectroscopia de energía dispersiva. (EDS).....	30
8.6. Evaluación de la actividad biológica de <i>c. obtusifolia</i> en ratas diabéticas inducidas con aloxano.....	31
8.6.1. Determinación de glucosa.....	31
8.6.2. Determinaciones de laboratorio.....	32
8.6.3. Análisis estadístico.....	32

9. RESULTADOS .....	34
9.1. Resultados y discusión de la caracterización de las nanomatrices. ....	34
9.1.2. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). ....	34
9.1.1. Espectroscopia de difracción de rayos X (DRX). ....	37
9.1.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM). ....	38
9.1.3. Espectroscopia de energía dispersiva. (EDS). ....	39
9.2. Resultado de la actividad biológica de las nanomatrices Coa/TiO <sub>2</sub> -200 en ratas diabéticas. ....	40
9.2.1. Discusión de la actividad biológica de las nanomatrices Coa/TiO <sub>2</sub> -200 en ratas con diabéticas inducidas con aloxano. ....	44
10. CONCLUSIONES .....	46
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
12. ANEXOS .....	53
12.1. Clasificación de los modelos experimentales para el estudio de la DM comúnmente usados... ..	53
12.1.1. Modelos espontáneos. ....	53
12.1.1.1. Modelos análogos. ....	53
12.1.1.2. Modelos intrínsecos. ....	54
12.1.1.3. El ratón <i>db/db</i> . ....	54
12.1.1.4. El ratón <i>ob/ob</i> . ....	54
12.1.1.5. El ratón <i>Agouti</i> . ....	55
12.1.1.6. La rata <i>zucker (fa/fa)</i> . ....	55
12.1.2. Modelos inducidos. ....	56
12.1.2.1. Inducción hormonal. ....	56
12.2. técnicas analíticas de caracterización. ....	56
12.2.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FTIR). ....	57
12.2.2. Difracción de rayos x. ....	58
12.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM). ....	59

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>	
<b>Número de figura.</b>	<b>Página.</b>
1. Mapa de modelos animales para experimentación en la DM2.	11
2. Compuestos químicos aislados de las hojas de Coa.	14
3. Estructuras cristalinas del dióxido de titanio	18
4. Métodos comunes para la preparación óxidos.	19
5. Resumen del proceso SOL-GEL.	23
6. Trituración de las hojas de <i>C. obtusifolia</i> .	26

7. Material utilizado en la síntesis de las nanomatrices.	27
8. Espectrofotómetro FTR.	29
9. Equipo de DRX.	29
10. Equipo de SEM.	30
11. Equipo de EDS.	30
12. Espectros de FTIR de las nanomatrices $TiO_2-70$ y $Coa/TiO_2-200$ .	34
13. Espectros de IR por separado de las nanomatrices de $TiO_2-70$ , $Coa/TiO_2-200$ y de las muestras de extracto de <i>Coa</i> .	36
14. Difractograma de las nanomatrices de $TiO_2-70$ y $Coa/TiO_2-200$ .	37
15. Micrografía de la nanomatriz de $TiO_2-70$	38
16. Micrografía de la nanomatriz de $Coa/TiO_2-200$	39
17. Efecto de la administración de las nanomatrices de $Coa/TiO_2-200$ sobre el curso-temporal de la concentración de glucosa en ratas con DM inducida mediante aloxano.	41
18. Efecto de la administración de las nanomatrices de $Coa/TiO_2-200$ sobre el incremento de peso en ratas con DM inducida mediante aloxano.	42
19. Efecto de la administración de las nanomatrices de $Coa/TiO_2-200$ sobre la concentración de glucosa y hemoglobina glicosilada en ratas administradas con aloxano.	43
20. Efecto de la administración de las nanomatrices de $Coa/TiO_2-200$ sobre la concentración de colesterol y triglicéridos en ratas administradas con aloxano.	44
21. Componentes de la "óptica" del SEM.	60
22. Descripción de los efectos básicos de los electrones al chocar con la materia.	61

<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b>	
<b>Número de tabla</b>	<b>Página</b>
1. Datos cristalográficos del $TiO_2$ .	18
2. SEM-DES de la nanomatriz $TiO_2$ .	40
3. SEM-DES de la nanomatriz $Coa/TiO_2-200$ .	40

**ÍNDICE DE ESQUEMAS.**

<b>Número de esquema</b>	<b>Página</b>
1. Proceso de síntesis de las nanomatrices de $\text{TiO}_2$ -70 y $\text{Coa/TiO}_2$ -200.	28
2. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de las nanomatrices de $\text{Coa/TiO}_2$ -200	33

## RESUMEN.

En la actualidad las enfermedades metabólicas son un problema de salud pública a nivel nacional e internacional. La diabetes mellitus (DM) se encuentra entre las primeras causas de muerte en México. El tratamiento de la DM va dirigido a mejorar la calidad de vida y la prevención de complicaciones agudas y crónicas. Los hipoglucemiantes orales son un conjunto de fármacos comúnmente usados en la terapia de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Abarcan una familia bien definida: sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas e inhibidores de la enzima alfa glucosidasa, sin embargo, su dosificación y efectos varían, lo que genera graves complicaciones a largo plazo.

El diseño de tecnologías de liberación controlada como son las nanomatrices, es cada vez más importante, ya que presentan ventajas sobre la dosificación, la disminución de efectos secundarios en la administración, tiempo de actividad prolongada, respecto a otras formas farmacéuticas. El presente trabajo se enfocó a la síntesis de nanomatrices de  $\text{TiO}_2$  con el extracto de *C. obtusifolia* (*Coa/TiO<sub>2</sub>-200*) por el método de sol-gel y realizar su caracterización mediante las técnicas analíticas de Infrarrojo (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de barrido (SEM-EDS), así como evaluar la actividad hipoglucemiante de estas, en un modelo de ratas diabéticas inducidas mediante aloxano. Resultados de dicha caracterización mostraron que las bandas de absorción en el FTIR del extracto *Cecropia obtusifolia* (*Coa*) respecto a las de la nanomatrix del extracto de *Coa* en la malla de  $\text{TiO}_2$  (*Coa/TiO<sub>2</sub>-200*) coinciden, indicando la presencia de *Coa* en *Coa/TiO<sub>2</sub>-200*. El estudio de DRX mostró que las nanomatrices *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* son amorfas, a su vez por el SEM se determinó que poseen un tamaño aproximado de 70nm. El incremento de 24.60% de carbono en las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200*, respecto a las nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ , registrado en la espectroscopia de energía dispersiva (EDS), permite suponer que el extracto *Coa* está presente en las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* sintetizadas. La actividad biológica de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* evaluada en ratas diabéticas mostraron una reducción de los niveles de glucosa de 29.6%, aunque no hubo una diferencia significativa en la reducción de los porcentajes hemoglobina glicosilada en los diferentes grupos de ratas diabéticas. Se comprobó una reducción de colesterol total y

triglicéridos en las ratas tratadas con las nanomatrices Coa/TiO<sub>2</sub>-200 de 65.3% y 58.45%. Se concluye que las nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 aportan evidencias de la recuperación metabólica que induce la administración aguda de las nanomatrices con Coa frente a la toxicidad pancreática causada por el aloxano. Se piensa que el empleo de un sistema de liberación controlada de Coa sea eficaz para restaurar el metabolismo de los carbohidratos y lípidos en un modelo de DM2.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La diabetes Mellitus (DM) se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia resultado de la alteración de la secreción de la insulina, la acción de la insulina, o ambas [1]. Varios procesos patogénicos están asociados en el desarrollo de la DM, desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, la deficiencia de insulina, hasta las anomalías que provocan una resistencia a la insulina. La base de las anomalías del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas en la DM es la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos diana. La deficiente acción de la insulina proviene de su secreción inadecuada y/o la disminución de la respuesta de los tejidos a la insulina. La hiperglucemia se manifiesta por poliuria, polidipsia, pérdida de peso, a veces polifagia y visión borrosa [1].

Según la organización mundial de la salud (OMS), en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes y se calcula que en el año 2004 fallecieron 3.4 millones de personas como consecuencia del exceso de glucosa en la sangre. Esta misma organización ha previsto que las muertes se multipliquen al doble para el 2030. A nivel nacional y mundial la DM representa un problema grave que avanza a un ritmo acelerado, además de generar complicaciones económicas y sociales debido a las subsecuentes patologías como la retinopatía, nefropatía, articulaciones de charcot y neuropatía autonómica causante de síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, además de disfunción sexual. Los pacientes con DM tienen mayor incidencia de aterosclerosis cardiovascular y enfermedad cerebrovascular. También se observa hipertensión y anormalidades del metabolismo de lipoproteínas [1].

Los fármacos tradicionales para tratamiento de la DM (y otras enfermedades) requieren nuevos métodos de obtención y reservorios eficientes, que ayuden al paciente diabético a tener un buen control en sus niveles de glucosa, de tal manera que mejore su calidad de vida. Por lo que, la medicina alternativa de origen natural ha intentado buscar solución a esta y otras enfermedades, eliminando las reacciones secundarias que producen los fármacos tradicionales. En este sentido, se puede destacar al árbol de *Cecropia obtusifolia* (Coa) utilizado como antidiabético en algunas regiones de México; sin embargo, no hay muchos estudios acerca de sus propiedades [2]. *C. obtusifolia* es un árbol perennifolio, mirmecófilo de 20 m a 25 m (hasta 35 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 50 cm se caracteriza por un rápido crecimiento en altura mayor a los 3 m y 2 cm de incremento diametral por año. Es originaria de América Central, actualmente se localiza desde México hasta el norte de Sudamérica. Habita en climas tropicales, cálidos, semicálidos y templados [3].

Por lo anterior, en el Laboratorio de Química General de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, se desarrollan y estudian nuevos nanoreservorios a base de  $\text{TiO}_2$  sintetizados mediante la técnica sol-gel, en donde se encapsule el componente activo del árbol *Cecropia obtusifolia* (popularmente, *Guarumbo*) y una vez sintetizados, aplicarlos en el tratamiento de la DM. La técnica de sol-gel fue descubierto por primera vez a finales de 1800, pero el interés por este método se remonta a mediados de la década de 1980 con la observación de que la hidrólisis del ortosilicato de tetraetilo (TEOS) en condiciones de acidez llevó a la formación de  $\text{SiO}_2$  en forma de fibras y monolitos [4]. Las nanomatrices obtenidas tienen aplicaciones potenciales en el área de catálisis, en registros y almacenamiento de datos, en memorias magnéticas y recientemente se ha determinado su potencial en aplicaciones médicas tales como en sistemas de liberación controlada de drogas, sensores magnéticos, en imagenología de resonancia magnética y en terapia contra el cáncer [4].

Debido a los grandes avances nanotecnológicos, se pueden diseñar y sintetizar nanomatrices o nanomoléculas biocompatibles con el organismo; gracias a las ventajas

del uso del método de sol-gel para obtener materiales homogéneos a nivel molecular, se pueden encapsular sustancias orgánicas e inorgánicas, en donde se consigue la liberación controlada de la droga en el sitio de acción [5]. Las matrices obtenidas por este método son químicamente inertes, hidrofílicas y de fácil síntesis, proporcionando viabilidad a las moléculas encapsuladas ya que estas matrices actúan como reservorios de agua ayudando así a mantener la actividad biológica de fármacos, son resistentes al ataque microbiano; por lo tanto, se pueden implantar “*in situ*” en el tratamiento de diferentes enfermedades [5].

Por lo antes mencionado, en este trabajo-tesis se plantea la generación de un método de síntesis, sencillo y práctico, que asegure la producción de nanomatrices de *C. obtusifolia* soportados en las matrices de óxido de titanio ( $Coa/TiO_2-200$ ), así como caracterizarlos y estudiar su efecto aplicados “*in situ*” en el tratamiento de la DM.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1. Diabetes mellitus.**

La DM es un grupo de enfermedades de tipo metabólico caracterizado por un estado de hiperglucemia crónico como consecuencia de defectos en la acción y/o secreción de insulina, además de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. El estado de hiperglucemia a largo plazo está asociado con disfunción y fallas de varios órganos, especialmente ojos, riñón, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La gran mayoría de los casos de D.M. se divide en 2 grandes grupos etiopatogénicos [1]:

### ***-La diabetes mellitus tipo1 (DM1).***

Aparece durante la infancia o la adolescencia, cuya causa es la deficiencia absoluta de secreción de insulina. Es un proceso predominantemente genético-hereditario, algunas veces puede ser de causa viral, otras se debe a un proceso autoinmune donde existe presencia de complemento, se han encontrado en estos pacientes auto-anticuerpos contra las células de los islotes, el auto-anticuerpo GAD (anti-glutamato descarboxilasa) (GAD 65) y el de la tirosina fosfatasa IA-2 y IA-2 $\beta$ .

Cabe mencionar que últimamente se ha subclasificado al tipo de diabetes insulino-dependiente donde no se encuentran estos auto-anticuerpos (DM1de origen idiopático), sin embargo los pacientes tienen aún mayor riesgo de sufrir cetoacidosis y signos alarmantes de diabetes.

### ***-La diabetes mellitus tipo 2 (DM2).***

Es la DM más frecuente, es causada por una combinación de resistencia a la insulina y una respuesta de secreción compensatoria de insulina inadecuada [1]. Las personas con este tipo de diabetes, generalmente tienen una deficiencia relativa (no absoluta) de insulina (al menos al comienzo), por lo cual puede haber un tratamiento diferente a la insulina para que puedan sobrevivir. Es probable que haya muchas causas de este tipo de diabetes, pero la etiología específica no se conoce, sin embargo, hay una fuerte asociación a factores hereditarios. No hay destrucción inmunológica de las células  $\beta$  y por lo tanto, tampoco, presentan auto-anticuerpos, en cambio puede existir una anomalía en los glucoreceptores de las células de Langerhans o alteración en los receptores a la insulina. Es mucho menos frecuente la cetoacidosis que la DM1, pero hay mayor riesgo de padecer complicaciones macro y microvasculares. La mayoría de estos pacientes son obesos y la obesidad por si misma causa cierto grado de resistencia a la insulina. Por otro lado, los pacientes que no son obesos pueden tener un mayor porcentaje de grasa abdominal. Se requiere llevar acabo tratamientos

farmacológicos para controlar la hiperglucemia y es necesario llevar una alimentación adecuada y un ejercicio físico constante.

## **2.2. Criterios para el diagnóstico de la DM2.**

Síntomas de DM y determinación ocasional de una concentración de glucosa en sangre igual o mayor a 200 mg/dl. (ocasional se define como cualquier hora o día sin tener en cuenta el tiempo transcurrido tras la última comida). Los síntomas clásicos de la diabetes son: poliuria (aumento en la frecuencia de orinar); polidipsia (mucho sed o boca seca) y pérdida de peso inexplicable.

Dos determinaciones, en distintas ocasiones, de glucosa en sangre en ayunas igual o mayor a 126 mg/dl. Glucosa en sangre a las 2 horas igual o mayor a 200 mg/dl durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral, la prueba debe realizarse tal como describe la Organización Mundial de la Salud con una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 gramos de glucosa anhidrida disuelta en agua. Esto significa que hay tres formas para hacer el diagnóstico de diabetes, cada una de ellas debe ser confirmada, un día después, por cualquiera de las tres formas. De esta manera se confirma o descarta el diagnóstico de DM2.

