

CONTENIDO

Diseño y Síntesis de derivados esteroidales de valina como inhibidores de la 7-dehidrocolesterol- reductasa (DHCR7) y de la 3 β -hidroxiesteroide- Δ^8,Δ^7 -isomerasa (EPB)	2
Desarrollo de un nuevo sistema co-amorfo irbesartán – glimepirida para el tratamiento del síndrome metabólico	6
Efecto ansiolítico en ratas utilizando extractos vegetales encapsulados en alginato como alternativa al tratamiento de la ansiedad	10

DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS ESTEROIDALES DE VALINA COMO INHIBIDORES DE LA 7-DEHIDROCOLESTEROL- REDUCTASA (DHCR7) Y DE LA 3B-HIDROXIOESTEROIDE- Δ^8, Δ^7 -ISOMERASA (EPB)

Jesús Eduardo Galicia Cortés^{1,2}, Reyna Zeferino Díaz³, Sara Montiel Smith³, Jesús Sandoval
Ramírez^{1,3}, Alan Carrasco Carballo^{1,2}

¹Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, EMA6-204. Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla. C.U, Puebla, Pue.

²Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. BUAP.

³Laboratorio de Síntesis y modificación de productos naturales-FCQ8-102D, BUAP.

Contacto: jesus.galiciaco@alumno.buap.mx recepción.lesgo@gmail.com

Introducción

Los estrógenos son hormonas esteroidales que ejercen múltiples efectos, principalmente sobre la proliferación y diferenciación celular en diversos órganos, como hipotálamo, hipófisis, útero, mama, ovario, hueso e hígado. Su acción en el ámbito celular se ejerce a través de un receptor nuclear específico, conocido como receptor de estrógenos (RE), el cual también es utilizado por los antiestrógenos, bloqueando de esta manera la expresión de genes, acción que depende del estímulo estrogénico [1]. Los antiestrógenos son agentes antagonistas competitivos de los estrógenos, a nivel del receptor citosólico [2]. Existen dos tipos de estos inhibidores, los Tipo I, los cuales no son de naturaleza esteroidal y funcionan como moduladores de receptores estrogénicos; los del Tipo II o puros son de origen esteroidal y poseen una alta afinidad por el receptor de estrógeno e inhiben la acción de estos por competencia por este receptor, impidiendo su dimerización [1].

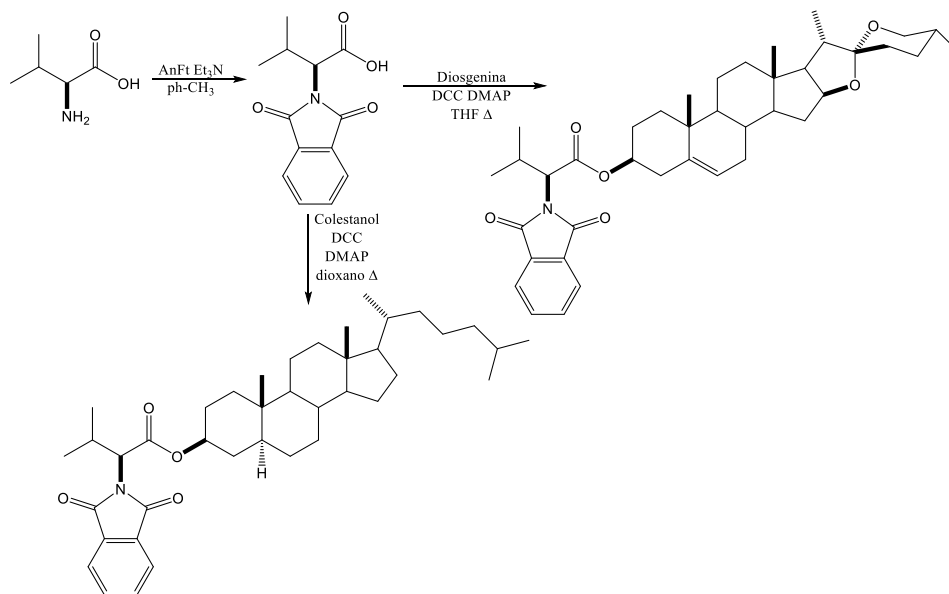
Un sitio de unión interesante es el “Sitio de unión anti-estrógeno” (AEBS por sus siglas en inglés) [3] el cual posee dos enzimas importantes: La *7-dehidrocolesterol reductasa* (DHCR7) y la 3β -hidroxioesteroide- Δ^8, Δ^7 -isomerasa (EPB) [4]. La primera es una enzima encargada de la producción del colesterol por la reducción del doble enlace C7-C8 del 7-dehidrocolesterol (7-DHC), está ligada a la biosíntesis del colesterol, la cual es parte de la biosíntesis de los esteroides; la enzima está ampliamente ligada al Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) una enfermedad autosómica recesiva caracterizado por múltiples malformaciones [5]. Los niños con SLOS tienen niveles elevados de 7-deshidrocolesterol (7-DHC) en suero y niveles bajos de colesterol en este mismo [4]. Por otro lado, la EPB cataliza la conversión de los Δ^8 -esteroides a sus correspondientes Δ^7 -isómeros. Esta enzima está asociada a la biosíntesis del colesterol y directamente relacionada a dos enfermedades: la *Condrodisplasia punctata 2, dominante ligada a X* (CDPX2) y el *Síndrome MEND* [6]; la primera de ellas es un síndrome displásico caracterizado por la múltiple presencia de calcificaciones puntiformes a nivel de grandes articulaciones, el CDPX2 es un trastorno raro de la biosíntesis defectuosa del colesterol, caracterizado bioquímicamente por un aumento en la cantidad de 8-deshidrocolesterol y colest-8-en- 3β -ol en el plasma y los tejidos [7]. El Síndrome MEND es causado por una mutación hemiciigótica en el gen EPB (300205) en el cromosoma

