

Evaluación de la administración crónica de ZnO verbesina persicifolia ZnO-Vp sobre la actividad cicatrizante e hipoglucemiante en ratas hiperglucémicas

RESUMEN: En este experimento se evaluó la administración de un complejo formado con ZnO nanoparticulado y *Verbesina persicifolia* (ZnO-Vp) sobre la actividad hipoglucemiante y cicatrizante en ratas hiperglucémicas. Se llevaron a cabo 3 etapas: A) obtención del extracto y formulación del complejo ZnO-Vp; B) evaluación del efecto hipoglucemiante de la administración oral crónica de ZnO-Vp en ratas hiperglucémicas y C) la evaluación del efecto cicatrizante de la administración oral de ZnO-Vp en ratas hiperglucémicas en el modelo de herida por escisión. Se emplearon 5 grupos, 3 grupos controles a los cuales se les administró ZnO-Nps, glibenclamida y agua purificada respectivamente y 2 grupos experimentales administrados con ZnO-Vp a dosis de 200 y 400 mg/kg de peso respectivamente, se analizaron con ANOVA de 2 vías para los factores: tratamiento y tiempo, seguido de la prueba post-hoc de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas. Se encontró que en ambos grupos experimentales disminuyeron la glucemia en ayuno, redujeron el área de herida y aumentaron el porcentaje de cicatrización respecto al grupo control. En conclusión, este trabajo indicó que la administración crónica de 200 y 400 mg/kg de ZnO-Vp posee un efecto hipoglucemiante y cicatrizante en ratas con hiperglucemia inducida con aloxano.

PALABRAS CLAVE: Cicatrización, Diabetes, Farmacia, Nanotecnología, Óxido de zinc, *Verbesina persicifolia*.



Colaboración

Gabriel Arturo Soto-Ojeda; Eder Ramos-Santos; Juan Manuel Gómez-Sedeño; Mauro Antonio Villanueva-Lendecky, Universidad Veracruzana

Fecha de recepción: 11 de noviembre del 2022

Fecha de aceptación: 15 de diciembre del 2022

ABSTRACT: In this experiment, the administration of a complex formed with nanoparticulated ZnO and *Verbesina persicifolia* (ZnO-Vp) was evaluated on the hypoglycemic and healing activity in hyperglycemic rats. Three stages were carried out: A) obtaining the extract and formulation of the ZnO-Vp complex; B) evaluation of the hypoglycemic effect of chronic oral administration of ZnO-Vp in hyperglycemic rats; and C) evaluation of the healing effect of oral administration of ZnO-Vp in hyperglycemic rats in the excisional wound model. Five groups were used, three control groups were administered ZnO-Nps, glibenclamide and purified water respectively and two experimental groups were administered ZnO-Vp at doses of 200 and 400 mg/kg body weight respectively, analyzed with 2-way ANOVA for the factors: treatment and time, followed by Tukey's post-hoc test when significant differences were found. It was found that both experimental groups decreased fasting blood glucose levels, reduced wound area and increased the percentage of healing with respect to the control group. In conclusion, this work indicated that chronic administration of 200 and 400 mg/kg ZnO-Vp possesses a hypoglycemic and healing effect in rats with alloxan-induced hyperglycemia.

KEYWORDS: Healing, Diabetes, Pharmaceuticals, Nanotechnology, Zinc oxide, *Verbesina persicifolia*.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome endocrino-metabólico que lleva a la aparición de hiperglucemia secundaria a defectos de la secreción de insulina, de la acción de la insulina o de ambas [2, 20]. Durante el 2021 se reportaron 6.7 millones de fallecimientos por la enfermedad, siendo un problema de salud pública a nivel mundial [6].