## **2.3. Tratamiento para la DM.**

Esta enfermedad crónico-degenerativa, se puede controlar, el tratamiento se basa principalmente en cuatro factores: ejercicio físico, dieta, fármacos y vigilancia constante de los niveles de glucemia del paciente. En todos ellos es importante la educación e información de la enfermedad. El tratamiento farmacológico para la DM2 tiene como objetivo principal disminuir la hiperglucemia, aunque el mecanismo a través del cual ejerce su acción varía dependiendo su naturaleza química. Estos se clasifican en insulina e hipoglucemiantes orales, [6] entre estos se encuentran:

- Sulfonilureas que estimulan al páncreas para la producción de insulina.
- Biguanidas que alteran la producción de glucosa en el hígado.
- Inhibidores de alfa-glucosidasa que retarda la absorción de glucosa en el intestino.
- Tiazolinedionas que producen una mayor sensibilidad a la insulina.

## 2.4. Modelos experimentales para el estudio de la DM.

Una de las maneras de estudiar los efectos de hiperglucemia, en los modelos animales, es la pancreatectomía parcial (DM2) o total (DM1), sin embargo, este método rara vez es usado en la actualidad [7]. Los modelos animales de DM2 pueden ser clasificados según su mecanismo de producción (figura 1) en modelos espontáneos e inducidos [Anexo 15.1] de la manera siguiente:

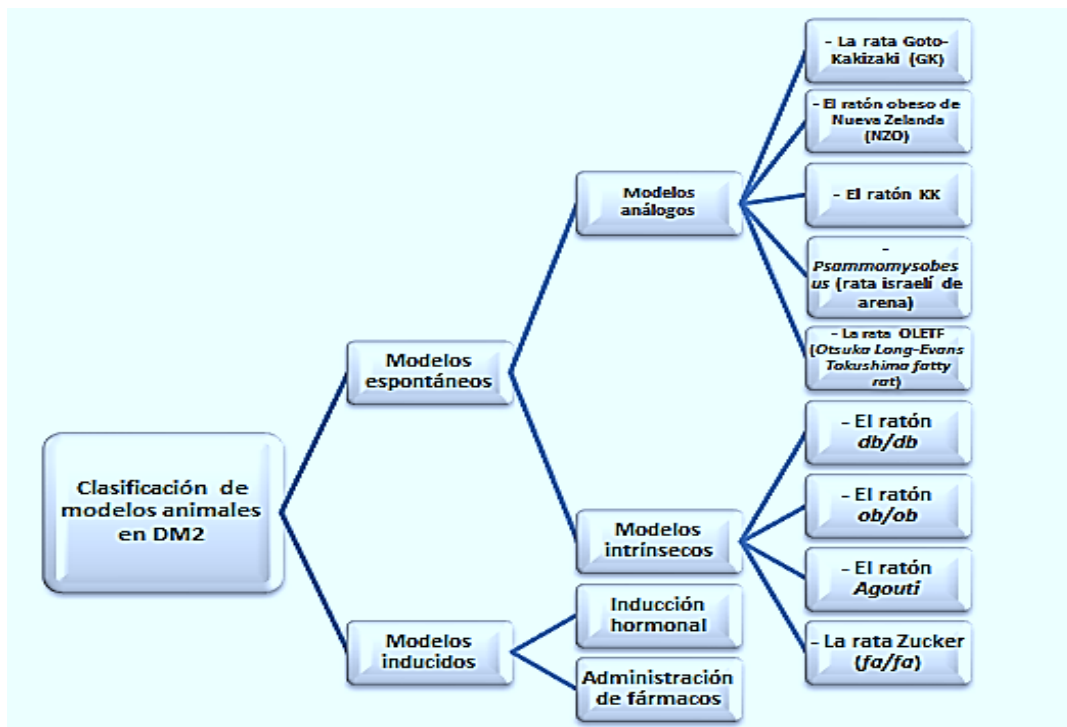


Figura 1. Mapa que muestra la clasificación de los modelos animales para experimentación en la DM2 y algunos ejemplos más estudiados [7].

Otro de los métodos empleados para el estudio de la hiperglucemia provocada por una lesión pancreática incluye la administración de toxinas como aloxano y estreptozotocina (STZ) [8]. El aloxano (derivado del ácido úrico) actúa destruyendo selectivamente los islotes  $\beta$ -pancreáticos, provocando así una deficiencia en insulina, hiperglucemia y otros síntomas propios de una diabetes incontrolada, como cetosis, neuropatía, cardiopatía o una marcada retinopatía. Es especialmente útil en el caso de la inducción de diabetes en conejos, dada la resistencia de esta especie a la STZ. El aloxano presenta el inconveniente de la variabilidad en la incidencia de diabetes (no proporcional a la dosis empleada) y en la mortalidad derivada de la elevada cetosis [8].

La STZ es un antibiótico derivado del *Streptomyces sachromogenes* cuyo poder como agente alquilante interfiere en el transporte de glucosa, en la función de la glucocinasa y en la inducción de la actividad poly-ADP-ribosa (una enzima que disminuye el contenido de NAD de las células  $\beta$ , lo que conlleva una falta de energía y la consiguiente muerte celular. Si se combinan la nicotinamida con la STZ provoca una moderada, pero estable, hiperglucemia sin cambios significativos en los niveles de insulina en plasma. La nicotinamida funcionaría en este modelo como un antioxidante que ejercería un efecto protector ante la citotoxicidad de la estreptozotocina [9].

Para probar los efectos *in vivo* de las nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 se requiere de modelos biológicos en la representación de hiperglucemia, son comunes los modelos murinos, ya que ofrecen mayor ventaja en manipulación, costo y fácilmente inducidos a la DM, si así se requiere.

## **2.5. Las plantas medicinales como alternativa en el tratamiento en la DM.**

Se ha descrito mayor incidencia de efectos secundarios y complicaciones, debido al uso crónico de los fármacos hipoglucemiantes, costos relativamente elevados, es por ello que se recurre a la medicina tradicional de origen natural, que utiliza plantas con propiedades medicinales para mejorar la salud. Se conocen aproximadamente 800

plantas empleadas en el control de la DM, de las cuales en México se encuentran aproximadamente de 150 a 259 [10]. El árbol de *Cecropia obtusifolia* (Coa) es ampliamente utilizado como antidiabético, sin embargo, faltan más estudios científicos acerca de sus efectos en el tratamiento de la DM.

## **2.6. *Cecropia obtusifolia* (Coa): una planta con propiedades hipoglucemiantes.**

*C. obtusifolia* es originaria de América Central, se distribuye desde México hasta el norte de Sudamérica. Habita en climas tropicales, cálidos, semicálidos y templados, desde el nivel del mar hasta los 1500 m. Crece en la vegetación secundaria, en la vegetación perturbada derivada de bosque y en las selvas tropicales caducifolias, subcaducifolias, subperennifolias o perennifolios y bosque mixto de encino-pino y bosque montañoso. La capacidad de esta especie para colonizar rápidamente aéreas desmontadas es ampliamente conocida y se debe fundamentalmente a sus poblaciones maduras que producen abundantes frutos que son buscados por numerosas especies de aves y mamíferos [3]. En nuestro país, esta planta tiene una amplia área de distribución: en la vertiente del Golfo se distribuye comenzando en San Luis Potosí hasta Quintana Roo y Yucatán. En la zona del pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas. También se encuentra en los estados de Puebla, Veracruz y Jalisco.

*C. obtusifolia* es un árbol (de 15 m hasta 35 m de altura) con pocas ramas, en algunas ocasiones presenta raíces adventicias en la base del tronco. El tronco es monopódico, cilíndrico, recto y hueco en el centro, donde está habitado por hormigas. La corteza externa es lisa, gris clara, con estípulas y lenticelas negras dispuestas en líneas longitudinales. La corteza interna es de color crema verdoso, fibrosa y contiene un exudado. La copa presenta la forma de una sombrilla estratificada. Las hojas se distribuyen en espiral aglomeradas hacia las puntas de las ramas, son lanceoladas durante las primeras etapas del desarrollo y posteriormente son simples, peltadas y profundamente palmadas divididas con 8 a 15 lóbulos profundos están cubiertas de pubescencia y presentan una inervación rojiza prominente. Al secarse la hoja adopta un

tono verde oscuro y escábrido en el haz, verde pálido o con más frecuencia blanco-grisácea en el envés, con nervaduras cubiertas por puberulencia dispersa.

Los pecíolos (25 a 90 cm de largo y de 10 a 15 mm de grueso) están longitudinalmente canaliculados y provistos de puberulencia diminuta (de 0.1 a 0.3 mm) de color gris-blanquecino [10]. La lobulación de las hojas coincide con la aparición de unas estructuras membranosas llamadas triquillos en la parte basal de cada pecíolo, se producen unos órganos multicelulares en forma de huevo (de 0.75 por 0.25 mm) de color blanco llamados cuerpos Mülllerianos que las hormigas remueven con fines alimenticios [10]. El uso medicinal más frecuente de *Coa* es como remedio antidiabético, se usa comúnmente una infusión de las hojas, ramas, corteza o raíz como agua de consumo diario. Cuando se utilizan las hojas de la planta, se recomienda hervir 3 ó 4 hojas en 2 L de agua [11], Sin embargo aún no es claro el mecanismo por el cual ejerce su efecto hipoglucemiante [12].

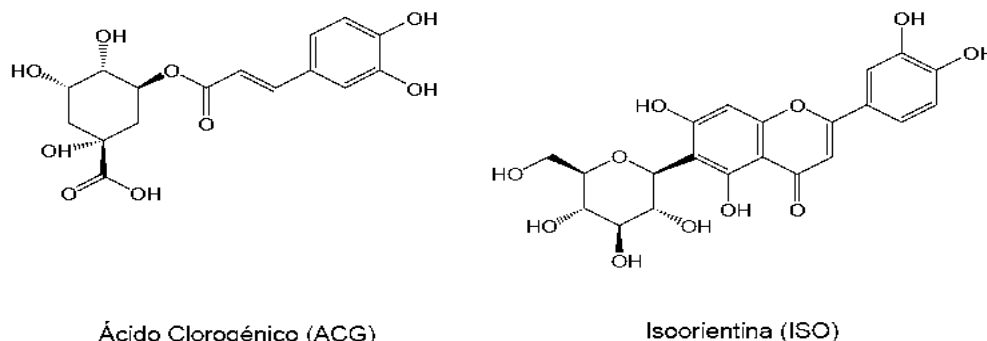


Figura 2. Compuestos químicos que han sido aislados de las hojas de *Coa*.

## 2.7. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de las hojas de *Coa* en modelos animales.

La actividad hipoglucemiante de *C. obtusifolia* ha sido evaluada utilizando diferentes modelos biológicos. La infusión de hojas secas (1g/10 ml), administrada por vía intravenosa en una dosis de 150  $\mu$ l/Kg en perros mongrel con pancreatectomía parcial y total produjo una disminución de los niveles de glucosa en sangre desde la

segunda hora después de su administración. La hipoglucemia no se acompañó por el incremento en los niveles plasmáticos de insulina, pero se produjo una disminución significativa en las cifras plasmáticas de triglicéridos. Los resultados permitieron asumir que el efecto hipoglucemiante no está asociado con una estimulación sobre las células  $\beta$ -pancreáticas [9]. En otros estudios, se reporta el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de las hojas de *C. obtusifolia* en ratones con hiperglucemia inducida con aloxano [14] y en conejos con hiperglucemia inducida por cargas dobles de glucosa [15]. En ratas tratadas con estreptozotocina, el trabajo de Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001) reportó también el efecto anti-hiperglucemiante producido por los extractos acuoso y butanólico, así como por el ácido clorogénico (AC) y la isoorientina (ISO) aislados de la planta.

Recientemente, se ha concluido que el extracto butanólico de las hojas de esta especie disminuye la hiperglucemia postprandial en las ratas estreptozotomizadas; este efecto fue asociado con la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas del intestino, impidiendo con ello el desdoblamiento de carbohidratos complejos y retardando la absorción de la glucosa [12].

Con respecto al AC, se han dirigido estudios metabólicos para establecer la correlación entre el consumo de café y la diabetes, demostrando que los polifenoles existentes y principalmente el AC que se encuentra en concentraciones elevadas en esta bebida, tienen gran capacidad antioxidante [16]. Asimismo, se ha postulado que el AC actúa protegiendo a las células beta del páncreas y además, disminuye la absorción intestinal de la glucosa aumentando los niveles del péptido semejante al glucagon-1 (GLP-1) y disminuyendo los del polipéptido insulínico dependiente (GIP), fenómenos que se traducen en disminución de la glucosa plasmática [17].

Se han llevado a cabo estudios en ratas Zucker (*fa/fa*) obesas, hiperlipidémicas y resistentes a insulina para evaluar el efecto del AC administrado por vía intravenosa y se demostró que el AC disminuye el pico postprandial de la glucosa sin producir una hipoglucemia sostenida. También, disminuyó significativamente los niveles séricos de

colesterol y de triglicéridos, así como los de triglicéridos hepáticos [18]. Se ha corroborado el efecto hipoglucemiante e hipolipemiante por la administración vía oral de ISO, durante 2 semanas a ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Los resultados confirman que este compuesto disminuye los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos a partir del quinto día de tratamiento. El efecto se presentó durante diez días después de suspender la administración del compuesto [19]. Además, el AC e ISO son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I, a angiotensina II (ECA), el vasoconstrictor más potente, lo que le confiere a *C. obtusifolia* propiedades antihipertensivas.

## **2.8. Nanomatrices.**

Las nanomatrices son materiales de longitud no mayor a 100 nm y surgen como un área de la nanotecnología prometedora en la producción de fármacos con la posibilidad de curar enfermedades en zonas específicas del cuerpo y a nivel celular o molecular. Se les atribuye efectos de liberación sostenida, debido a su elevada permeabilidad y tamaño de poro de unos 5 nm, además forman una red inorgánica con función de reservorio que es estable a los efectos metabólicos del organismo, retardando su degradación [20]. Las nanomatrices son biocompatibles, es decir, interactúan a nivel celular sin propiciar efectos adversos. El hecho de que las nanomatrices sean del mismo tamaño que las proteínas, hacen que estas sean viables para bioidentificar o etiquetar material biológico. Las ventajas más sobresalientes del empleo de las nanomatrices se resumen a continuación [21]:

- Liberación controlada.
- Los efectos no se ven mermados debido al efecto metabólico de primer paso.
- Duración de acción prolongada.
- Aumento del intervalo de tiempo de actividad, reducción de dosis y por tanto, de reacciones adversas.
- De gran interés en aquellos fármacos con una corta semivida de eliminación.

- Actúan de manera localizada en cualquier cavidad corporal debido al tamaño de partícula, polaridad, adherencia y estructura.
- Protegen al fármaco de variaciones de pH, concentración iónica, actividad enzimática o motilidad gastrointestinal.
- Son resistentes al ataque microbiano y exhiben biocompatibilidad con el organismo.

Sin embargo, a pesar de que las nanomatrices muestran numerosos beneficios a la tecnología farmacéutica y a otras tecnologías, también cuentan con algunas desventajas las cuales son:

- El fármaco debe ser relativamente soluble para liberarse por difusión de la nanomatriz.
- Si el fármaco es de baja potencia se debe aumentar la concentración de modo que las nanomatrices deben estar más cargadas de fármaco, y no soportan grandes cantidades de fármaco.
- Costo un tanto elevado respecto a otras formas farmacéuticas.