Xp11, se caracteriza por la aparición de distintas manifestaciones asociadas a un defecto en la biosíntesis de esteroides [8].

Metodología

Con la finalidad de analizar el posible valor biológico por parte de los derivados de protegidos de valina, se realizó un estudio preliminar mediante la plataforma SwissTargetPrediction [9], de acuerdo a los resultados analizados y a la capacidad de interacción se procedió a realizar el estudio de predicción de propiedades del sistema ADME, para determinar en primera instancia si los compuestos son candidatos a inhibidores de enzimas CYP importantes en el cuerpo y continuamente la capacidad de absorción GI así como si cumple con las reglas de Veber y Lipinski, con la finalidad de determinar su valor sintético.

Para lograr la obtención de los dos productos, primero se realizó una reacción de protección de un aminoácido, para este caso de la L-valina, haciéndolo reaccionar con el anhídrido ftálico, en presencia de trietilamina, en un sistema Dean-Stark. Finalmente, se procedió a hacer reaccionar este aminoácido protegido con dos esteroides, con características semejantes: el 5 α -colestanol y la diosgenina. La reacción de esterificación se realizó empleando DDC, en presencia de DMAP, obteniendo como producto en ambos casos el ftalimidato de valina (ft-valina) enlazada en la posición C-3 del esteroide.



Esquema 1. Síntesis de ésteres ft-valina esteroidales

Discusión y resultados

La plataforma de predicción arrojó que dichos compuestos presentaban una afinidad de interés por las proteínas DHCR7 y EPB, correspondiente al *Sitio de unión anti-estrógenos*, lo cual hizo de interés estos derivados contra las patologías que tienen asociado estas enfermedades, al realizar la predicción de las propiedades dadas por la plataforma ADME (mostrados en la tabla 1) se puede observar que ambos compuestos presentan la misma tendencia, al no ser inhibidores de las enzimas CYP, no presentar alertas como PAINS y dar positivo a las reglas de Veber; sin embargo, con diferencias a las reglas de Lipinski sobre la correspondiente MM y la lipofiliidad. Cabe destacar que los productos naturales de tipo esterooidal pocas veces cumplen con estas dos, sin menoscabo de su importancia sobre su actividad biológica, lo cual hizo de interés la síntesis de estos derivados. Además, se debe mencionar que ambos

compuestos no presentan capacidad de permeabilidad a la membrana neuronal, disminuyendo su capacidad de efectos secundarios de tipo neurológico.

Tabla 1. Resultados Sistema ADME.

Propiedad	Ft-Val-Colestanol	Ft-Val-Diosgenina
Inhibidor CYP1A2	No	No
Inhibidor CYP2C19	No	No
Inhibidor CYP2C9	No	No
Inhibidor CYP2D6	No	No
Inhibidor CYP3A4	No	No
Absorción GI	Baja	Baja
Veber	Si	Si
Lipinski	No, 2 violaciones (MM>500, WLOG>4.15)	No, 2 violaciones (MM>500, WLOG>4.15)
Permeación BBB	No	No
PAINS	Cero alertas	Cero alertas

Por parte de la síntesis, los resultados de la reacción fueron positivos, comenzando por la primera etapa donde reaccionó la L-valina con el anhídrido ftálico, disuelto en tolueno y con la presencia de trietilamina como catalizador, y como una base que atrae protones de los grupos hidroxilo y amino, en el aparato Dean Stark, el cual elimina el agua producida en la reacción, lo que ocasiona que se vuelva irreversible; para después obtener nuestro producto primario, el ft-valina, donde se realizó una protección al grupo amino, y así este no pueda reaccionar en etapas posteriores. Cabe destacar que la protección del aminoácido se logró escalar a un proceso de 10 g.