El control inadecuado de la hiperglucemia causa un daño universal en el organismo, que traen como consecuencia complicaciones macrovasculares y microvasculares como enfermedades cardiovasculares,

neuropatía, nefropatía, retinopatía y problemas de cicatrización [8]. Dichas complicaciones se han correlacionado con la generación de úlceras en las extremidades inferiores que no cicatrizan llevando hasta la pérdida del miembro [17, 20]. Se ha calculado que en todo el mundo cada 30 segundos se realiza una amputación por esta causa [3].

En México es común el uso de la medicina tradicional para el tratamiento de distintas enfermedades, *Verbena persicifolia* es una planta conocida como huichín que se ha utilizado para el tratamiento de la diabetes [7], así como, antiinflamatorio y cicatrizante [10, 18].

Por otro lado, se ha reportado el uso de la nanotecnología para el desarrollo de sistemas que mejoren las actividades biológicas de los compuestos naturales [14, 16]. El ZnO nanoparticulado se ha empleado como sistema de administración de compuestos naturales y principios activos [13,16], asimismo, este presenta efectos hipoglucemiantes, antiinflamatorios, cicatrizantes, entre otros [5,13].

Por lo que, en este trabajo se evaluó si la administración de un complejo formado con ZnO-Nps y extracto de etanólico de *Verbena persicifolia* (EtOH-Vp) tiene efecto hipoglucemiante y cicatrizante en ratas con hiperglucemia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del extracto etanólico de *V. persicifolia* (EtOH Vp)

El material vegetal se recolectó en la comunidad de Arroyo del Potrero, municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. Las hojas del espécimen se lavaron y secaron a temperatura ambiente y posteriormente se redujo el tamaño para su procesamiento [18]. La extracción se realizó en un equipo Soxhlet a un rango de temperatura de 65 a 70°C por 2 horas, posteriormente se concentró en un rotavapor a 65°C [15, 19].

Obtención de nanopartículas de ZnO-Vp

Para la formulación del complejo se utilizó nano polvo de ZnO <100 nm de Sigma-Aldrich (ZnO-Nps) como agente de carga y estabilizante del EtOH-Vp. Primero se generó una disolución de EtOH-Vp; para ello, en un baño de ultrasonido a 60°C se colocó agua destilada, etanol grado reactivo y EtOH-Vp hasta obtener una solución homogénea. Enseguida, se preparó una dispersión de ZnO-Nps, se realizó una mezcla de agua destilada, etanol grado reactivo y ZnO-Nps, esta se colocó en un sistema a reflujo a 70 °C hasta la obtención de la dispersión [11, 15, 19]. Posteriormente, la solución de EtOH-Vp se mantuvo dentro del baño de ultrasonido mientras se agregó gota a gota la dispersión de ZnO-Nps a través de una bureta, la solución final se llevó a reflujo a 70°C, enseguida se llevó a un baño de hielo a 3°C por 15 minutos, y por último se eliminó el disolvente en un rotavapor [15].

Sujetos experimentales

Para la evaluación experimental del efecto hipoglucemiante y cicatrizante de ZnO-Vp se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 2.5 a 3 meses de edad con un peso de 200 a 250 g al inicio del experimento. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico transparente con libre acceso a agua y alimento, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 h. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio y la NOM-062-ZOO-1999. Al finalizar el estudio, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal.

Inducción de hiperglucemia

Para la generación de hiperglucemia los sujetos de experimentación se colocaron en ayuno de 12 horas y se les determinó la glucemia en ayunas con ayuda de un glucómetro TRUE-METRIX; posteriormente, se administró aloxano por vía intraperitoneal en una dosis de 180 mg/kg de peso corporal, transcurridos 7 días post-administración se determinó la glucemia en ayuno [1, 18]. Se consideraron como normoglucémicos los sujetos con valores ≤ 100 mg/dL; hiperglucémicos >100 mg/dL pero <200 mg/dL; y diabéticos ≥ 200 mg/dL [4, 12].