### **2.8.1. Dióxido de titanio: componente de las nanomatrices.**

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), presenta tres formas polimórficas naturales: rutilo, broquita y anatasa. De éstas, la fase rutilo es la más estable, mientras que las fases anatasa y broquita son meta-estables y presentan formas monotrópicas que se transforman a rutilo irreversiblemente por calentamiento y por otros factores de síntesis y tratamientos post-síntesis. Debido a que la fase anatasa es meta estable, la temperatura de transformación depende de restricciones cinéticas. Se ha reportado que la transición anatasa a rutilo ocurre entre  $400^\circ$  y  $1000^\circ\text{C}$ , dependiendo de la microestructura de los polvos de anatasa, del contenido de impurezas, área superficial, tamaño de partícula, etc. Para que la transformación de anatasa a rutilo tenga lugar es necesario que ocurra una ruptura de enlaces. Esta transformación se considera de tipo reconstructiva e involucra la coordinación segunda. Por lo tanto, la energía de

activación es elevada y consecuentemente, la transformación es lenta. Tal mecanismo involucra los fenómenos de nucleación y crecimiento.

Las tres estructuras cristalinas son birrefringentes, además de que presentan alto índice de refracción y valores de la constante dieléctrica grandes. Las estructuras de la anatasa y de rutilo son octaédricas, mientras que la broquita es ortorrómbica. Los ángulos de enlace O-Ti-O, son de 90°, 80.8° y 99.2° respectivamente (Figura 3).

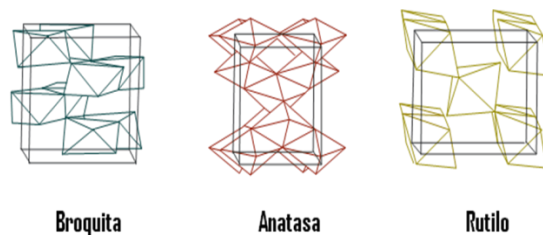


Figura 3. Estructuras cristalinas del dióxido de titanio.

Algunos datos cristalográficos de las estructuras cristalinas del TiO<sub>2</sub> se muestran a continuación en la Tabla 1.

Estructura Cristalina	Grupo espacial	Parámetros de red (Å)			D (Å)	ρ (g cm <sup>-3</sup> )
		A	B	C		
<b>Broquita</b>	D <sub>2h</sub> = Pbc <sub>a</sub>	9.15	5.44	5.14	1.84-2.03	3.9
<b>Anatasa</b>	C <sub>4h</sub> = C4/amc	5.36		9.53	1.91 (2) 1.95 (4)	
<b>Rutilo</b>	D <sub>4h</sub> = P4 <sub>2</sub> /mnm	4.59		2.959	1.944 (4) 1.910 )	

Tabla 1. Datos cristalográficos del TiO<sub>2</sub>. El número entre paréntesis se refiere al número de átomos de oxígeno equivalentes que rodean al átomo de titanio. D: es la distancia y ρ es la densidad.

### 2.8.1.1. Métodos comunes para la preparación de óxidos.

Los óxidos pueden ser preparados en forma de monocristales, policristales y sistemas amorfs. Para su síntesis, la experiencia ha mostrado que es necesario usar

bajas temperaturas para obtener áreas superficiales altas y un tamaño de partículas pequeño. Sin embargo, se puede utilizar métodos donde se utilizan altas temperaturas como en la preparación de aerogeles [20]. En el tratamiento a bajas temperaturas no siempre se llega a la formación de la fase termodinámicamente más estable. En cambio, dependiendo de los detalles del procedimiento de preparación se pueden obtener fases estables y/o muestras amorfas.

Un tratamiento a temperaturas bajas puede conducir, también, a la formación de óxidos con grupos hidróxilos, lo que se puede evitar mediante tratamientos a altas temperaturas [21].

Hay muchos métodos para transformar las soluciones de los precursores metálicos a los óxidos deseados. Los más comúnmente empleados para la preparación de óxidos son: precipitación, gelación y complejación. (Figura. 4).

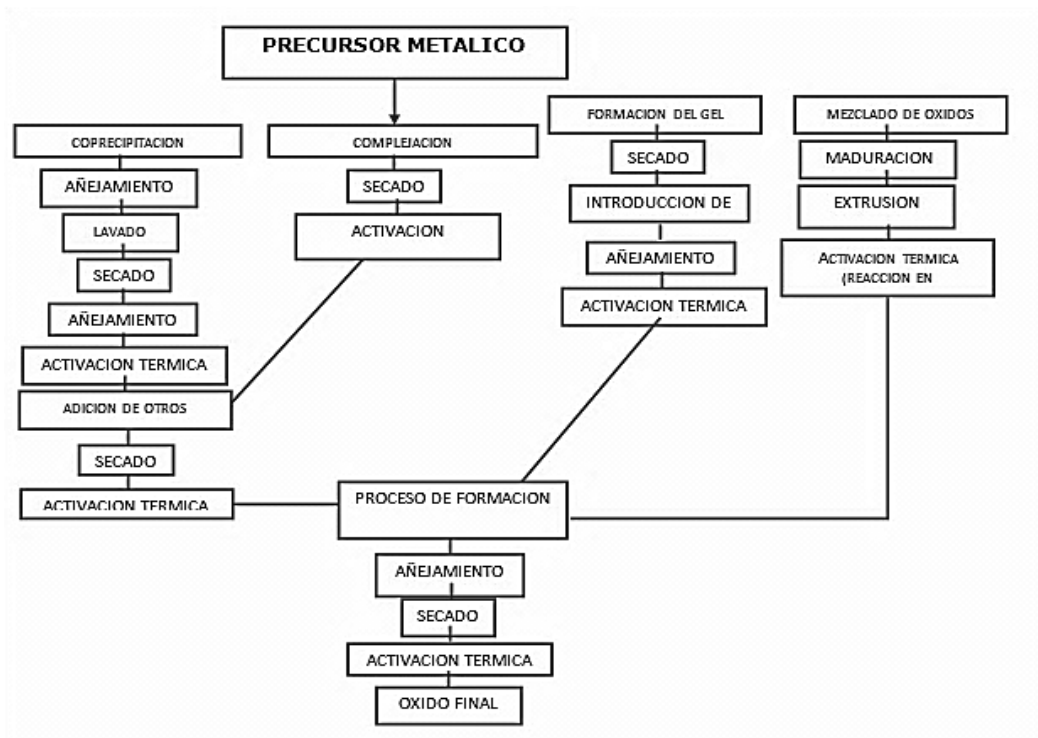


Figura 4. Métodos comunes para la preparación óxidos.

Un compuesto que contiene el ión metálico del óxido se separa primero de la solución, posteriormente el precipitado se lava y se seca. Finalmente se calcina y se reduce a la forma del óxido deseado. Algunas veces, se adicionan otros componentes durante el proceso. El óxido en esta etapa es un polvo, sin embargo, las diferentes técnicas para obtener un óxido pueden generar muestras de muy variadas propiedades superficiales [20]. Dependiendo del proceso de preparación del óxido puede variar la estructura cristalográfica, morfología, composición, volumen, tamaño de poro y la estructura superficial. Se ha determinado que la sedimentación, la floculación de las partículas coloidales, el procedimiento de secado, el proceso de añejamiento, el agente peptinizante y la naturaleza de cualquier aditivo son factores que afectan principalmente el tamaño de poro de las partículas, por ello es importante tener cuidado durante la síntesis de los óxidos.

#### **2.8.1.2. Método sol-gel.**

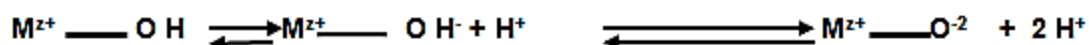
En la actualidad el método sol-gel ha emergido como una plataforma prometedora para la encapsulación de fármacos [20]. Consiste en la formación de redes sólidas compuestas por elementos inorgánicos, que se obtienen por medio de la reacción de hidrólisis que se inician a partir de una solución homogénea llamada sol, la cual involucra una solución coloidal [22]. En el sol, se forman micelas suspendidas en el líquido, las cuales van aumentando de tamaño en función del tiempo y en un sistema de agitación constante, hasta la formación del gel, este es un sistema polimérico que presenta una apariencia gelatinosa, cuando se seca a una temperatura de 70°C se forma un polvo que aún conserva algunas propiedades y características del gel; sin embargo, al tratar el producto a una temperatura superior a 300°C existe una contracción considerable de la red cristalina, estabilizando el gel. Cuando se dan tratamientos térmicos entre 800°C y 1000°C, el xerogel puede perder sus propiedades texturales (área, porosidad, tamaño de partícula, etc.) y se obtiene una cerámica.

Los precursores empleados en el proceso sol-gel son de dos tipos:

- Soluciones acuosas de sales inorgánicas.
- Alcóxidos metálicos

### ***-Soluciones acuosas de sales inorgánicas.***

Una de las formas más simples de preparar geles es a partir de las soluciones acuosas de sales inorgánicas. En tales soluciones, el catión  $M^{z+}$  es solvatado por las moléculas dipolares de agua y forma enlaces del tipo  $M-(OH)_z$  debido a la polaridad, se debilita en enlaces O-H dando lugar a las siguientes especies:



### ***-Alcóxidos metálicos.***

Los alcóxidos metálicos son compuestos formados por un metal (M) unido a un radical alquilo (R) a través de un átomo de oxígeno (M-O-R) y pueden ser considerados como derivados de los alcoholes puesto que al reaccionar estos con un metal, el protón del alcohol es sustituido por un átomo metálico.

Las propiedades físicas y químicas de los alcóxidos dependen de varios factores como:

- El carácter iónico del enlace M-O, debido a la diferencia de electronegatividades entre el átomo de oxígeno y el metal.
- El efecto electrónico del radical alquilo -R, el cual puede modificar la polaridad intrínseca del enlace M-O, a través de una donación o eliminación de densidad electrónica.
- La formación de oligómeros debido a la expansión de la esfera de coordinación del metal, la cual se lleva a cabo por un enlace intermolecular con átomos de alcóxidos vecinos.

En síntesis, el método de sol-gel es la ruta química que inicia con la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas o cúmulos en un líquido (llamada sol) y la hidrólisis, seguida de una condensación de este sol para formar un material sólido lleno de solvente (llamado gel). Posteriormente el solvente se extrae del gel simplemente dejándolo reposar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo, en el cual el gel se encogerá expulsando el solvente y agua residual. Al término del tiempo, por lo general aún se tienen solventes y agua en el material, además de que el tamaño del poro es considerable. Para solucionar esto, el material se somete a un tratamiento térmico, al final del cual obtendremos nuestro material en forma de monolito o de película delgada. La obtención de un “sol” o suspensión de partículas coloidales o macromoléculas poliméricas es de tamaño inferior a los 100 nm en un líquido [20]. Habitualmente el sol es obtenido por la vía polimérica, lo cual implica la hidrólisis y condensación de precursores metal-orgánicos.

El proceso sol-gel básicamente consiste en tres pasos [20] (figura 5):

1. Mezcla de soluciones de baja viscosidad, (para garantizar una homogeneidad a nivel molecular) de precursores compatibles, como derivados metálicos (orgánicos / inorgánicos), los cuales pueden finalmente producir los óxidos, estos precursores pueden ser los mismos soles de los óxidos metálicos.
2. Se lleva a cabo la formación de un sol uniforme, el cual se transforma en gel, a través del tiempo.
3. secado.

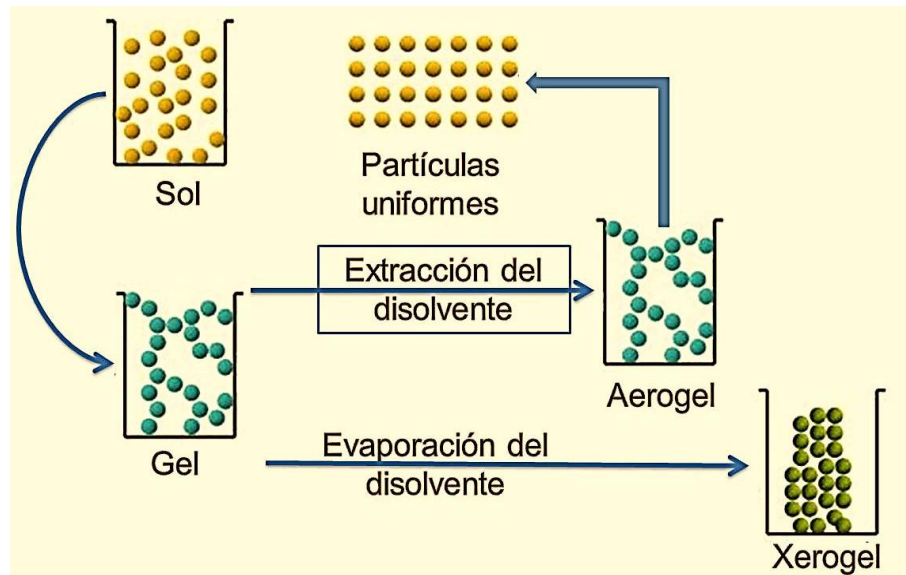


Figura 5. Resumen del proceso SOL-GEL.

Las ventajas más destacadas del método de sol-gel son:

- Una mayor homogeneidad y pureza de los materiales.
- Mejor control microestructural de las partículas.
- Mejor estabilidad térmica de los metales soportados
- Distribución de tamaño de poro bien definido.
- Facilidad en la adición de elementos en la red de los materiales.
- Un excelente grado de control en la hidroxilación del soporte.

En la actualidad el proceso de sol-gel ha resurgido como una plataforma prometedora para la inmovilización, estabilización y el encapsulamiento de moléculas biológicas tales como enzimas, anticuerpos, microorganismos y una gran variedad de fármacos. Las matrices obtenidas por este método son químicamente inertes, hidrofílicas y de fácil síntesis, además de que poseen alta resistencia mecánica, estabilidad térmica en amplios rangos de temperatura y absorben de modo insignificante solventes orgánicos en comparación con otros polímeros orgánicos. Una ventaja adicional es que proporciona viabilidad a las moléculas encapsuladas, ya que estas matrices actúan como reservorios de agua ayudando así a mantener la actividad

biológica de las enzimas, anticuerpos y células, y en el caso de fármacos el nivel de hidratación necesario para la molécula [20].

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La DM2 es una enfermedad que daña de manera crónica los órganos del paciente, mermando su salud física y emocional, puede ser mortal y constituye especial importancia no sólo por constituir ya el primer lugar de morbi-mortalidad, sino también por las dificultades que enfrenta el diabético para llevar a cabo su tratamiento y lograr el control metabólico y prevenir sus múltiples complicaciones. Los problemas detectados que provocan un mal control de glucosa sanguínea en diabéticos son: llevar un escaso control cuantitativo de la glucosa plasmática, los medicamentos muchas veces pueden ser inadecuados, el paciente tiene necesidad de aumentar la dosis (enfermedad crónica) o cambiar por otro fármaco, los estilos de vida son en su mayoría son muy malos, mal uso de los medicamentos y la falta de información.

En México, la DM es la primera causa de muerte desde el año 2000. Es el trastorno endocrino más frecuente, en la actualidad afecta de un 15 a 18% de la población adulta. Se estima que la prevalencia va en aumento mundialmente, afectando principalmente la calidad de vida de las personas que la padecen, aunado al gran costo económico en diversos tratamientos principalmente para contrarrestar las diversas enfermedades secundarias que provoca la DM2. Durante mucho tiempo han existido dudas sobre el control la hiperglucemia en la DM2, que causa muchas veces efectos secundarios, debido al uso frecuente de los fármacos tradicionales, y a que no es fácil controlar a los pacientes a largo plazo.

Se necesitan fármacos que contribuyan de manera sostenida al control glucémico. Se requiere de nuevos grupos terapéuticos naturales, eficientes y con menor riesgo secundario que aumenten las alternativas en el control de la DM2 por un periodo más prolongado de tiempo.