En la segunda parte, se desarrolló una esterificación, donde el ácido carboxílico del ft-valina se colocó a reaccionar con el alcohol en C-3 de los esteroides de interés, utilizando DDC como activador del ácido además de como capturador de agua y DMAP como catalizador básico, así como solventes polares apróticos para favorecer la reacción, como era de esperarse se obtuvo DCU como subproductos en forma de cristales, lo cual se constató con su espectro de IR, mientras que en la parte esteroidea se observó la formación de un producto con un Rf muy cercano a la materia prima en ambos casos, lo cual dificultaría la purificación de estos nuevos derivados, por lo que se optó por derivatizar a la materia prima remanente con anhídrido trifluoroacético para aumentar su Rf y facilitar la purificación, posteriormente para la caracterización se realizó por medio de RMN, en ambos casos se puede detonar el desplazamiento a mayor frecuencia de la señal correspondiente a H-3 debido a la esterificación del hidroxilo en C-3, así como la aparición de una señal en la región de 3.0 -3.5 ppm correspondiente a los protones base del Nitrógeno del grupo amino del aminoácido, al igual que las señales del anillo aromático del grupo ftalamidato, análogamente se obtuvieron las señales esperadas en el espectro de ¹³C, dentro de las que destaca la señal del carbono de ester nuevo en 180 ppm y la del grupo amida, así como la de los anillos aromáticos, permitiendo confirmar la estructura de ambos derivados, obtenidos con un 65 % el derivado de colestanol y en un 73 % el de diosgenina, lo cual los hace buenos candidatos tanto desde los resultados de predicción como de síntesis para proseguir con su actividad biológica.

Conclusión

El diseño dirigido en base a predictores de actividad biológica demostró que los derivados de valina presentan mayor afinidad al *Sitio de unión anti-estrógenos*, el cual se divide en dos enzimas: la DHCR7 y la EPB, ambas relacionadas con diversas patologías de interés, lo cual los hace buenos candidatos, pero es necesario pasar el segundo filtro dado por la plataforma ADME en la cual se demostró siguen la misma tendencia al no ser inhibidores de enzimas CYP, no presentar alertas como PAINS y dar positivo a las reglas de Veber, no violan las reglas de Lipinski correspondiente a la MM y a la lipofilicidad, y ambos compuestos no presentan capacidad de permeabilidad a la membrana neuronal, lo cual impulsa el interés de estos derivados esteroideos naturales por su actividad biológica, y procediendo a sus síntesis misma que arrojo rendimientos altos y en pocas etapas de reacción lo cual los hace excelentes candidatos a evaluación biológica..

Referencias

- [1] Barrón, A.; Arias, J.; & Castro, I; *Salud Publica Mex.*, **2001**, 43:577-584.
- [2] Valcesia; Malgor; “*Progesterona. Progestágenos. Antiprostágenos. Anticonceptivos hormonales. Farmacología de las hormonas sexuales femeninas*”; sección IV, capítulo 26, pp. 192-210.
- [3] Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V.; Swiss Target Prediction, *Nucleic Acids Research*, **2019**, 1-8.
- [4] UniProtKB, (s.f.). “Q9UBM7 (DHCR7_HUMAN)”. Link: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBM7> (Consultado el 05 de junio del 2019).
- [5] de la Torre, M.; Carrasco, L.; Girós M., L.; Quijano, S.; & Arregui, A.; *An Esp Pediatr.*, **1997**, 46:617-620.
- [6] UniProtKB, (s.f.). “Q15125 (EBP_HUMAN)”. Link: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15125> (Consultado el 05 de junio del 2019).
- [7] Gil, M., T.; Aparicio, P.; Alonso, B.; Sastre, E.; Sánchez, J.; & Merino, J., M.; *An Esp Pediatr.*, **1996**, 44:509-511.
- [8] Kniffin, C., L. (2015). “MEND SYNDROME, MEND”. Link: <https://www.omim.org/entry/300960> (Consultado el 05 de junio del 2019).
- [9] Antoine, D.; Michielin, O.; *Sci. Rep.* **2017**, 7, 42717.

DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA CO-AMORFO IRBESARTÁN – GLIMEPIRIDA PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO

Jorge Cruz-Angeles¹, Marcelo Videá^{1,2}, Luz María Martínez^{1,2}

¹Escuela de Ingeniería y Ciencias; ²Departamento de Ciencias: Químicas y Nanotecnología.

Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur. Monterrey,

NL, C.P. 64849, México. *luzvidea@itesm.mx

Resumen:

Un tercio de la población mundial sufre de síndrome metabólico (MetS). El tratamiento para pacientes con MetS por lo general incluye fármacos que son prescritos simultáneamente para tratar diabetes y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, el principal problema con esos fármacos es su baja solubilidad. El uso de sistemas binarios co-amorfos ha emergido como una estrategia para incrementar su solubilidad. En el presente estudio, un nuevo sistema binario co-amorfo a partir de irbesartán y glimepirida fue desarrollado, el cual retuvo el estado amorfo durante el calentamiento (> 200°C) y almacenamiento (>330 días). Así mismo mostró una alta disolución para ambos fármacos. Convirtiendo a la glimepirida de ser prácticamente insoluble en su forma cristalina a alcanzar 4 µg/mL y el irbesartán haciéndolo 12 veces más soluble que el fármaco comercial cristalino.

Introducción:

Un tercio de la población a nivel mundial padece de síndrome metabólico (MetS) ¹, el cual es definido como una constelación de factores de riesgo interconectados que promueven el desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares en pacientes propensos ². Por lo cual, es común que un paciente con MetS sufra de hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes al mismo tiempo. El uso de la terapia de combinación (la cual tiene como objetivo tratar más de una enfermedad de manera simultánea) ha emergido como una estrategia pragmática en la formulación de fármacos más eficientes. Los fármacos para la diabetes y las enfermedades cardiovasculares son claros candidatos para su formulación como terapia de combinación, puesto que muchos de ellos son normalmente prescritos de manera simultánea y además necesitan ser más eficiente pues presentan baja solubilidad ³. Actualmente existe múltiples estrategias para incrementar la solubilidad de fármacos ⁴, entre ellas destaca como una de las más prometedoras el desarrollo de sistemas binarios co-amorfos ^{5,6}, en el cual dos fármacos son combinados para producir una formulación que además de ser más soluble, también es estable en el estado amorfo. Dadas las características del MetS, esta estrategia puede ser explorada para desarrollar una terapia de combinación. Dos fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de la diabetes y enfermedades cardiovasculares son irbesartán (hipertensión arterial) y glimepirida (diabetes), ambos clasificados como fármacos clase II (baja solubilidad, altamente permeables). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue mejorar la disolución del irbesartán mediante el desarrollo un sistema binario co-amorfo con glimepirida, preparado por fusión-enfriado. Hasta el día de hoy no hay reportes de un sistema co-amorfo preparado con estos fármacos.

Materiales y métodos:

El sistema binario co-amorfo irbesartán – glimepirida (IBS – GMP) fue preparado mediante la técnica de fusión enfriado, en una fracción molar $x_{GMP} = 0.01, 0.1$ y 0.5 . La caracterización térmica fue realizada por calorimetría diferencial de barrido (DSC), mientras que la estabilidad en el estado amorfo en función del tiempo fue analizada mediante difracción de rayos – X de polvos (PXRD). El análisis de la disolución del sistema binario co-amorfo y la comparación con su contraparte cristalina fue realizado en HCl pH 1.2 y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración de ambos fármacos (IBS y GMP) fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), a una $\lambda = 247\text{ nm}$ y 230 nm para IBS y GMP, respectivamente.

Discusión y resultados:

La Figura 1a muestra los termogramas obtenidos tanto para el irbesartán como la glimepirida puros, así como las diferentes fracciones molares analizadas después de su amorfización *in situ* en el equipo de DSC. Estos termogramas muestran una transición identificada como temperatura de transición vítrea (T_g), la cual se observa como un cambio de pendiente en la línea base del termograma, el comportamiento de las T_g s en función de las composiciones molares puede observarse de manera más clara en la Figura 1b, este comportamiento intentó ser ajustado acorde a la función Gordon-Taylor la cual intenta predecir las temperaturas de transición vítrea de dos materiales miscibles entre ellos una vez amorfizados. No obstante como puede observarse los datos experimentales muestran una desviación positiva a la función de Gordon-Taylor, lo cual según reportes está vinculado a la presencia de interacciones intermoleculares entre ambos componentes del sistema binario después de su amorfización, dichas interacciones fueron inspeccionadas mediante espectroscopia infrarroja encontrando desplazamientos en grupos funcionales capaz de formar interacciones intermoleculares del tipo puente de hidrógeno entre ambas moléculas. La presencia de estas interacciones podría tener un efecto en la disolución de cada fármaco, por lo que se determinó su perfil de disolución en HCl pH 1.2 para el sistema en tres formulaciones diferentes: la proporción 1:1 ($x_{GMP} = 0.5$), 1:9 ($x_{GMP} = 0.1$) y 1:99 ($x_{GMP} = 0.01$), siendo la última la que concuerda con la proporción en que ambos fármacos se prescriben.