Evaluación del efecto hipoglucemiante de la administración crónica de ZnO-Vp en ratas hiperglucémicas

Para la evaluación del efecto hipoglucémico se utilizó 1 grupo de sujetos experimentales normoglucémico y 4 grupos hiperglucémicos que se dividieron en los siguientes grupos:

Grupos control:

- Vehículo + ZnO 50 mg/kg (grupo normoglucémico) (VEH+ZnO)
- Glibenclamida 10 mg/kg (grupo hiperglucémico) (GLIB)
- Vehículo 1mL/kg (grupo hiperglucémico) (VEH)

Grupos experimentales (grupos hiperglucémicos):

- ZnO-Vp 200 mg/kg (ZnO-Vp₂₀₀)
- ZnO-Vp 400 mg/kg (ZnO-Vp₄₀₀)

Todos los tratamientos fueron administrados por vía oral en la mañana durante 21 días. 24 horas después de que se aplicaron los tratamientos, se determinó la glucemia en ayuno los días 7, 14 y 21. La glucemia antes del inicio de los tratamientos se consideró como día 0. Los resultados se evaluaron con ANOVA de dos vías para los factores tratamiento y tiempo del tratamiento; cuando existieron diferencias significativas se empleó la prueba de Tukey como post-hoc. Los valores se presentaron como la media $\pm$ error estándar.

Evaluación del efecto cicatrizante de la administración crónica de ZnO-Vp en ratas hiperglucémicas

Para la evaluación del efecto cicatrizante se rasuró el dorso de los sujetos experimentales delimitando el área de la herida, se removió completamente la epider-

mis y la dermis, con área de 1 cm² y profundidad de 2 mm aproximadamente [9, 18]. Los sujetos experimentales se dividieron en los siguientes grupos:

Grupos control:

- Vehículo + ZnO 50 mg/kg (grupo normoglucémico) (VEH+ZnO)
- Glibenclamida 10 mg/kg (grupo hiperglucémico) (GLIB)
- Vehículo 1mL/kg (grupo hiperglucémico) (VEH)

Grupos experimentales (grupos hiperglucémicos):

- ZnO-Vp 200 mg/kg (ZnO-Vp₂₀₀)
- ZnO-Vp 400 mg/kg (ZnO-Vp₄₀₀)

Todos los tratamientos fueron administrados por vía oral en la mañana durante 21 días. Se calculó el porcentaje de cicatrización comparando el tamaño inicial de la herida y el tamaño final. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de cicatrización:

$$\% \text{ de cicatrización} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Dónde:

- A_0 es área de la herida inicial;
- A_x es área de la herida en día específico [9, 18].

Los resultados se evaluaron con ANOVA de dos vías para los factores tratamiento y tiempo del tratamiento; cuando existieron diferencias significativas se empleó la prueba de Tukey como post-hoc. Los valores se presentaron como la media +/- error estándar.

RESULTADOS

Obtención del EtOH Vp

El propósito de esta etapa experimental fue lograr la extracción etanólica de las hojas de *Verbesina persicifolia*. Una vez colectado el espécimen vegetal fue seleccionado, secado y triturado con este se logró obtener el EtOH-Vp seco con un rendimiento del 40% a partir de la extracción sólido-líquida mediante el equipo Soxhlet, sus características se engloban en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del extracto EtOH-Vp seco.

Características	Resultado	Fotografía
Color	Verde	
Olor	Herbal Característico a V. persicifolia	
Aspecto	Oleoso	
Consistencia	Solida	
Rendimiento	40%	

Fuente: Elaboración propia.

Obtención de nanopartículas de ZnO-Vp

Este experimento tuvo como objetivo la generación del complejo ZnO-Vp para su posterior evaluación del efecto hipoglucemiante y cicatrizante. Se obtuvo el

complejo ZnO-Vp a través del acoplamiento del Nps-ZnO y EtOH-Vp, las características del complejo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características del complejo ZnO-Vp.