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

En nuestro país la DM ha alcanzado el umbral de primer padecimiento crónico y la primera causa de muerte [24]. Aunque se cuenta con gran número de fármacos para el tratamiento, se requiere de otro tipo que permita una serie de ventajas adicionales a los fármacos tradicionales. Se recurren a los remedios herbolarios como alternativa en el tratamiento de la diabetes y al uso de nanomatrices de liberación controlada que surgen como una posibilidad de disminuir en gran medida los efectos tóxicos y secundarios, debido al uso frecuente de los fármacos más comunes para tratar la DM. Nuestro país cuenta con una extensa gama de medicina tradicional herbolaria, puede destacar como remedio antidiabético *C. obtusifolia*. Sintetizar nanomatrices con extractos de esta especie podría ser de gran utilidad en el tratamiento de la DM.

#### **5. HIPÓTESIS.**

El extracto concentrado de *Coa* está presente en la malla de los nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ , causa un efecto hipoglucemiante en un modelo de ratas diabéticas inducido por aloxano.

#### **6. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto de *Coa* contenido en los nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ , en un modelo de ratas diabéticas.

#### **7. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- a) Sintetizar nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ -70 (nanomatrices de referencia) a partir de técnicas del método de sol-gel.

- b) Obtener nanomatrices Coa/TiO<sub>2</sub>-200 (nanomatrices de TiO<sub>2</sub> con 200µL de extracto de *C. obtusifolia*) bajo condiciones atmosféricas controladas de temperatura, por el método de sol-gel.
- c) Caracterizar las nanomatrices obtenidas por técnicas espectroscópicas de FTIR, Difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido (SEM).
- d) Evaluar el efecto hipoglucemiente del extracto en ratas diabéticas.

## 8. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 8.1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal.

Las ramas y hojas secas de *C. obtusifolia*, conocido comúnmente como Guarumbo, se obtuvieron en una tienda comercial de medicina herbolaria de la ciudad de Puebla (Noviembre, 2013). Para la identificación taxonómica de los árboles se llevaron a comparación con los datos taxonómicos descritos según los datos bibliográficos *conabio, 2013* y se constataron en el jardín botánico de la BUAP.

### 8.2. Extracto metanólico de *C. obtusifolia*.

Las hojas secas se trituran y maceran en metanol anhidro (99.8% Sigma Aldrich) (figura 6) en una relación de 1:10 (p/v), a temperatura ambiente por 24 horas, por triplicado. Los extractos de cada muestra se filtran. La solución se lleva a sequedad a presión reducida en un rotavapor. Al sólido obtenido se le determina el rendimiento teórico (dando 3.5 g). Se almacena a temperatura ambiente. La muestra se maceró en cloroformo (25 mg/ml), a temperatura ambiente por 24 horas. Después de filtrar, el residuo vegetal se extrajo con metanol (10 mg/ml) [23].



Figura 6. Trituración de las hojas de *C. obtusifolia*.

### 8.3. Síntesis de nanomatrices de TiO<sub>2</sub>-70.

De forma independiente, se prepara una solución homogénea con 100 ml de etanol, 6ml de agua destilada y 0.5 g de polivinil pirrolidona (PVP). Esta solución se adiciona a un reactor de vidrio (matraz) de tres vías, se coloca en una parrilla con manta de calentamiento integrada, del sistema de reflujo con agitación constante. Se incrementa la temperatura hasta 70°C, posteriormente se agrega gota a gota 21 ml de n-butóxido de titanio (97%) (Figura 7). La solución final con propiedades de gel, se sumergió en un recipiente de plástico que contiene agua fría a 3°C por 10 min.

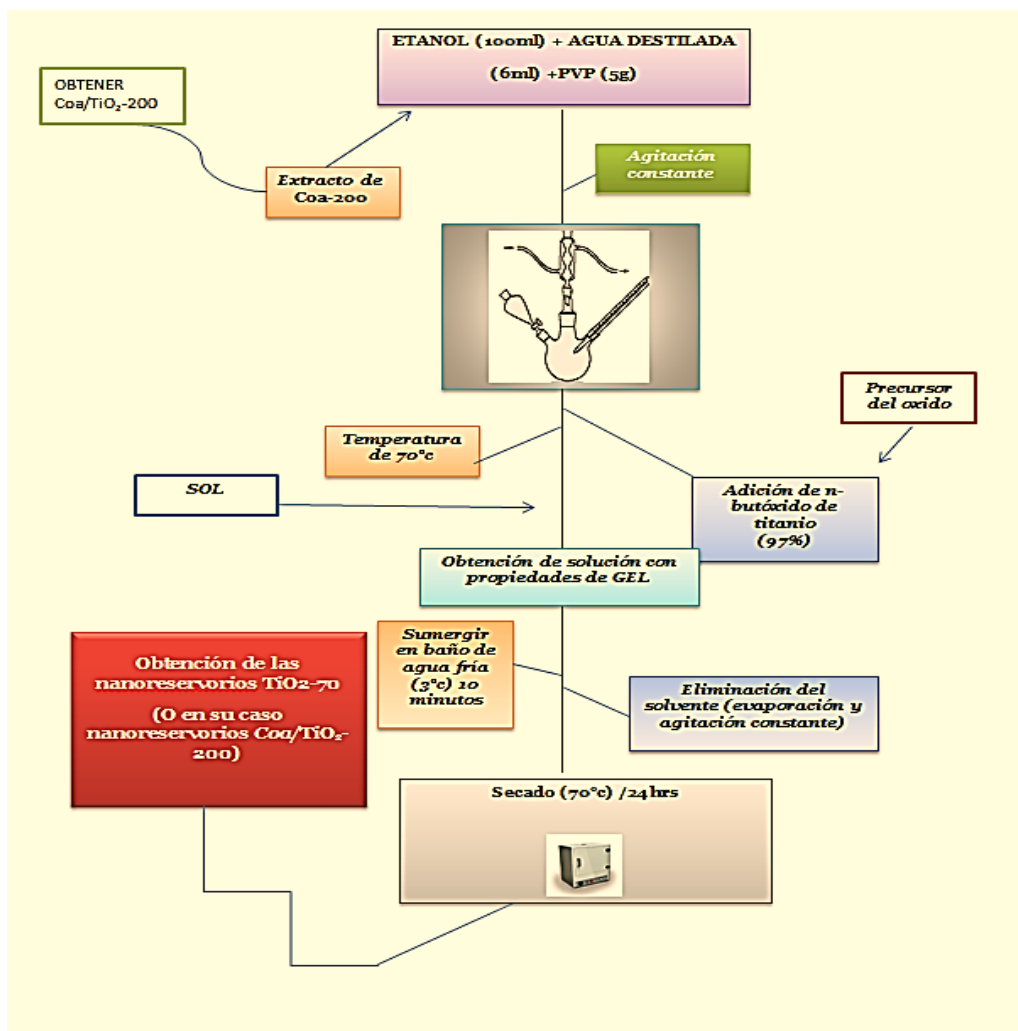


Figura 7. Material utilizado en la síntesis de los nanoreservorios obtenidos.

El solvente (agua y alcohol) se elimina por evaporación y agitación constante, el gel en polvo obtenido, se seca en estufa a 70°C por 24 horas. El nanoreservorio se rotula como TiO<sub>2</sub>-70.

### 8.4. Síntesis de nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200.

Se procedió de forma similar a la síntesis de las nanomatrices TiO<sub>2</sub> de referencia (TiO<sub>2</sub>-70). En esta ocasión se agregó un volumen del extracto metanólico de Coa de 200µl junto a la mezcla contenida dentro del reactor de vidrio de tres bocas. El esquema 1 nos representa el procedimiento de la síntesis de los nanoreservorios TiO<sub>2</sub>.



Esquema 1. Proceso de síntesis de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ -70 y  $\text{Coa/TiO}_2$ -200

## 8.5. Técnicas de caracterización.

La caracterización de las nanomatrices se realizó con la ayuda de las siguientes técnicas de instrumentación analítica (Anexo 15.2):

### 8.5.1. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia FTIR nos ayuda a la identificación de grupos funcionales presentes en las nanomatrices sintetizadas. El estudio se realizó en un espectrómetro de transformada de Fourier marca Digilab SCIMITAR Series. Se elaboraron pastillas

transparentes conteniendo la muestra a analizar y KBr como aglutinante, utilizando un número de barridos de 16 y una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  (Figura 8).



Figura 8. Espectrofotómetro FTR.

### 8.5.2. Espectroscopia de difracción de rayos X (DRX).

Esta técnica no destructiva se empleó para identificar las estructuras o fases cristalinas de las nanomatrices obtenidas. El espectrofotómetro utilizado es un equipo de Difracción de Rayos X (DRX) D8-Discover, Bruker con lector LynxEye, voltaje de 40 Kv, como se muestra en la figura 9. Previo al análisis las muestras fueron pulverizadas, empaquetadas y posteriormente analizadas a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ), con intervalo de  $2\theta$  localizado entre  $5^{\circ}$  a  $170^{\circ}$ , con un tiempo de incidencia de 1 segundo. Se empleó una radiación de Cu y Mo y longitud de onda de  $1.54\text{ \AA}$ .



Figura 9. Equipo de DRX

### 8.5.3. Espectroscopia de microscopia electrónica de barrido (SEM)

Con esta técnica es posible la observación morfológica de muestras orgánicas e inorgánicas, aunada al análisis cualitativo y cuantitativo de materiales. El equipo utilizado para el análisis microestructural fue un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM-6610LV. El voltaje de aceleración utilizado fue de 20 kV. Para

optimizar los resultados de este equipo se hace un recubrimiento de las muestras con un material conductor que sirve de soporte (tira de carbón). Posteriormente se recubrieron las muestras con una capa delgada de oro, con el fin de obtener superficies homogéneas, conductoras y facilitar la observación de estructuras y tamaño de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ -70 y  $\text{Coa/TiO}_2$ -200. Para el recubrimiento de las muestras se utilizó el equipo Denton Vacuum-Desk V. En este trabajo se utilizaron aumentos desde 25000 a 100 000 (figura 10).



Figura 10. Equipo de SEM

#### 8.5.4. Espectroscopia de energía dispersiva. (EDS)

Esta técnica utiliza el equipo JEOL JSM-6610LV, para la identificación de manera cuantitativa de los elementos presentes en las nanomatrices de estudio.



Figura 11. Equipo de EDS.

#### 8.6. Evaluación de la actividad biológica de *c. obtusifolia* en ratas diabéticas inducidas con aloxano.

Se utilizaran 20 ratas machos adultas de la cepa wistar provenientes del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con un peso aproximado de 150 a 180 g, de las cuales se formarán 5 grupos experimentales:

El grupo control, únicamente se le administrara 1g/kg de peso de buffer de citratos 0.1 M pH 4.5.

El grupo A, al cual se le administrara una dosis de 150g/kg de peso de aloxano en buffer de citratos pH 4.5 vía i.p y luego una dosis de 1g/kg vía oral de las nanomatrices TiO<sub>2</sub>-70.

El grupo B, se le administrara una dosis de 150mg/kg de peso de aloxano en buffer de citratos pH 4.5 vía i.p y seguido de una dosis de 1g/kg vía oral de las nanomatrices Coa/TiO<sub>2</sub>-200.

El grupo C, se le administrara una dosis de 150g/kg de peso de aloxano en buffer de citratos pH 4.5 vía i.p y seguido de una dosis de 1g/kg vía oral de acarbosa (fármaco inhibidor de la enzima alfa glucosidasa).

El grupo D, se le administrara una dosis de 150mg/kg de peso de aloxano en buffer de citratos pH 4.5 vía i.p y se les dejara expuesto el extracto acuoso de *C.obtusifolia* en los bebederos durante el día.

Se consideraran a los sujetos de los grupos A, B, C y D, que presentaron una glucemia entre 160-200 mg/dl. Se mantendrán en cajas separadas, con agua y alimento, con periodos de luz/oscuridad (12/12). Se registra el peso de los sujetos experimentales al comienzo de estudio, volviéndolos a pesar a los 3, 7, 10, 13 y 15 días con la finalidad de observar el desarrollo del cuadro de DM y observar el comportamiento de los sujetos con las nanomatrices.

#### **8.6.1. Determinación de glucosa.**

La determinación de glucosa sanguínea se realizará mediante el uso de un glucómetro digital de Roche, basándose en la reacción glucosa oxidasa, dicha reacción se presenta entre la glucosa sanguínea y la glucosa oxidasa. Las mediciones de concentraciones de glucosa sanguínea para los roedores se efectuaron 3 días después de la administración de aloxano, para corroborar la hiperglucemia, y en el plazo de 1,

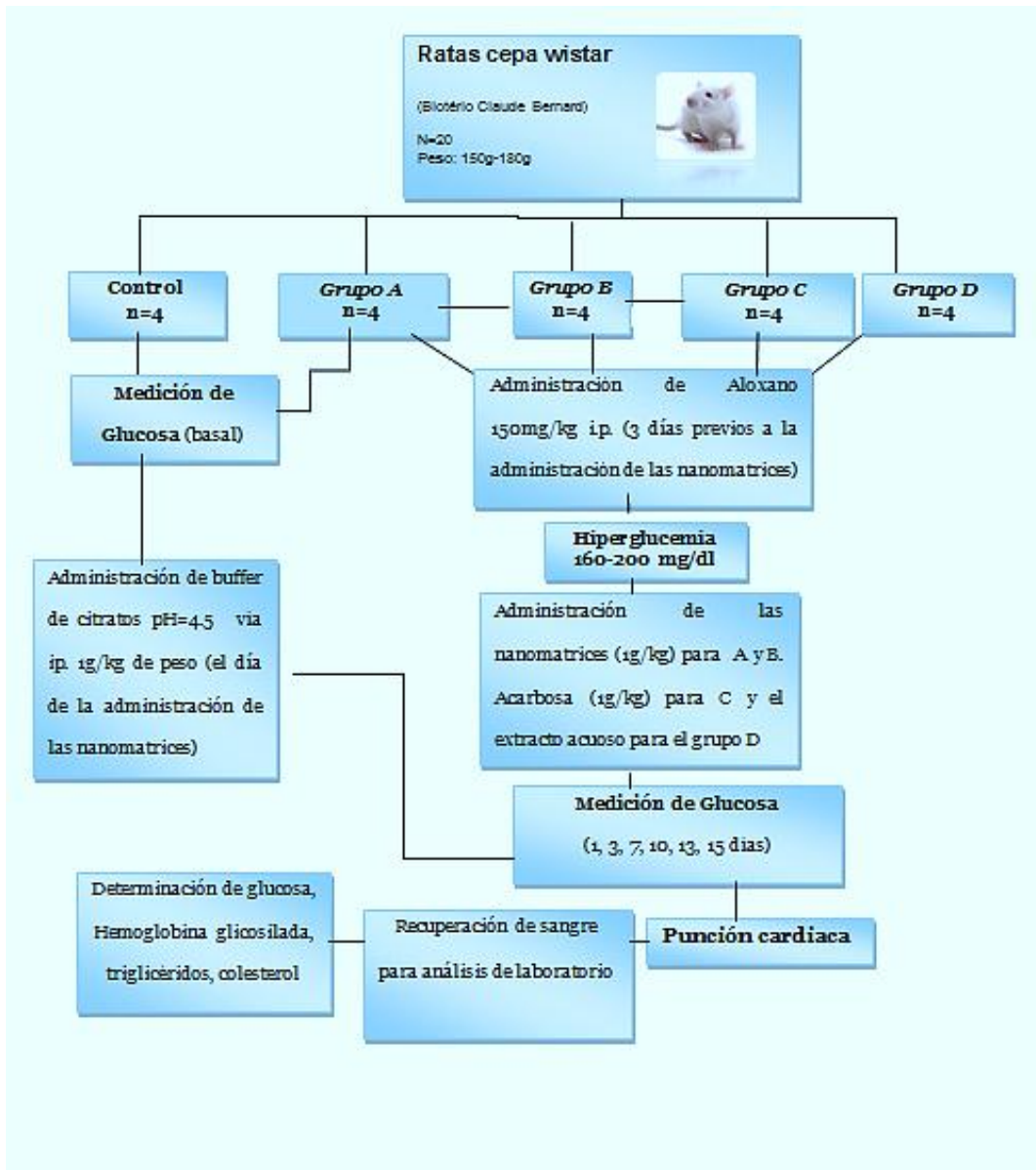
3, 7, 10, 13 y 15 días después de la administración vía oral de las nanomatrices TiO<sub>2</sub>-70 (1g/kg), Coa/TiO<sub>2</sub>-200 (1g/kg), el fármaco inhibidor de la enzima alfa glicosidasa (1g/kg), y el extracto acuoso, cuando éstos se encontraron en ayuno de 6 horas.