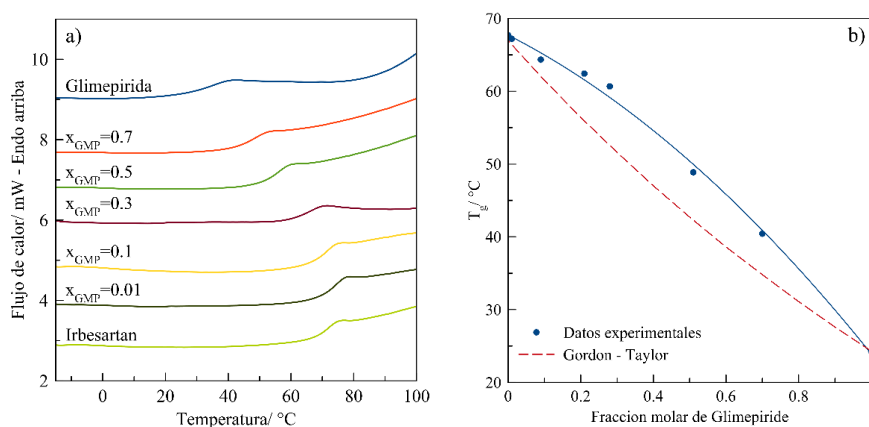


Figura 1. a) Termograma de DSC de los fármacos puros (glimepirida e irbesartán), así como de las mezclas binarias, analizadas justo después del proceso de fusión enfriado, b) comportamiento de las temperaturas de transición vítrea de los sistemas binarios analizados.

La Figura 2 muestra los perfiles de disolución tanto para glimepirida como para irbesartán. La glimepirida cristalina resultó ser prácticamente insoluble en las condiciones analizadas, puesto que al cuantificarla su concentración se encontró por debajo del límite de detección. De las formulaciones analizadas para este fármaco, la formulación $x_{GMP} = 0.01$ resultó ser claramente la de mayor disolución a las 3 horas, alcanzando los $3.91 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$, muy por encima de las otras dos formulaciones analizadas: $0.53 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ y $0.78 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ para $x_{GMP} = 0.5$ y 0.1 , respectivamente. La formulación con mayor incremento en disolución observado para glimepirida coincidió con los resultados de irbesartán, ya que la formulación $x_{GMP} = 0.01$ alcanzó una concentración de $1360 \pm 37 \mu\text{g/mL}$, lo cual significó una disolución del irbesartán mayor al 90% a las 3 horas; mostrando resultados claramente mejores que el fármaco cristalino y las otras formulaciones analizadas.

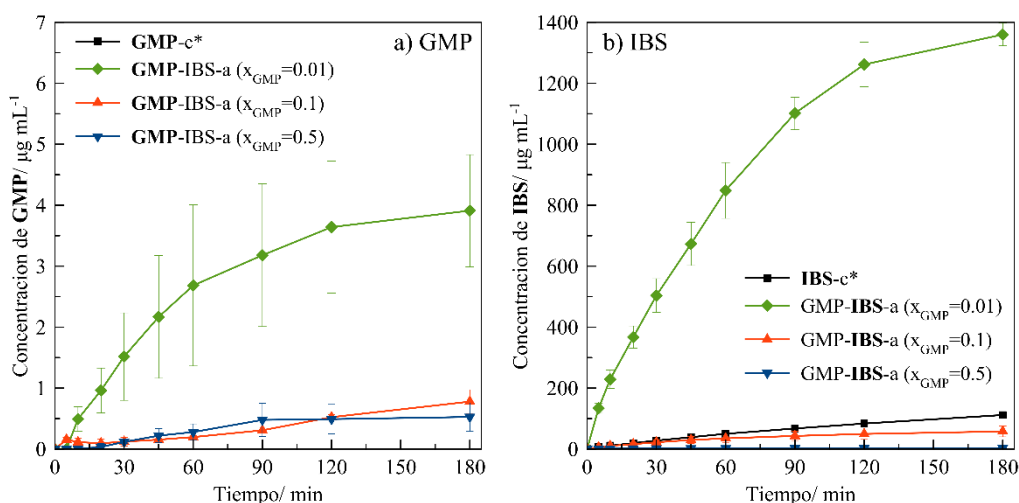


Figure 2. Experimentos de disolución de glimepirida a) e irbesartán b) en su forma cristalina y en el sistema binario co-amorfo GMP-IBS en las fracciones molares $x_{GMP} = 0.01, 0.1$ y 0.5 . Condiciones HCl pH 1.2 y 37°C . Las barras de error corresponden a una desviación estándar ($n=3$).