Características	Resultado	Fotografía
Color	Verde	
Olor	Característico a V. persicifolia	
Aspecto	Libre de partículas extrañas	
Consistencia	Solida	
Rendimiento	85%	

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del efecto hipoglucémico de la administración crónica de ZnO-Vp en ratas hiperglucémicas

Al analizar la variable de glucemia en ayuno para la interacción de factores tratamiento y tiempo del tratamiento se encontraron diferencias estadísticamente significativas [$F_{(12,100)} = 29.089$; $p < 0.001$]. El grupo VEH-ZnO presentó valores normoglucémicos a lo largo de la prueba a diferencia de los demás grupos experimentales que mostraron valores más altos ($*p \leq 0.001$). El grupo VEH mostró los niveles de glucemia en ayunas más altos vs todos los tratamientos durante todo el tiempo de tratamiento ($*p \leq 0.001$). Los grupos administrados con ZnO-Vp a las diferentes dosis (200 y 400 mg/kg) y la glibenclamida mostraron una mayor glucemia en ayunas, respecto al grupo VEH-ZnO (normoglucémico) y menor respecto al grupo VEH (ratas diabéticas) ($*p \leq 0.001$). Se observó, que los sujetos experimentales administrados con ZnO-Vp, fueron estadísticamente similares entre ellos y presentaron una disminución significativa el día 1 vs 21 de tratamiento, desplazándose del rango diabético al hiperglucémico ($+p \leq 0.001$). Véase la Figura 1.

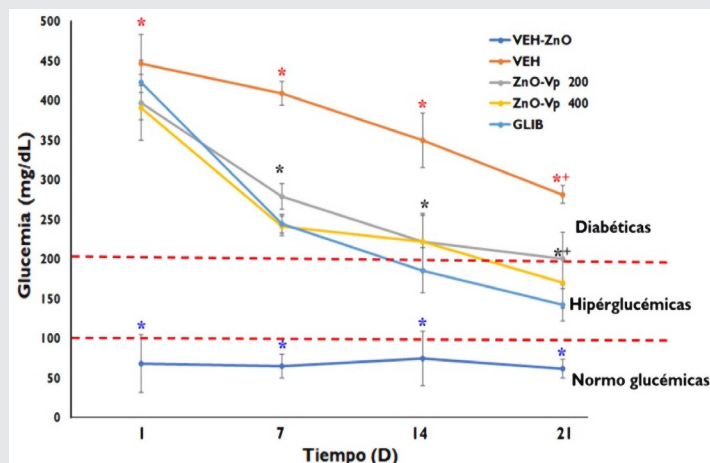


Figura 1. Interacción de factores tratamiento y tiempo para la variable glucemia en ayuno.

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del efecto cicatrizante de la administración crónica de ZnO-Vp en ratas hiperglucémicas

Al analizar la variable de área de la herida, el ANOVA indicó diferencias significativas [$F(4,200) = 53.981$; $p = 0.001$], la prueba post-hoc mostró que en todos los grupos hubo una disminución del área de la herida a lo largo del tiempo que duró la prueba ($*p \leq 0.001$). Los sujetos experimentales tratados con las diferentes dosis ZnO-Vp (hiperglucémicos), al igual que los VEH-ZnO (normoglucémicos) redujeron mayormente esta variable vs los grupos que recibieron el VEH y GLIB ($*p \leq 0.001$), se observó que produjeron el cierre de la lesión en un menor tiempo, tal y como se observa en la Figura 2.