### **8.6.2. Determinaciones de laboratorio.**

Una vez culminado el estudio, en el día 15, dos horas posteriores a la última determinación de glucosa, se realizara la punción cardiaca a cada uno de los sujetos colocando cada muestra en tubos amarillos y lila para su posterior procesamiento y obtención de las siguientes pruebas: medición de glucosa, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, colesterol total.

### **8.6.3. Análisis estadístico.**

Con los datos obtenidos de las mediciones de glucosa a corto y largo plazo se elaboró una gráfica de cinética de glucosa en función del tiempo (días) aplicando el tratamiento estadístico de un análisis de varianza (ANOVA de una vía postes de Bonferroni), de igual forma se aplicó ésta herramienta estadística a los datos de control de peso de los sujetos y para las demás determinaciones para observar el comportamiento de los sujetos. Se consideraron significativas las diferencias cuando  $*p < 0.5$ . El esquema 2, nos representa el diagrama de trabajo realizado para la evaluación de la actividad hipoglucemiante de las nanomatrices Coa/TiO<sub>2</sub>-200 en ratas diabéticas inducidas por alloxano.



Esquema 2, Evaluación la actividad hipoglucemiante de las nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200.

## 9. RESULTADOS.

### 9.1. Resultados y discusión de la caracterización de las nanomatrices.

Los resultados de la caracterización física de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2$  sintetizadas, ( $\text{TiO}_2$ -70,  $\text{Coa/TiO}_2$ -200) se llevaron a cabo realizando la síntesis y comparándolas con el extracto obtenido por el método reportado según Nicasio y col., 2005, y así obtener una caracterización completa.

Teniendo lo siguiente:

#### 9.1.2. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

En la figura número 12, se muestran los espectros de IR con transformadas de Fourier de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2$ -70 y  $\text{Coa/TiO}_2$ -200; así como del extracto de *C. obtusifolia* obtenido mediante el método reportado en Nicasio y col., 2005.

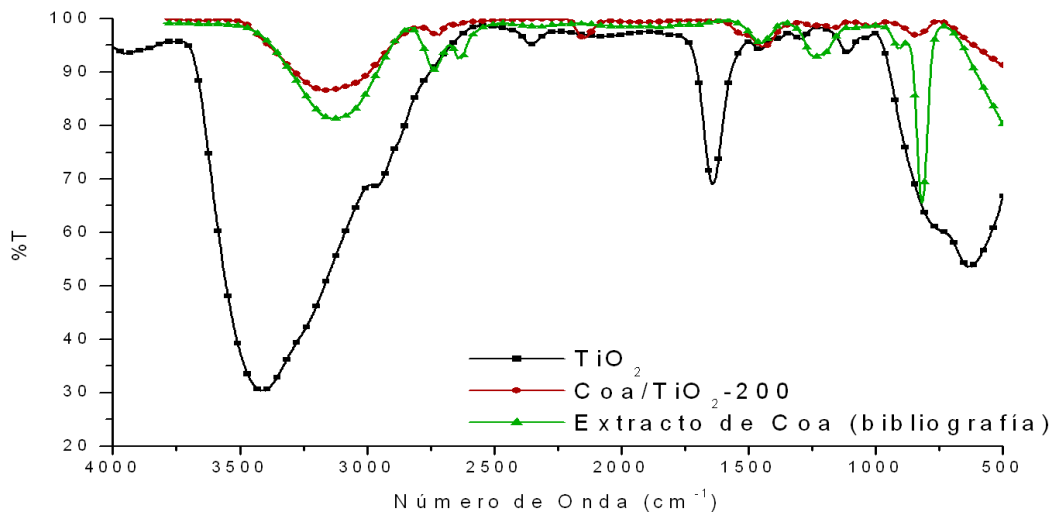


Figura. 12. Espectros de FTIR de las nanomatrices  $\text{TiO}_2$ -70 y  $\text{Coa/TiO}_2$ -200.

El espectro de FTIR del nanoreservorio de TiO<sub>2</sub>-70 (figura 12), muestra una banda de absorción ubicada en 3 953.7 cm<sup>-1</sup>, representa al modo de vibración molecular de los grupos hidróxidos terminales (ν<sub>O-H</sub>) [25], enlazados en las aristas de los átomos de Ti del soporte (TiO<sub>2</sub>). En 3 425.0 cm<sup>-1</sup> se observa una banda de absorción ancha, que identifica al modo de vibración tipo alargamiento de los grupos hidroxilos (ν<sub>O-H</sub>) asignados a los grupos hidroxilos (OH<sup>-</sup>) del agua (H-OH), solvente (butanol, R-OH) y a la hidroxilación del gel (Ti-OH). Estos grupos funcionales se encuentran en los poros del TiO<sub>2</sub> formados durante la primera etapa de gelación. Hacia 2 957.2 cm<sup>-1</sup>, se localizan los modos de vibración tipo alargamiento (ν<sub>C-H</sub>) de los grupos C-H metilos y metilenos presentes en el material TiO<sub>2</sub>. La banda de absorción característica del CO<sub>2</sub> se localiza en 2 356.0 cm<sup>-1</sup>. En 2 066.4 cm<sup>-1</sup>, se localiza el modo de vibración de deformación ν<sub>C-O</sub> del CO<sub>2</sub>. La banda de absorción en 1 637.9 cm<sup>-1</sup>, representa a los modos de vibración de tipo flexión (ν<sub>OH</sub>), de los grupos hidroxilos del agua presentes en la superficie de la nanomatriz TiO<sub>2</sub>, asociados principalmente a la humedad de la nanomatriz, al solvente y a la deformación δ<sub>HOH</sub> del agua coordinada [26]. A 1 456.6 cm<sup>-1</sup> se localizan las vibraciones de tipo alargamiento simétricas ν<sub>COO<sup>-</sup></sub> y deformación δ<sub>CH<sub>3</sub></sub> [25], de las impurezas presentes durante proceso de condensación del material y a los grupos etoxi (Ti-OEt) que no han alcanzado a reaccionar, así como a la oxidación de algunos grupos metoxilicos. En 1 295.6 cm<sup>-1</sup>, se ubican los modos de vibración del grupo etoxi (Ti-OEt) y además a la oxidación de algunos grupos metoxilicos, producto de impurezas presentes durante proceso de condensación. La banda localizada en 1 117.2 cm<sup>-1</sup> de absorción es asignada al modo de vibración tipo alargamiento de los grupos C-C (ν<sub>C-C</sub>), y C-O (ν<sub>C-O</sub>), de las especies metoxi puente [27], así como al solvente, productos y subproductos de la reacción de síntesis del material [28]. Hacia regiones de baja energía del espectro infrarrojo en 631.6 cm<sup>-1</sup>, se ubican los modos de vibración de tipo flexión (ν<sub>Ti-O</sub>) de las especies Ti-O [29-31]

El espectro de IR del extracto de Coa, presentado de la figura 13, presenta una banda de absorción ancha y pronunciada en 3365.2 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los modos de vibración de estiramiento de los grupos ν<sub>Csp-H</sub> aromático y los grupos hidroxilo (ν<sub>OH</sub>) correspondiente al agua y los OH unidos a los grupos C-H cíclicos. Los modos de

vibración de estiramiento  $\nu_{\text{Csp}^2\text{-H}}$  se ubican en  $2925.0\text{ cm}^{-1}$  y  $2840.1\text{ cm}^{-1}$ . En  $2342.9\text{ cm}^{-1}$  se presentan los modos de vibración atribuida a interacciones por puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno no coordinados de los grupos carboxilato. En  $2098.6\text{ cm}^{-1}$  se presenta el modo de vibración  $\nu_{\text{C=O}}$  que corresponde al grupo funcional C=O del  $\text{CO}_2$  atmosférico adsorbido en la superficie de la muestra.

A  $1727.1\text{ cm}^{-1}$ , se localiza el modo de vibración  $\nu_{\text{C=O-C}}$  de las lactonas. Los modos de vibración tipo flexión del grupo  $\text{OH}^-$  y el modo de vibración  $\nu_{\text{C-C}}$  coordinado se presentan en  $1637.9\text{ cm}^{-1}$ , así como el modo de deformación del grupo  $\text{OH}^-$  ( $\delta_{\text{OH}}$ ). En  $1451.1\text{ cm}^{-1}$  se ubica el modo de vibración asimétrico  $\nu_{\text{C-C}}$  del benceno. Hacia  $1367.4\text{ cm}^{-1}$ , se localiza la banda de absorción correspondiente al modo de vibración tipo flexión  $\delta_{\text{C-CO-C}}$ , de deformación del grupo  $\text{OH}^-$  ( $\delta_{\text{OH}}$ ) unidos al hidrocarburo cíclico y del agua.

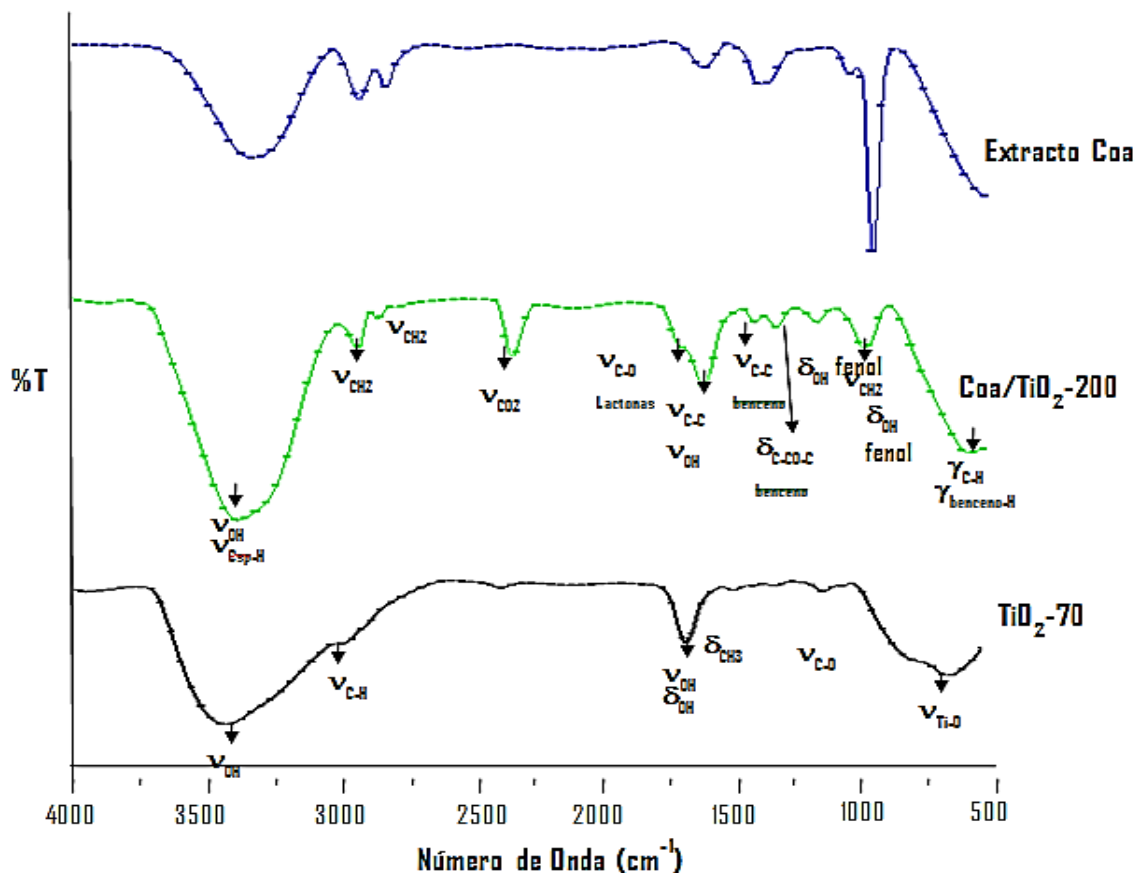


Figura 13. Espectros de IR por separado de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2\text{-70}$ ,  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$  e IR de las muestras de extracto de *Coa*.

En  $1038.2\text{ cm}^{-1}$  se ubican los modos de vibración molecular  $\nu_{\text{CH}_2}$  tipo asimétrico y el modo de deformación ( $\delta_{\text{OH}}$ ) de los grupos  $\text{OH}^-$ . Las bandas de vibración más importantes e informativas de los compuestos aromáticos, se ubican en  $656.5\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a los modos de vibración tipo deformación  $\nu_{\text{Benceno-H}}$  fuera del plano del anillo y los modos asimétricos de flexión ( $\gamma_{\text{C-H}}$ ) de los grupos C-H bencénicos.

Las bandas de absorción correspondiente al extracto de Coa, respecto al IR de las nanomatrices de  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$ , se observan que coinciden as bandas de absorción; es decir, se presentan los modos de vibración de tipo alargamiento y flexión.

### 9.1.1. Espectroscopia de difracción de rayos X (DRX).

En la figura 14 se presentan los difractogramas de Rayos X de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$ . Las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente en donde cada muestra se empaqueta en polvo en un contenedor de muestras de vidrio. La intensidad de la radiación se determinó por escaneo en pasos, en el intervalo de  $2\theta$  entre  $10^\circ$  y  $80^\circ$ . En el análisis se usaron los factores atómicos de dispersión para los átomos neutros de “International Tablesfor X-Ray Crystallography” [32]

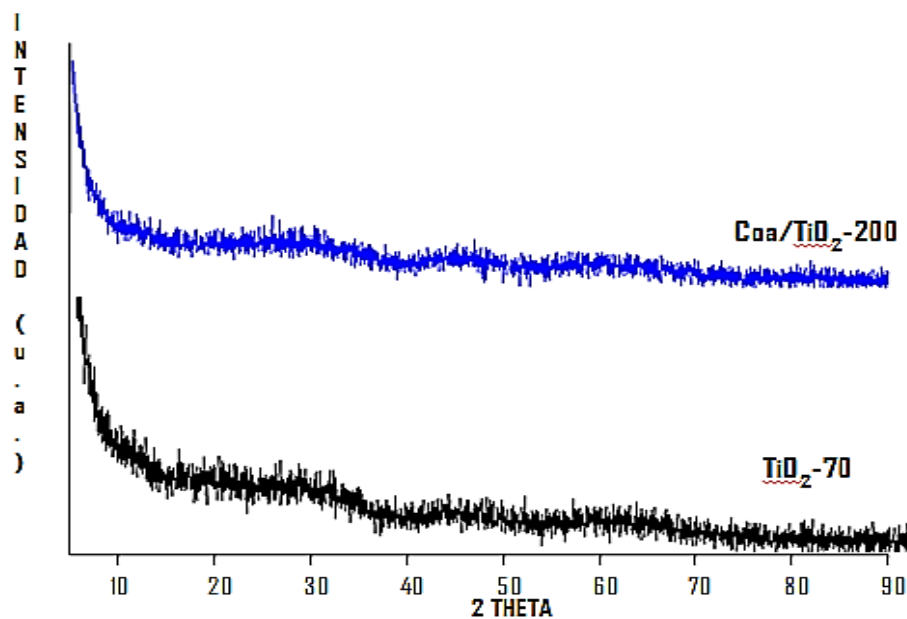


Figura 14. Difractograma de las nanomatrices de  $\text{TiO}_2\text{-70}$  y  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$ .