Los sistemas binarios co-amorfos son por definición materiales meta-estables, por lo que tienden a cristalizar, perdiendo así sus propiedades de alta solubilidad, volviendo indispensable analizar su comportamiento como estado amorfo en función del tiempo. Para esta inspección se utilizó difracción de rayos - X, la Figura 3 muestra los resultados de este análisis, encontrando que incluso después de 11 meses de almacenamiento en desecador y temperatura ambiente, las tres formulaciones propuesta se mantienen amorfas y sin ninguna señal de posible cristalización, confirmado al sistema binario co-amorfo $x_{GMP} = 0.01$ no solamente como una formulación con alta disolución sino también estable en el estado amorfo.

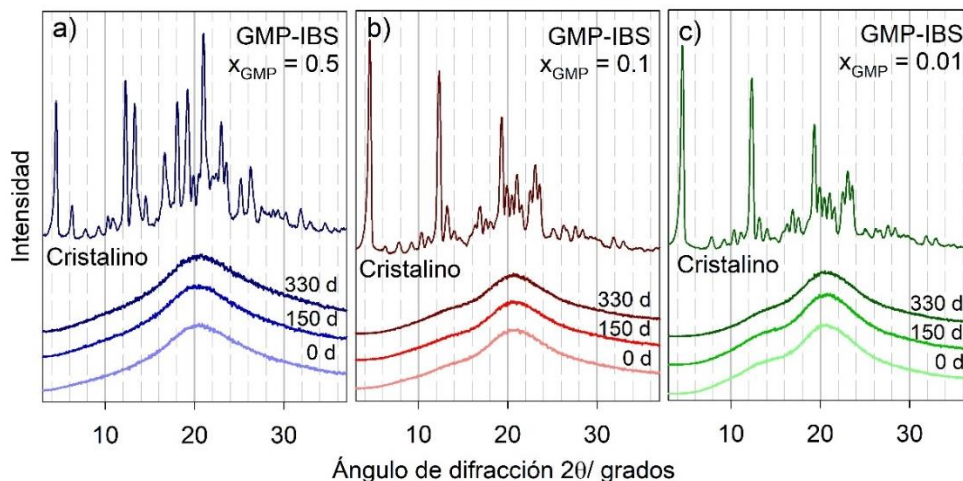


Figura 3 a) Difractograma de sistema binario co-amorfo de glimepirida e irbesartán fracción molar: a) $x_{GMP}=0.5$ b) $x_{GMP}=0.1$ y c) $x_{GMP}=0.01$, en estado amorfo como función del tiempo de almacenamiento (25°C).

Conclusiones:

Un nuevo sistema co-amorfo a partir de glimepirida – irbesartán con un claro incremento en la disolución de ambos fármacos fue preparado y caracterizado. Tanto el irbesartán como la glimepirida mostraron el mayor incremento de solubilidad en la formulación $x_{GMP} = 0.01$. La glimepirida pasando de ser prácticamente insoluble en su forma cristalina a alcanzar los 4 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el irbesartán resultó 12 veces más soluble en comparación con forma comercial como material cristalino. Además de ser altamente soluble el sistema $x_{GMP} = 0.01$ resultó ser estable como formulación co-amorfa, incluso cuando fue expuesto al calentamiento (mayor a 200°C) y también durante el almacenamiento, ya que retuvo el estado amorfo por más de 330 días. La formulación ($x_{GMP} = 0.01$) presentada en este trabajo podría ser usada como terapia de combinación para el tratamiento del síndrome metabólico, por lo que este trabajo contribuye al desarrollo de una formulación co-amorfa altamente soluble con potencial uso en el tratamiento de una condición que afecta a un tercio de la población mundial.

Referencias:

- ¹ M. Aguilar, T. Bhuket, S. Torres, B. Liu, and R. Wong, *Jama* **313**, 1973 (2015).
- ² S.M. Grundy, J.I. Cleeman, S.R. Daniels, K.A. Donato, R.H. Eckel, B.A. Franklin, D.J. Gordon, R.M. Krauss, P.J. Savage, S.C. Smith, J.A. Spertus, and F. Costa, *Circulation* **112**, 2735 (2005).
- ³ G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, and J.R. Crison, *Pharm. Res.* **12**, 413 (1995).
- ⁴ K.T. Savjani, A.K. Gajjar, and J.K. Savjani, *ISRN Pharm.* **2012**, 1 (2012).
- ⁵ L.M. Martínez, M. Videá, G.A. López-Silva, C.A. de los Reyes, J. Cruz-Angeles, and N. González, *Int. J. Pharm.* **477**, 294 (2014).
- ⁶ O. Korhonen, K. Pajula, and R. Laitinen, *Expert Opin. Drug Deliv.* **14**, 551 (2017).