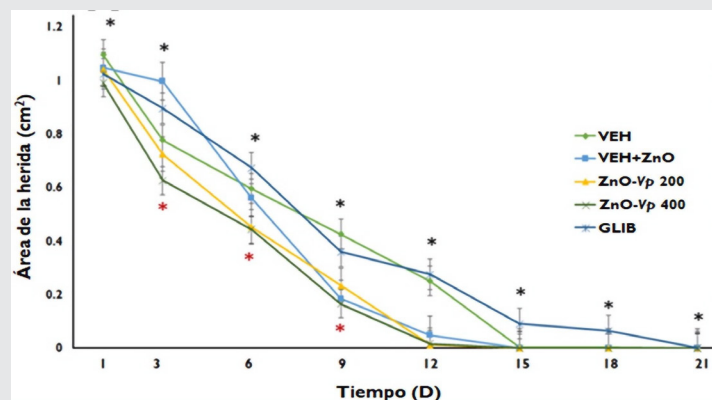


Figura 2. Interacción de factores tratamiento y tiempo para la variable área de la herida.

Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, al evaluar el % de cicatrización se observó en todos los grupos un aumento significativo en función del tiempo e independiente de los tratamientos [$F(4,200) = 35.051$; $p = 0.001$] ($*p \leq 0.001$). El mayor porcentaje de cicatrización se obtuvo en los grupos que recibieron VEH-ZnO (normoglucémicos) y ZnO-Vp a las diferentes dosis vs los tratados con GLIB y VEH que tuvieron los porcentajes más bajos en esta prueba ($*p \leq 0.001$). Véase la Figura 3.

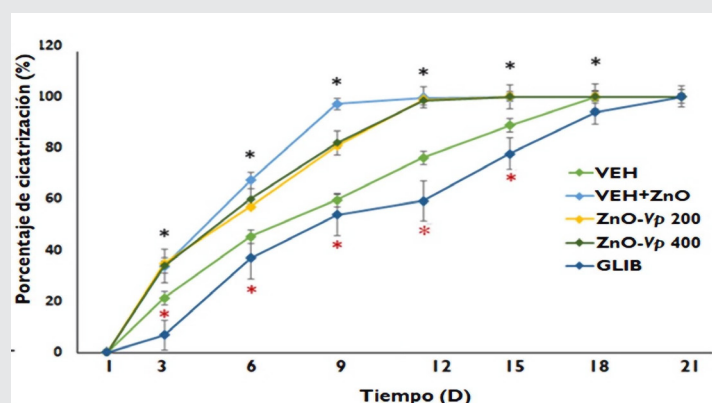


Figura 3. Interacción de factores tratamiento y tiempo para la variable porcentaje de cicatrización.

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

Se logró obtener el EtOH Vp a través del equipo Soxhlet con un rendimiento del 40%, con ello se consiguió desa-

rollar un complejo ZnO-Vp con un rendimiento del 85%. Se observó que la administración crónica de ZnO-Vp posee efectos hipoglucemiantes y cicatrizantes a partir de la dosis de 200 y 400 mg/kg en ratas hiperglucémicas. Los resultados indicaron que las dosis ensayadas, disminuyeron y estabilizaron la glucemia en ayunas (<200 mg/kg) en los sujetos hiperglucémicos de forma similar al efecto mostrado con el control farmacológico glibenclamida. Las dosis de ZnO-Vp redujeron el tiempo de cicatrización en sujetos hiperglucémicos de forma análoga al resultado obtenido en ratas normoglucémicas.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Amah, C. C., Joshua, P. E., Ekpo, D. E., Okoro, J. I., Asomadu, R. O., Obelenwa, U. C., & Odiaba, A. S. (2022). Ethyl acetate fraction of *Fagara zanthoxyloides* root-bark possess antidiabetic property against alloxan-induced diabetes and its complications in Wistar rat model. *Journal of ethnopharmacology*, 293, 115259.

[2] American Diabetes Association. (2021). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*, 44(Suppl. 1): S152-S33.

[3] Amoah, V. M. K., Anokye, R., Acheampong, E., Dadson, H. R., Osei, M., & Nadutey, A. (2018). The experiences of people with diabetes-related lower limb amputation at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. *BMC Research Notes*, 11(1).

[4] El-Gharbawy, R. M., Emara, A. M., & Abu-Risha, S. E.-S. (2016). Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 810-820.