Ambos difractogramas son amorfos; sin embargo, se puede establecer que tienden ser cristalinas, por las curvas mínimas que se presentan en intervalo de “Theta igual a 20° y 35°.

### 9.1.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

El estudio textural de los nanomatrices de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$  se desarrolló con la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM). Éstas se muestran en las figuras 15 y 16, respectivamente.

En la figura 15, se presenta la micrografía de la nanomatrix de  $\text{TiO}_2\text{-70}$ , muestra una textura de aglomerados de partículas sin forma. El diámetro promedio de partícula es aproximadamente de 60nm. Sin embargo se observan partículas más pequeñas de aproximadamente 30 nm.

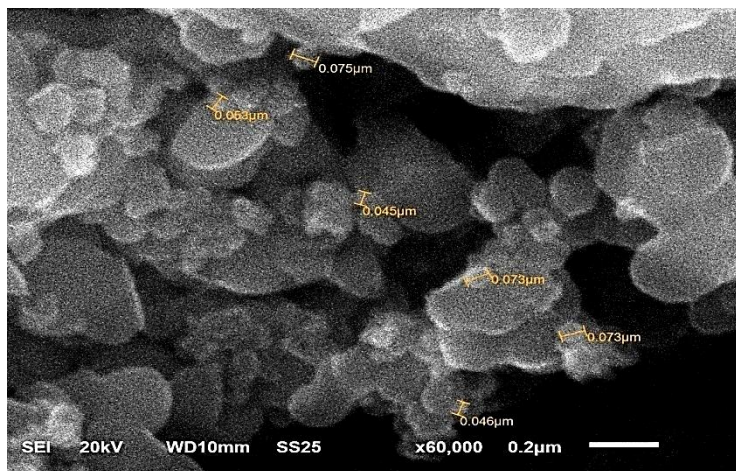


Figura 15. Micrografía de la nanomatrix de  $\text{TiO}_2\text{-70}$ .

En la micrografía de la nanomatrix de  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$ , se observan aglomerados de partículas amorfas, con diámetro promedio de partícula de 70 nm, figura 16. El dopaje del extracto de *Coa* en la malla del  $\text{TiO}_2$ , incrementa el tamaño de partícula de éstas nanomatrices. Como se puede demostrar en los estudios de DRX, en donde se presenta un ligero montículo de la nanomatrix de  $\text{Coa/TiO}_2\text{-200}$ , esto nos indica que el

material tiende a ser cristalino si se incrementa la concentración del extracto de Coa en la malla del  $\text{TiO}_2$ .

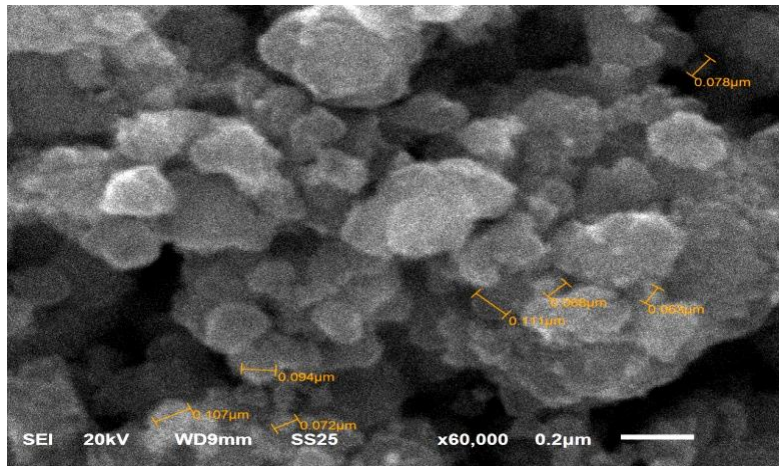


Figura 16. Micrografía de la nanomatriz de  $\text{Coa/TiO}_2$ -200

### 9.1.3. Espectroscopia de energía dispersiva. (EDS).

Los resultados por SEM-DES muestran de forma semicuantitativa el porcentaje de cada elemento (átomo) presente en las nanomatrices  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Coa/TiO}_2$ -200. La presencia de carbono en algunas de las muestras se debe a la preparación de las mismas para el estudio por SEM-DES, en donde se necesitó fijar cada muestra a una cinta de carbón.

La nanomatriz de  $\text{TiO}_2$ , presenta un 33.30% en masa de titanio respecto a un 18.89% en masa de oxígeno, proponiendo la fórmula mínima  $\text{TiO}_{4.3}$ . Esta fórmula respecto a la fórmula del  $\text{TiO}_2$  nos indica que en la nanomatriz de  $\text{TiO}_2$  tiene casi el doble de átomos de oxígeno. Se especula que el doble de oxígenos presentes en la fórmula empírica es porque la nanomatriz se encuentra hidratado:  $[\text{TiO}_2] \text{—OH}$ . Tabla número 2.

Elemento	Masa (%)	Átomos (%)
Carbono (C)	18.89	29.93
Titanio (Ti)	33.30	13.22
Oxígeno (O)	47.81	56.85
<b>Total</b>	100.00	

Tabla 2. SEM-DES de la nanomatriz TiO<sub>2</sub>

La nanomatriz de Coa/TiO<sub>2</sub>-200, presenta en su composición química los átomos de carbono, oxígeno y titanio. El aumento en el porcentaje de carbono en un 24.60%, nos puede indicar la presencia del extracto de Coa en la nanomatriz de TiO<sub>2</sub>. Por lo que se propone que el extracto de Coa se encuentra presente en la malla del TiO<sub>2</sub>, de acuerdo a los resultados presentados en la tabla 3.

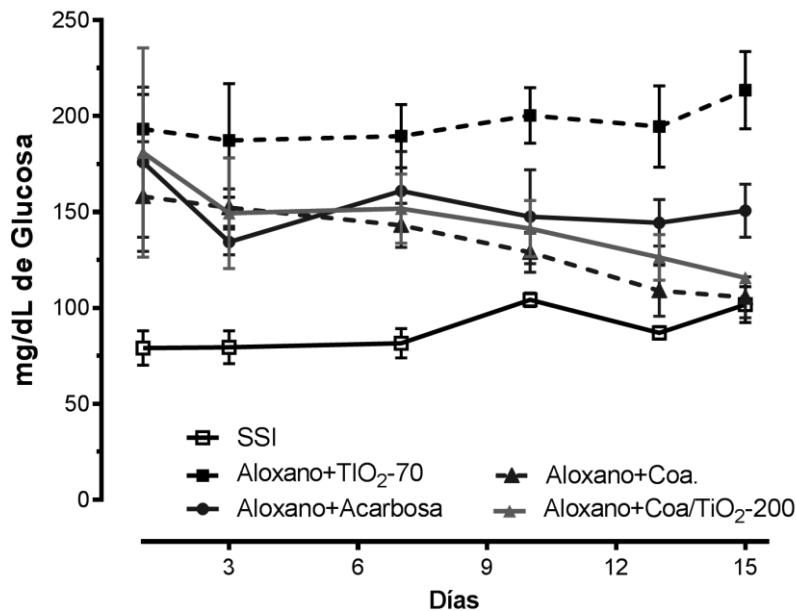
Elemento	Masa (%)	Átomos (%)
Carbono (C)	24.60	37.54
Titanio (Ti)	31.34	11.99
Oxígeno (O)	44.06	50.47
<b>Total</b>	100.00	

Tabla 3. SEM-DES de la nanomatriz Coa/TiO<sub>2</sub>-200

## 9.2. Resultado de la actividad biológica de las nanomatrices Coa/TiO<sub>2</sub>-200 en ratas diabéticas.

El efecto de las nanomatrices sobre los niveles de glucosa en ratas administradas con aloxano durante 15 días se evaluó en 1, 3, 7, 10, 13 y 15 días por medio de tiras reactivas y glucómetro digital marca Roche. Los resultados indican que los grupos A, B, C y D, incrementaron de forma significativa los niveles de glucosa, luego de la administración de aloxano con respecto al grupo control: 143.1%, 127.7%, 121.4% y 98.8%, respectivamente (la primera toma de muestra se realizó tres días posterior a la

administración de aloxano). Se muestra que los animales diabéticos tratados con las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* y el extracto acuoso, registraron una disminución significativa de los niveles de glucosa en el tercer día después de la administración de los tratamientos 53.1% y 51.1%, respecto al grupo A tratado únicamente con aloxano. Si se compara los niveles de glucosa de los animales tratados con *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* (grupo B), respecto a los animales administrados con el extracto de Coa durante el día (grupo D) los resultados muestran que, dichos niveles del grupo B se mantienen constantes. Por otro lado, en el día 15 los niveles glucémicos del grupo B alcanzan un 13.6% por arriba del control y 45.80% menos respecto al grupo A. La glucosa plasmática del grupo D alcanzó un 3.4% por arriba del control y 50.6% menos respecto al grupo A.

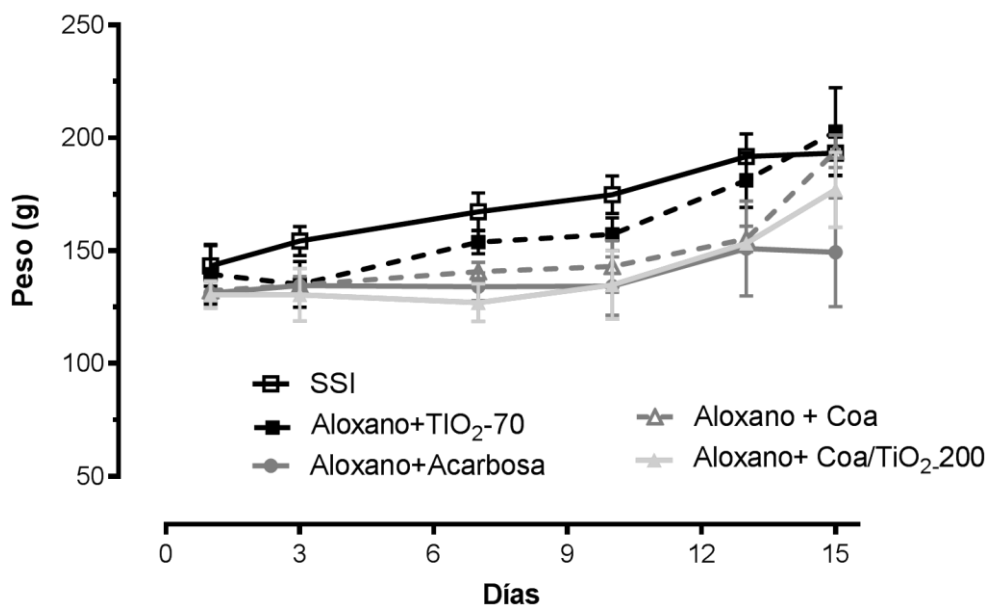


**Figura 17. Efecto de la administración de las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* sobre el curso-temporal de la concentración de glucosa en ratas con DM inducida mediante aloxano.** Las ratas fueron administradas con aloxano (150mg/kg) y posteriormente con las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* (1g/kg). Los datos graficados representan la media  $\pm$  ESM. (ANOVA de una vía, pos test Bonferroni, \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (control vs aloxano). #  $p < 0.05$ ; ###  $p < 0.001$  (aloxano vs *Coa/TiO<sub>2</sub>-200*)).

Se cuantificó el peso promedio de las ratas diabéticas y el control durante los días en que se desarrolló la prueba 1, 3, 7, 10, 13, y 15. Los resultados indican que las ratas diabéticas de los grupos A, B, C y D tienden a disminuir su peso progresivamente, respecto al grupo control. Para el día 10 el grupo que fue administrado con *Coa/TiO<sub>2</sub>-*

200, tiende a incrementar su peso, observándose 14.3% por debajo del peso del grupo control. El grupo tratado con el extracto de Coa, también mostro recuperación de peso, y para el día 10 tuvo 9% menos peso que el grupo control.

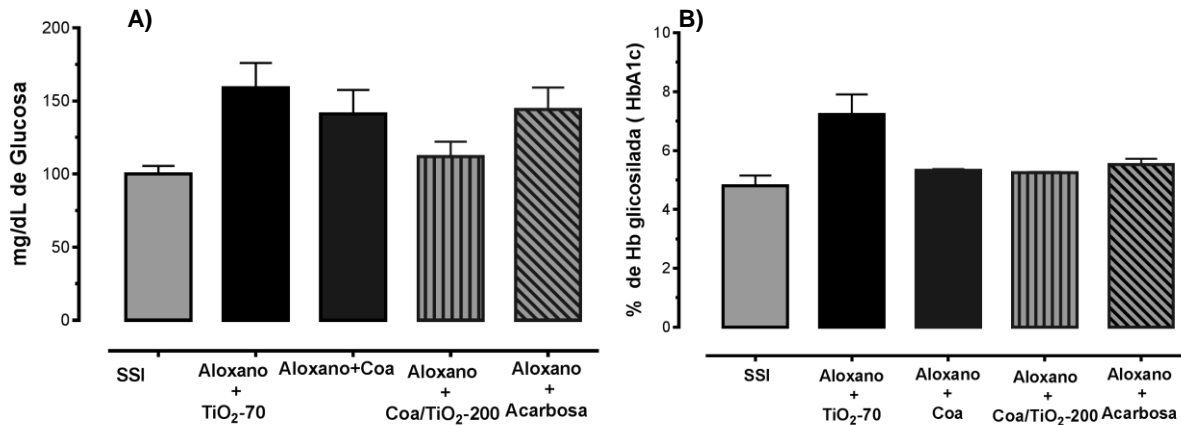
En el día 15, el peso del grupo D resultó similar al peso del grupo control (0.3 % más peso, respecto al grupo control). Por su parte, el grupo B para ese mismo día, pesó 8.4% menos, respecto al grupo control. En contraparte, los resultados muestran que el grupo C, tratado con el fármaco, no tiene ganancia de peso, y para el día 15 tiene 22.8% menos peso respecto al grupo control, manifestándose las consecuencias catabólicas de la DM2.



**Figura 18. Efecto de la administración de las nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 sobre el incremento de peso en ratas con DM inducida mediante aloxano.** Las ratas fueron administradas con aloxano (150mg /kg) y posteriormente con las nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 (1g/kg). Los datos graficados representan la media ± ESM. (ANOVA de una vía, pos test Bonferroni,). # p< 0.05; ### p< 0.001 (aloxano vs Coa/TiO<sub>2</sub>-200).