EFFECTO ANSIOLÍTICO EN RATAS UTILIZANDO EXTRACTOS VEGETALES ENCAPSULADOS EN ALGINATO COMO ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE LA ANSIEDAD

Guillermo Enrique López Acevedo¹, Genaro Alberto Paredes Juárez¹, Zaida Nelly Juárez¹

¹Facultad de Biotecnología. Decanato de Ciencias Biológicas, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 Sur 1103, Colonia Santiago, 72410 Puebla, Puebla, México. Tel.: +52-222-2299400 x 7503.

Contacto: guillermoenrique.lopez @upaep.edu.mx

Resumen

La ansiedad es la principal enfermedad mental en México, por lo que aquí se investigan vías de administración que resuelvan los problemas de ingesta diaria del medicamento ansiolítico convencional, así como las reacciones adversas a este tipo de tratamientos. En este trabajo se evaluó el efecto ansiolítico de los extractos etanólicos solos y encapsulados en alginato de las especies vegetales toronjil y valeriana sobre el modelo de ratas Long Evans utilizando como vías de administración vía oral y subdérmica mediante las pruebas conductuales ansiolíticas de suspensión de cola y laberinto elevado. Los resultados demostraron que el extracto etanólico de valeriana en las presentaciones y vías de administración propuestas tuvieron mayor efecto sobre la ansiedad y durante más tiempo en dichos modelos animales que el extracto solo y encapsulado de toronjil.

Introducción

El 17% de las personas en México presenta al menos un trastorno mental y una de cada cuatro lo padecerá como mínimo una vez en su vida. Los trastornos mentales afectan el sistema nervioso y se manifiestan en el comportamiento, las emociones y en procesos cognitivos como la memoria y la percepción. Además, afectan la salud física y pueden limitar considerablemente la calidad de vida de quienes los padecen. Los trastornos de ansiedad son los más prevalentes, ya que 1 de cada 5 personas ha presentado algún trastorno relacionado a la ansiedad, teniendo edades de aparición cada vez más tempranas. El costo de los problemas de salud mental se estima entre el 2.5 y el 4.5% del PIB anual para diferentes países. Los tratamientos convencionales para la ansiedad, aunque efectivos incluyen, desde remedios tradicionales y medicamentos herbolarios hasta tratamientos alopáticos costosos y especializados que conllevan frecuentemente efectos secundarios generales y neurológicos que son indeseables para el paciente y su entorno social. Actualmente, de las personas afectadas, sólo una de cada cinco recibe tratamiento. De igual modo, dichos medicamentos suelen ser controlados bajo prescripción médica, lo que obstaculiza la adquisición de los mismos y su subsecuente consumo (SSA, 2018).

La Organización Mundial de la Salud estima que el 80 % de la población que vive en países en desarrollo hacen uso de la medicina tradicional, aprovechando de esta forma las plantas medicinales a su alcance (OMS, 2013). A pesar de estos usos, su conocimiento ha sido poco documentado (Can Ortiz *et al.*, 2016). México es uno de los países con mayor diversidad de plantas en el mundo, ocupa el segundo lugar a nivel

mundial respecto a plantas medicinales (Estrada-Castillon *et al.*, 2013). Más del 90% de nuestra población utiliza la medicina tradicional, por ello, es necesario realizar estudios que garanticen los usos que se les dan a las plantas medicinales y el conocimiento que se tiene de ellas (WHO, 2019).

El género *Agastache* (Lamiaceae), cuyo nombre común es toronjil, consta de 112 especies que se distinguen por ser plantas aromáticas, herbáceas y perennes. La mayoría de las plantas de este género crecen silvestres en el sudeste de Asia y América del Norte y 12 de estas especies son endémicas de México (Sanders, 1987). En el centro de México, la especie *Agastache mexicana* es un recurso terapéutico tradicional (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008) que se usa comúnmente para el tratamiento de varias afecciones gastrointestinales, nerviosas y cardiovasculares (Linares *et al.*, 1988) así como enfermedades culturalmente definidas, como "espanto" y "susto" (Argueta *et al.*, 1994).

Valeriana officinalis, comúnmente llamada valeriana, es una especie herbácea perenne, pertenece a la ahora subfamilia Valerianoideae de la familia Caprifoliaceae. Es una de las principales especies utilizadas para equilibrar el sistema nervioso. Se ha utilizado como sedante, ansiolítico, y calmante en el histerismo, manifestaciones neurasténicas (insomnio, neurosis, calambres abdominales, hiper excitabilidad, etc.), en las alteraciones menopáusicas y como antiespasmódico. Se emplea en trastornos convulsivos con buenos resultados, sola o asociada a anticonvulsivantes (Gleason, 1991).