[5] El-Megeed, S. A. & El-Sayed, W. (2022). The potential role of zinc oxide nanoparticles in the treatment of diabetes mellitus: An updated review. *Zagazig Veterinary Journal*, 50 (1), 37-51.

[6] Federación Internacional de Diabetes. (2021). Atlas de la Diabetes de la FID. Federación Internacional de Diabetes, 10, 34-60.

[7] Hernández, A., Campos, R. G., López, C. U., Juárez, A. & Hernández, A. D. (2022). Plantas medicinales de la familia Asteraceae con actividad hipoglucemiante en México, una revisión. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 8(16), 14-17.

[8] Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E., & Gregg, E. W. (2018). Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*, 62, 3-16.

- [9] Khorasani, M. T., Joorabloo, A., Adeli, H., Milan, P. B., & Amoupour, M. (2021). Enhanced antimicrobial and full-thickness wound healing efficiency of hydrogels loaded with heparinized ZnO nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *International journal of biological macromolecules*, 166, 200-212.
- [10] López-Canúl, M. G. (2015). Evaluación del efecto anti-nociceptivo y anti-alodínico del extracto acuoso de huichín (*Verbesina persicifolia* DC) administrado de forma aguda en ratas macho de la cepa Wistar. [Tesis de doctorado, Universidad Veracruzana].
- [11] Low, D., Mahendra, C., Supramaniam, J., Tan, L., Lee, L., Manickam, S., Goh, B., Tan, K. & Tang, S. (2021). Ultrasound-enhanced biosynthesis of uniform ZnO nanorice using *Swietenia macrophylla* seed extract and its in vitro anticancer activity. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 572-585.
- [12] Mejía, R., & Pérez, I. H. (2020). Effect of alpha linolenic acid on membrane fluidity and respiration of liver mitochondria in normoglycemic and diabetic Wistar rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*.
- [13] Murali, M., Kalegowda, N., Gowtham, H. G., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alghamdi, S., Shilpa, N., Singh, S. B., Thriveni, M. C., Aiyaz, M., Angaswamy, N., Lakshmidhevi, N., Adil, S. F., Hatshan, M. R., & Amruthesh, K. N. 97 (2021). Plant-Mediated Zinc Oxide Nanoparticles: Advances in the New Millennium towards Understanding Their Therapeutic Role in Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 13(10), 1662.
- [14] Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E., Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 71.
- [15] Rosas, J. A., Rodriguez, J. A. M., Fonseca, A. D. D., Aguilar, A. E. A., Macedo, C. M. A., Vázquez, V. S. & Rodríguez, L. A. M. (2015). Encapsulation of Glycosides from Extract *Plantago Major* in ZnO Matrices by Sol-Gel. *Journal of Materials Science and Engineering A*, 5(3-4), 154-158.
- [16] Singh, T. A., Das, J., & Sil, P. C. (2020). Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Advances in colloid and interface science*, 286, 102317.
- [17] Smokovski, I. (2021). Impact of Diabetes Complications. En Smokovski, I. (Eds.), *Managing diabetes in low income countries*. (25-37). Shtip: Springer Nature.
- [18] Soto-Ojeda, G. A., del Carmen Cortés-Pomares, P., & Villanueva-Lendechy, M. A. (2022). Formulación de un gel a base del extracto etanólico de *Verbesina persicifolia* y *Calendula officinalis* para su evaluación antimicrobiana y cicatrizante. *RINDERESU*, 6(1-2).
- [19] Treviño, S., Aguila, J., Gonzalez, M. A., C, G., Rubio, E., López, G., Moreno, J. A. & Díaz, A. (2014). Estudios preliminares de caracterización y acción cicatrizante de nanomatrices de ZnO con extracto de *Plantago major* en la piel de rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45 (4).
- [20] Vijayakumar, V., Samal, S. K., Mohanty, S., & Nayak, S. K. (2018). Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. *International Journal of Biological Macromolecules*.