Finalizados los 15 días de tratamiento, se obtuvo una muestra de sangre de cada uno de los animales tratados para desarrollar los estudios de laboratorio con la finalidad de conocer los marcadores de glucosa y de lípidos. Los resultados indican que los niveles de glucosa del grupo tratado únicamente con aloxano muestran un incremento

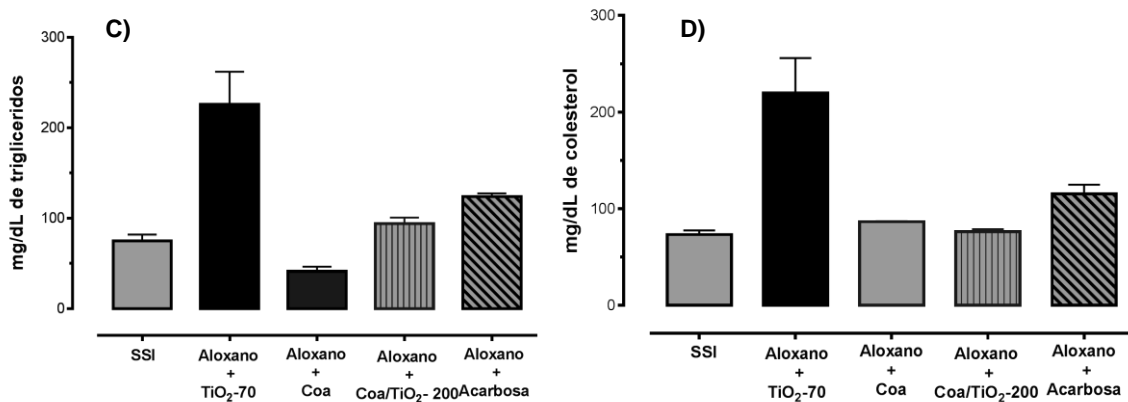
del 59% respecto al grupo control. Por otra parte, los animales únicamente tratados con el extracto y con las nanomatrices Coa/TiO<sub>2</sub>-200 muestran una disminución en los niveles de glucosa del 11.2% y 29.6% respecto al grupo únicamente administrado con aloxano. Por otra parte los animales tratados con acarbosa mostraron una disminución de glucosa, la cual no resulto significativa, respecto al grupo de aloxano, figura 19-A. Los resultados muestran que no existe diferencia de los niveles de hemoglobina glicosilada, figura 19-B, entre los grupos B, C y D (27.40%, 23.60%, y 26.35% comparados con el grupo A), sin embargo se observa tendencia a disminuir los niveles de glicación de esta proteína en el periodo que duro dicho tratamiento.



**Figura 19. Efecto de la administración de las nanomatrices de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 sobre la concentración de glucosa y hemoglobina glicosilada en ratas administradas con aloxano.** La cuantificación se realizó en plasma a los 15 días después de la administración de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 (1g/kg) en ratas tratadas con aloxano (150mg/ Kg). En la gráfica **A** se muestra concentración de glucosa (mg / dl) en plasma y en la gráfica **B** muestra el porcentaje de hemoglobina glicosilada. Los datos graficados representan la media  $\pm$  ESM. (ANOVA de una vía, post test Bonferroni, \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001 (control vs aloxano). ## p< 0.01; ### p< 0.001 (aloxano vs Coa/TiO<sub>2</sub>-200).

En la figura 20-C, se observa que el grupo tratado con el extracto de Coa, tuvo una concentración de triglicéridos significativamente más bajos, 81.76 %, en comparación al grupo administrado únicamente con aloxano. El grupo tratado con Coa/TiO<sub>2</sub>-200, mostro una disminución de triglicéridos de 58.48 %, respecto al grupo administrado con aloxano. Por su parte, el grupo tratado con acarbosa redujo los triglicéridos 45.22%, también respecto al grupo A. Se demuestra que el grupo administrado con el extracto acuoso, presento los niveles más bajos de triglicéridos, incluso más bajos que los niveles de triglicéridos del grupo control, 44.85 %.

Resultados del colesterol total, figura 20-D, indican que los animales tratados con *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* tuvieron los niveles de colesterol total más bajos, 65.3 %, con respecto al grupo A. El grupo D reduce los niveles de colesterol 60.62%, respecto al grupo A, observándose niveles muy similares a los niveles de colesterol del grupo B. En tanto, el grupo tratado con el fármaco mostro disminución de colesterol de 47.6% respecto al grupo A.



**Figura 20. Efecto de la administración de las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* sobre la concentración de colesterol y triglicéridos en ratas administradas con aloxano.** La cuantificación se realizó en plasma a los 15 días después de la administración de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* (1g/kg) en ratas tratadas con aloxano (150mg / Kg). En la gráfica **C** se muestra concentración de colesterol (mg / dl), en la gráfica **D** se muestra la concentración de triglicéridos (mg / dl). Los datos graficados representan la media  $\pm$  ESM. (ANOVA de una vía, post test Bonferroni, \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (control vs aloxano). ###  $p < 0.001$  (aloxano vs *Coa/TiO<sub>2</sub>-200*).

### 9.2.1. Discusión de la actividad biológica de las nanomatrices *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* en ratas con diabéticas inducidas con aloxano.

En este trabajo se evaluó la actividad de las nanomatrices de *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* sobre la glucemia y la lipemia en un modelo experimental de DM2 inducido con aloxano, agente tóxico que reproduce los cambios bioquímicos presentes en la DM. Dicha evaluación de estos parámetros, permite determinar el grado de daño metabólico que existe en los animales de experimentación. Los resultados indicaron que el tratamiento con *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* ocasionó efectos hipoglucemiantes y antihiperlipemiantes. Sin embargo, la hemoglobina glicosilada no disminuyó de manera significativa, lo cual se deba posiblemente al poco tiempo de exposición de esta

proteína a las concentraciones elevadas de glucosa plasmática, sin embargo se observa que existe una ligera tendencia negativa de su porcentaje.

Es bien sabido que la insulina, además de regular la utilización de la glucosa, tiene como función la regulación del metabolismo del tejido adiposo (almacenamiento, movilización y utilización de triglicéridos). Una de las alteraciones metabólicas observada en pacientes con DM2 es el metabolismo de los lípidos, lo cual se ve reflejado en aumento de la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre. En este sentido, la exposición crónica a concentraciones elevadas de ácidos grasos produce la pérdida de la sensibilidad a la glucosa mostrando un patrón de hipersecreción de insulina a bajas concentraciones del azúcar y una incapacidad de adaptar la respuesta secretora a incrementos en la glucemia.

Los reportes indican que el mecanismo de acción de *Coa* es similar a los inhibidores de alfa glucosidasa, debido a que retarda la absorción de glucosa intestinal, por la inhibición del desdoblamiento de carbohidratos complejos a moléculas de glucosa [12]. Cabe mencionar que se han descrito posibles efectos protectores del ácido clorogénico e isoorientina a las células  $\beta$  del islote del páncreas (antioxidantes y antiapoptóticos) debido a la gran cantidad de polifenoles contenidos en la planta.

En este sentido, es probable que el tratamiento que recibieron las ratas diabéticas con las nanomatrices *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* pudiera ejercer su efecto de disminución de triglicéridos mediante la potenciación de las acciones de insulina sobre el metabolismo de los lípidos (ya que la dosis de aloxano administrada a las ratas de 150mg/Kg creó una degeneración casi en la totalidad del páncreas, un cuadro de DM2 tardía) como son estímulo a la lipoproteinlipasa, inhibición de la actividad de la proteína de transferencia microsomal de triglicéridos (MTP) (implicada en la formación de proteínas ricas en triglicéridos) y regulación negativa de la apo CIII (inhibidor de la LPL) y a su vez promoviendo la utilización de los ácidos grasos por los adipocitos, con efecto final lipogénico, tal efecto se observa en el incremento de peso de los grupos tratados con *Coa/TiO<sub>2</sub>-200* y *Coa* hacia el día 13, además de mejorar las concentraciones de

glucosa, posiblemente debido al efecto protector de Coa a las células beta del islote, sumado a los efectos inhibidores de la absorción de glucosa intestinal, reportado [12].

Los resultados aportan las primeras evidencias de la recuperación metabólica que induce la administración aguda de las nanomatrices con Coa frente a la toxicidad pancreática causada por el aloxano. Por lo tanto se piensa que el empleo de un sistema de liberación controlada de Coa resulta eficaz para restaurar el metabolismo de los carbohidratos y lípidos en un modelo de DM2.

## 10. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvo el extracto de la *Cecropia obtusifolia* por el método descrito en Nicasio y col., 2005.
2. Se sintetizaron nanomatrices de TiO<sub>2</sub>-70 (referencia) y TiO<sub>2</sub> encapsulando 200 µL de extracto de *Cecropia obtusifolia* (Coa), por el método sol-gel.
3. Se identificaron los nodos de vibración de tipo alargamiento y flexión correspondientes a los grupos funcionales de la nanomatrix Coa/TiO<sub>2</sub>-200. Estos modos de vibración coinciden con los modos de vibración del extracto de *Cecropia obtusifolia* (Coa).
4. Respecto a los modos de vibración de la nanomatrix de TiO<sub>2</sub>, los modos de vibración de la nanomatrix Coa/TiO<sub>2</sub>-200 se desplazan hacia valores de menor energía del espectro, esto puede ser debido a la presencia del extracto de Coa en la malla del TiO<sub>2</sub>.
5. Ambos nanoreservorios (TiO<sub>2</sub>-70 y Coa/TiO<sub>2</sub>-200) son amorfos, porque no se trataron térmicamente a temperaturas mayores de 300°C, ya que se descompone el extracto de Coa.
6. Con la impureza presente en la nanomatrix del TiO<sub>2</sub>, aumenta el tamaño promedio de partícula. El TiO<sub>2</sub>-70 presenta un tamaño de partícula de 60 nm y la nanomatrix de Coa/TiO<sub>2</sub>-200 de 70 nm.

7. El extracto de Coa, se encuentra presente en la malla del TiO<sub>2</sub> de acuerdo al aumento en el porcentaje masa de carbono de 24.60%, como lo demuestra el estudio de DES.
8. Las nanomatrices de TiO<sub>2</sub> con Coa, reducen la hiperglucemia durante 15 días en un modelo de DM inducida (aloxano).
9. Las nanomatrices de TiO<sub>2</sub> con Coa, previenen la pérdida de peso que induce el aloxano durante 15 días.
10. Las nanomatrices de TiO<sub>2</sub> con Coa restablecen el metabolismo afectado de la glucosa en plasma, desde el tercer día después de su administración en un modelo experimental de aloxano en ratas.
11. Las nanomatrices de TiO<sub>2</sub> con Coa regulan los niveles de colesterol y de triglicéridos los cuales son afectados por el aloxano en plasma de ratas diabéticas.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Pappopetti M. (2012). Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus (I). Webpage: [www.siegfried.com.mx/.../diagnostico%20y%20clasificacin%20de%20la%20...](http://www.siegfried.com.mx/.../diagnostico%20y%20clasificacin%20de%20la%20...) (acceso: mayo, 2012).
2. Hernández Galicia E. Aguilar Contreras A., Aguilar Santamaría L., Román Ramos R., Chávez Miranda A.A. Garcia Vega L.M, Flores Saenz J.L y Alarcón Aguilar F.J. (2002). Studies on Hypoglucemic Activity of Mexican Medicinal plants. Proc. West. Pharmacol. Soc. 45: 118-124.
3. Conabio., *Cecropia obtusifolia*. Publicado en: *Novi Commentarii Academiae Scientiarum Instituti Bononiensis* 4: 439. 1840 web page: ([www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/.../49-morac3m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/.../49-morac3m.pdf)) (acceso: Noviembre 2013).

4. Neuberger T., Schopf B. Hofmann H. Von Rechembergr B., *Super paramagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. J. Magn. and Magn. Mater.* 293 483.) Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V., 23, 4, 29 - 35 (2008).
5. Flores J., Ruiz J., Serna L. Soto L. (2012). Protegiendo fármacos con nanomateriales inteligentes. (vol.5).Web page: [www.mundonano.unam.mx](http://www.mundonano.unam.mx) (acceso, noviembre 2013).
6. Alpizar M. *Guía para el manejo integral del paciente diabético.* (2001) Editorial manual moderno pag. 150-179.
7. Arias-Díaz J y Balibrea J. *Modelos de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2.* Departamento de Cirugía. Hospital Clínico San Carlos. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. *España. NutrHosp.* 2007; 22 (2):160-68.
8. Battell M, Yuen VG, Verma S, McNeil JH. *Other models of type 1 diabetes.* In: McNeil JH, editor. *Experimental models of diabetes.* Florida: CRC Press LLC; 1999. p. 219-29.
9. Chua SC; Jr.; Chung WK; Wu-Peng XS; Zhang Y; Liu SM; Tartaglia L y cols. *Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor.* *Science* 1996; 271 (5251): 994-6.
10. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Web page: [http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia\\_obtusifolia.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia_obtusifolia.htm) (acceso: Noviembre 2014).
11. Martínez M. *Las Plantas Medicinales de México.* Botas 5° ed., México, DF; 1969; 151-153.

12. Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R,  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008; 116: 27-32.
13. Mellado V, Lozoya-Meckes M. Effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* on the blood sugar of normal and pancreatic tomized dogs. *International Journal of Crude Drug Research*, 1984; 22: 11-16
14. Pérez RM, Ocegueda A, Muñoz JL, Avila JG, Morrow WW. A study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 1984; 12: 253-262
15. Román-Ramos R, Flores-Saenz JL, Partida-Hernández G, Lara-Lemus A, Alarcón-Aguilar F. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica (México)*, 1991; 22: 87-93
16. Alarcón-Aguilar FJ, Román-Ramos R, Flores-Saenz JL, (1998). *Study of anti-hyperglucemic effect of plants used as antidiabetics*. *J. Ethnopharmacol.* 61: 100-108.
17. Jhonston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003; 78: 728-733.
18. Rodríguez de Sotillo DV, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver Concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002; 13: 717-726.

19. Sezik E, Aslan M, Yesilada E, Ito S. Hypoglycaemic activity of *Gentiana oliverian* disolation of the active constituent through bioassay- directed fractionation techniques. *Life Sciences*, 2005; 76: 1223-1238
20. Méndez I; Moreno RJ y López GT. “Síntesis y caracterización de nanoreservorios de Estevia/SiO<sub>2</sub> en el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2”. Tesis Maestría., Departamento de Química General, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, México, octubre 2009.
21. Serpone, N. Pelizzetti, E ed. Photocatalysis Fundamentals and Applications, Wiley-Interscience: New York, 1989.
22. Tsolov-Ivanov. P (2004). *Design, fabrication and characterization of thick-film gas sensors. Universitat Rovira I Virgili*. Departament d'enginyeria electrònica, elèctrica i automàtica
23. Nicasio P, Aguilar-Santamaría L, Aranda E, Ortiz S, González M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia species*. *Phytotherapy Research*, 2005; 19: 661-664.
24. Organización Mundial de la Salud. Web page: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html> (acceso: octubre de 2013).
25. Ebbing and D. Darrell, Química General. México. McGraw-Hill. Quinta edición (2009).
26. Gracia, F., Holgado, J. P., Caballero, A., Gonzalez-Elipe, A. R., *J. Phys. Chem. B.*, 108 (45) 17466-17476 (2004).

27. R. T. Yang, J. P. Chen, E. S. Kikkinides, and L. S. Cheng, J. E. Cichanowicz, *Ind. Eng. Chem. Res.* 31, 1440-1445 (1992).
28. Otsuka, K, Yamanaka, I. *Catal. Today*, 2000, 57 71 (2000).
29. Rodriguez, J., Gómez, M., Lindquist, S. –E., Granqvist, C. G. *Thin Solid Films*, 360 250 (2000).
30. Ohno, T., Sarukawa, M. *J. Phys. Chem. B*, 105, 2417-2420 (2001).
31. Subramanian, V. Wolf, E. E., K. Amat, P. V. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4943-4950 (2004).
32. International Centre for Diffraction Data, PCPDFWIN v. 1.30, 2004.
33. Lash JM, Sherman WM and Hamlin RL. *Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats.* *Diabetes* 1989; 38 (7): 854-60.
34. Chen H; Charlat O; Tartaglia LA; Woolf EA; Weng X; Ellis SJy cols. *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice.* *Cell* 1996; 84 (3): 491-5.
35. S Hastrom, C. Nordling and K. Z. Siegbahn, *Phys.*, 178, 433 (1964).
36. Lenzen S., Panten U. *Alloxan: history and mechanism of action.* *Diabetología.* 1988; 31: 337-342.
37. Chua SC; Jr.; Chung WK; Wu-Peng XS; Zhang Y; Liu SM; Tartaglia L y cols. *Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor.* *Science* 1996; 271 (5251): 994-6.

38. Miltenberger RJ; Mynatt RL; Wilkinson JE and Woychik RP. *The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome*. J Nutr 1997; 127 (9): 1902S-1907S.
39. Muller S and Cleary MP. *Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages*. Proc Soc Exp Biol Med 1988; 187 (4): 398-407.
40. Masiello P; Broca C, Gross R; Roye M; Manteghetti M; Hillaire-Buys D; *et al*. *Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide*. Diabetes. 1998; 47(2):224-9.
41. Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 2001; 8 (1): 47-52.
42. Stojanovska L, Rosella G, Proietto J. *Evolution of dexamethasone-induced insuline resistance in rats*. Am J Physiol 1990; 258 (5 Pt 1): E748-56.
43. Veroni MC, Proietto J and Larkins RG. *Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice*. Diabetes 1991; 40 (11): 1480-7.
44. Douglas A, Skoog, Stanley R., Chouch, f. James holler (1987/2007). *Principios de analisis instrumental/ principles of instrumental analysis (2° reimpression)*.

## **12. ANEXOS.**

### **12.1. Clasificación de los modelos experimentales para el estudio de la DM comúnmente usados.**

#### **12.1.1. Modelos espontáneos.**

Los modelos espontáneos son estirpes que se mantienen relativamente inalteradas mediante cruces endogámicos y que proceden de un animal en el que se ha detectado diabetes espontánea, o bien de una serie de cruces selectivos favoreciendo un determinado rasgo fenotípico de la DM2 humana. A veces no son totalmente “espontáneos” en el sentido que se requieren modificaciones dietéticas adicionales para generar la diabetes en el seno de una predisposición genética [8].

##### **12.1.1.1. Modelos análogos.**

Los modelos análogos de DM2 se han sometido a análisis genético intentando descubrir nuevos genes de susceptibilidad para extrapolar su estudio a humanos. Los modelos de este tipo más conocidos, destacando por sus características son: la rata Goto-Kakizaki (GK), ésta desarrolla algunas características que pueden ser comparadas con las complicaciones de la diabetes humana, incluyendo lesiones renales, cambios estructurales en los nervios periféricos y anomalías en la retina [19] y el ratón obeso de Nueva Zelanda (*New Zealand Obese*, NZO), el cual presenta un elevado peso desde su nacimiento y aumento de su grasa corporal, que refleja predominantemente hipertrofia de los adipocitos más que hiperplasia de los mismos. Como anomalías metabólicas precoces se han documentado, tanto resistencia a la insulina como excesiva producción de glucosa por parte del hígado [33].

#### **12.1.1.2. Modelos intrínsecos.**

Existe multitud de modelos portadores de mutaciones localizadas que resultan en rasgos fenotípicos imitando alguna de las manifestaciones clínicas de la DM2. En la mayoría de los casos se trata de modelos murinos, por ser adecuados en la manipulación y análisis genético. Estos modelos son valiosos, sobre todo para el estudio de la fisiología y de los mecanismos patogénicos que intervienen en la DM2 y sus complicaciones tardías. Comentaremos brevemente algunos de los modelos de este tipo más estudiados.

#### **12.1.1.3. El ratón *db/db*.**

El “gen de la diabetes” (*db*) se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria [34]. La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM2 humana [35]. La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días, causando una discreta elevación de la glucemia alrededor del mes y siendo marcada la hiperglucemia a las 8 semanas de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células  $\beta$  de los islotes [36] entrando en la fase hipoinsulinémica.

#### **12.1.1.4. El ratón *ob/ob*.**

A diferencia de los mutantes *db/db*, los ratones *ob/ob* son portadores de una mutación en el gen de la propia leptina [37]. Representa un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de diabetes en estos ratones relativamente baja. Esta cepa tiene una esperanza de vida más larga y sintomatología menos acentuada que la del mutante *db/db*.

#### **12.1.1.5. El ratón *Agouti*.**

El producto del gen *agouti* codifica una proteína de 131 aminoácidos que contiene una secuencia señalizador. Dicha proteína es producida en el folículo piloso donde actúa como antagonista del receptor de la hormona estimulante de melanocitos (MSH). Aquí inhibe la producción de eumelanina inducida por la MSH, causando un color amarillento de su pelaje [38]. Además, una proteína relacionada con el *agouti* también es un potente antagonista selectivo de los subtipos 3 y 4 del receptor de la melanocortina (Mc3r y Mc4r), los cuales son expresados en el hipotálamo y están implicados en la regulación del peso corporal. Los ratones homocigotos para diferentes mutaciones, ya sean Ay (letal) o Avy (viable), en el gen *agouti* muestran un fenotipo complejo con obesidad y resistencia a la insulina, además de su típico color amarillo [39]. En humanos, *agouti* se expresa en varios tejidos, incluyendo el adiposo, sugiriendo que podría estar implicado en la regulación de la homeostasis energética.

#### **12.1.1.6. La rata zucker (*fa/fa*).**

También llamada ZDF (*Zucker-Diabetic-Fatty-Rat*) aludiendo a su característico fenotipo obeso. Los animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina no funcionante) son apreciablemente obesos desde las 3 a 5 semanas de vida. Para la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos. La obesidad se hereda de modo recesivo y los animales afectados son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos, y desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejando la obesidad humana, por ello la rata Zucker es el mejor conocido y más ampliamente usado modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz. La rata ZDF presenta tanto resistencia a la insulina (como resultado del receptor mutado de leptina, que causa obesidad), como inadecuada compensación por parte de la célula  $\beta$  [40]. Esto último parece depender de un defecto transcripcional en la célula  $\beta$ , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina. Las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y

heterocigoto (*fa/+*) no presentan obesidad ni hiperglucemia. La rata Zucker no ha sido utilizada tan extensamente como modelo de DM2, probablemente porque, a diferencia de los ratones *db/db* y *ob/ob*, su hiperglucemia es discreta [38] existiendo variaciones entre colonias. Sin embargo, presenta algunas complicaciones similares a la DM2 humana [41], así como hiperinsulinemia secundaria a resistencia periférica a la insulina, la cual es especialmente marcada en el músculo e hígado [42].

### **12.1.2. Modelos inducidos.**

En estos modelos animales se pueden reproducir una o más de las manifestaciones clínicas de la DM2 humana mediante diversos métodos, los más frecuentes son: la inducción hormonal o la administración de fármacos, siendo los más utilizados actualmente los métodos genéticos que generan modelos intrínsecos con mutaciones específicas.

#### **12.1.2.1. Inducción hormonal.**

La administración de corticoides en diversos períodos de la vida del animal puede causar un estado similar a la DM2 humana [43]. Este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM2 que aparece en humanos trasplantados o en tratamiento esteroideo crónico, pudiendo considerarse como un modelo de los que hemos clasificado como “análogos”. Otras hormonas que pueden causar hiperglucemia en animales son la somatostatina, glucagón, catecolaminas y tiroxina.

### **12.2. técnicas analíticas de caracterización.**

Se ofrece mayor información acerca de los fundamentos de las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de las nanomatrices de TiO<sub>2</sub>.

### 12.2.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FTIR).

La técnica de espectroscopia infrarroja abarca las regiones del espectro electromagnético comprendidas entre los números de onda de 12800 a  $10\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, dividiendo así esta región en tres porciones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. La gran mayoría de las aplicaciones analíticas se basan en el empleo de una parte del infrarrojo comprendida entre los 4000 y los  $670\text{ cm}^{-1}$ [44].

La espectroscopia de infrarrojo tiene amplias aplicaciones en análisis cualitativo y cuantitativo. Su principal utilización ha sido en la identificación de compuestos orgánicos, ya que los espectros correspondientes suelen ser complejos y contiene numerosos máximos y mínimos que pueden servir para realizar comparaciones. El espectro de infrarrojo de un compuesto orgánico representa una de las propiedades físicas.

La absorción de radiación infrarrojo se limita en gran parte a especies moleculares para las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibratorios y rotatorios.

Para adsorber radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento vibratorio o rotatorio. Sólo en estas circunstancias puede interactuar con la molécula el campo eléctrico alternamente de la radiación y causar cambios en su movimiento. Por ejemplo, la distribución de carga alrededor de una molécula tal como el HCL no es simétrica, ya que el cloro posee una mayor densidad electrónica que el hidrógeno. En consecuencia, el HCL posee un momento dipolar significativo, por lo cual se dice que es una molécula polar. Si la frecuencia de la radiación iguala a la frecuencia de una vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da como resultado un cambio en la amplitud de la vibración molecular; la consecuencia es la absorción de la radiación. Análogamente, la rotación de moléculas asimétricas alrededor de sus centros

de masa produce una fluctuación dipolar periódica, por lo que es posible la interacción con la radiación. Por otro lado, cuando no se realiza un cambio en el momento dipolar durante una vibración o una rotación, como es el caso de las especies homonucleares como  $O_2$ ,  $N_2$  o  $Cl_2$ , entonces no se efectúa absorción en el IR.

Los niveles de energía vibratoria están cuantizados y las diferencias en energías entre estados cuánticos corresponden a las regiones fácilmente accesibles del infrarrojo de  $13000$  a  $675\text{ cm}^{-1}$  ( $0.75$  a  $15\text{ }\mu\text{m}$ ). El espectro infrarrojo de un gas consiste por lo general en una serie de líneas muy próximas entre sí, debido a que existen varios estados energéticos rotatorios para cada estado vibratorio. Por otra parte, en el estado líquido y sólido está muy restringida la rotación y desaparecen las líneas vibratorias y rotatorias discretas, dejando solo picos vibratorios algo ensanchados.

Las vibraciones corresponden a las categorías básicas de elongación y flexión. Una vibración por elongación supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones por flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo de los enlaces y son de cuatro tipos: de tijeras, oscilación, sacudida y torsión.

### **12.2.2. Difracción de rayos x.**

En este método, los electrones de los átomos ordenados en los cristales desvían los Rayos X originando patrones de difracción, a partir de los cuales se puede predecir la composición de las fases cristalinas, el estado de agregación y el tamaño de partículas metálicas.

El fundamento de esta técnica es la capacidad de los electrones de los átomos de una muestra, que al ser irradiados con fotones de una energía superior a la de su energía de enlace (BE), éstos saldrán proyectados de la muestra con una energía cinética igual al exceso de energía del fotón incidente, respecto a la BE. La energía

cinética (EK) que mide el detector será resultado de sustraer el cambio total que sufre el sistema durante el proceso fotoelectrónico ( $h\nu$ ), la BE y una constante que es propia de cada equipo de análisis y que se relaciona con el vacío residual, la eficacia de los lentes para colimar los electrones, etc.

La difracción de los rayos X es el fenómeno físico a través del cual se manifiesta la interacción fundamental de los rayos X con los cristales (materia ordenada). La característica principal de los DRX es que tienen una longitud de onda de alrededor de 1.5 Å muy parecida a la del espacio interplanar entre los sólidos que es de unos pocos Å. Si un haz de rayos X pasa a través de un conjunto de átomos, las cortezas electrónicas de los átomos interactúan con la onda incidente dispersándola [44].

Los estudios de Difracción de Rayos X, permiten determinar la cristalinidad del sólido o las posibles fases cristalinas que lo componen. La radiación característica se debe a un rearrreglo de los electrones en los orbitales del ánodo, reordenamiento que es necesario después del proceso de excitación [44]. La alta energía de los electrones con la que son bombardeados los átomos del metal ocasionan que los electrones de los niveles internos (K) de los átomos sean expulsados, quedando esta capa excitada con una deficiencia electrónica ( $K^*$ ), la transferencia de electrones de un nivel menos interno (L) a ( $K^*$ ), ocasiona que se presente un nivel excitado del nivel menos interno ( $L^*$ ), el proceso de transferencia de los electrones de L a  $K^*$  lleva consigo una emisión de radiación K, y un estado final del nivel más interno de K y  $F^*$  para el menos interno. El exceso de radiación estará dado por ( $K^* - L^*$ ).

### **12.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

La microscopía electrónica de barrido - SEM- es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de la microscopía óptica que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra. El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de

alrededor de  $10^{-7}$  Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (Figura 15) desde unos 25.000-50.000 nm hasta unos 10nm; es decir, su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos  $10^{-14}$ Á, hasta unos  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$ Á. Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios ya que la intensidad inicial de  $10^{-14}$ Á supone una emisión de  $10^{15}$  e-/seg, mientras que en la definitiva, de  $10^{-12}$ Á, es de  $6 \cdot 10^6$  e-/seg. El haz electrónico con estas últimas características, es decir puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra. Esta motilidad del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento. Por lo tanto, una de las principales características de este instrumento es la existencia de una correspondencia biunívoca (punto a punto) establecida entre la muestra a examinar y la imagen formada, correspondencia que se establece al mismo tiempo, de forma que cubriría a la muestra en series de tiempo, quedando la imagen dividida en muchos elementos fotográficos los cuales serían captados por el sistema fotográfico instalado en el instrumento e integrados en una sola imagen que nos informa sobre la apariencia cúbica de material en estudio.

Si compararnos un microscopio electrónico con uno óptico, en el primero la formación de la imagen se produce por la dispersión de los electrones, mientras que en el óptico la imagen se produce por absorción de los fotones.

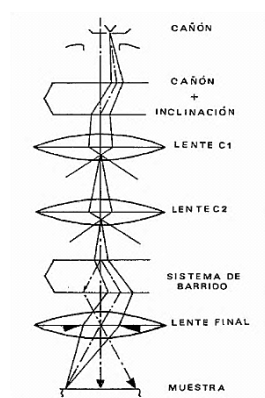


Figura 21.-Componentes de la "óptica" del SEM.

Una señal de electrones secundarios sería la que se emplea normalmente para obtener una imagen de la muestra. Es la señal que nos proporciona una imagen más

real de la superficie que en estudio, se considera un electrón secundario aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV (electrón-volts) y se produce como resultado de interacciones entre los electrones de elevada energía del haz (primarios) y los electrones de la banda de conducción del sólido lo que da lugar a la expulsión de estos electrones con energías de unos pocos electrón-volts, y un electrón retro-dispersado el que lo hace con una energía mayor. La señal de electrones retro-dispersados está compuesta por aquellos electrones que emergen de la muestra con una energía superior a 50 eV (electronvoltios). Estos electrones proceden en su mayoría del haz incidente que rebota en el material después de diferentes interacciones (figura 16).

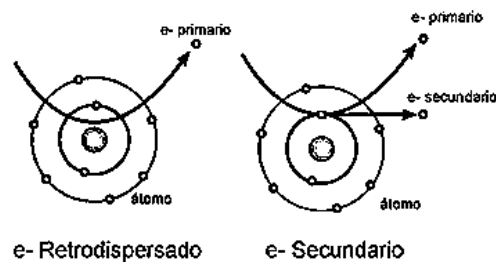


Figura 22. Efectos básicos de los electrones al chocar con la materia. El electrón retro-dispersado es aquel que cambia su trayectoria al atravesar un átomo, mientras que el electrón secundario es aquel que surge del átomo al colisionar con él un electrón primario, que a su vez es retro-dispersado.

La intensidad de la señal de retro-dispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico del material (a mayor número atómico mayor intensidad). Este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. Las zonas con menor Z se verán más oscuras que las zonas que tienen mayor número atómico. Esta es la aplicación principal de la señal de retro-dispersados.