El alginato es un polisacárido aniónico presente ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas y también es producido por algunas especies bacterianas, los que son sustancias correspondientes a polímeros orgánicos derivados del ácido algínico. Este biomaterial tiene una alta biocompatibilidad con los tejidos orgánicos, es biodegradable y prácticamente inocuo para los modelos en los cuales fue probado (Paredes-Juarez 2013).

En este trabajo se evaluó la interacción de los extractos etanólicos de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* y *Valeriana officinalis* solos, combinados y encapsulados en alginato mediante pruebas en el modelo de ratas Long Evans (*Rattus norvegicus*) como opción terapéutica al tratamiento de la ansiedad.

Materiales y métodos

Material vegetal: las especies vegetales *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* (toronjil) y *Valeriana officinalis* (valeriana) se obtuvieron en el Jardín Botánico "Francisco Peláez Roldán" de la ciudad de San Andrés Cholula, Puebla, México en septiembre de 2017. Se utilizaron las partes aéreas del toronjil y la corteza de la raíz en el caso de valeriana, previamente secadas por aireación a temperatura ambiente y bajo sombra, cortadas en trozos pequeños, para después proceder a la maceración con etanol 96°.

Extractos vegetales: se colocaron las especies de toronjil y de valeriana secas y por separado en un matraz erlenmeyer (6 l) con 5 l de etanol 96° para realizar la extracción por maceración, con agitación ocasional durante 72 horas a temperatura ambiente. El material vegetal macerado se filtró para concentrar el extracto y evaporar el solvente en un rotavapor (HS-2001NS Hahn Shin Scientific CO, Corea del Sur) a una temperatura de 37°C.

Extractos encapsulados: se llevó a cabo la gelificación de los extractos con alginato para formar cápsulas, partiendo de alginato ultra puro. Se preparó el alginato al 4 % diluyéndolo en una solución libre de Ca²⁺ y se lo esterilizó utilizando un filtro de 0.22 um. Se mezclaron los extractos con el alginato a una

concentración de 100 mg/ml para posteriormente gelificar el alginato con el extracto para formar cápsulas en una solución de CaCl₂ 100 mM, y posteriormente se evaluó la liberación de los extractos etanólicos mediante espectrofotometría. Para la evaluación de la liberación, se consideró que las vías de administración empleadas son vía oral y sub-dérmica, por lo que se suspendieron los extractos solos y encapsulados en agua y en HCl 0.1 mM. Se registraron las lecturas a diferentes longitudes de onda, dependiendo de cada extracto. De este modo se registraron cada 15 minutos durante 180 minutos dichas lecturas, por triplicado.

Modelo murino: previa aprobación del Comité para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio de la BUAP, con fecha 19 de abril de 2019, se utilizaron ratas *Long Evans* con peso aproximado de 280-360gr, de edad E90 a las cuales se les alimentó con una dieta estándar (proteínas 24%, lípidos 5% (1% de grasa saturada) y carbohidratos 54% (0.3% fructosa). Se dividieron en 3 grupos (n=3) y se les indujo un estado ansiedad mediante varias pruebas administrándoles 100 mg/Kg de toronjil y valeriana en un periodo no mayor de 60 min., utilizando cápsulas de alginato y diferentes vías de administración evaluando posteriormente su comportamiento (Pilow, 1983). Para evaluar el comportamiento se utilizaron dos pruebas: la de laberinto elevado y la de suspensión de cola. 1- La prueba de laberinto en cruz elevado (LCE) consiste en un laberinto compuesto de 4 brazos en forma de cruz elevados a una altura de 50 cm. El protocolo de experimentación consistió en ubicar la rata en la zona central con la cabeza orientada hacia uno de los brazos cerrados, permitiendo la libre exploración durante 5 min. Posterior a la ejecución de los experimentos, se calcularon diferentes parámetros que se muestran en la sección de resultados (Pilow, 1983). 2- La prueba de suspensión de cola los ratones fueron suspendidos por sus colas durante 6 minutos, y la duración de la inmovilidad se anotó manualmente durante el ensayo. La inmovilidad se define como la ausencia de movimientos de las extremidades o del cuerpo, con la excepción de los causados por la respiración. Se midió la inmovilidad desde el minuto 1 hasta el minuto 6. Se evaluaron los valores desde el segundo hasta el sexto minuto. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron en el período de luz entre las 8:00 a.m. y las 2:00 p.m. Los animales fueron asignados al azar para la prueba (Juszczak,2006).

Análisis estadístico: Se utilizó el programa Graphpad prsim. Versión 5.0

Resultados

De las pruebas realizadas podemos observar que ambos extractos se liberan en mayor concentración estando “solos” que combinados. El extracto de valeriana, “solo y combinado con toronjil” se libera a mayor concentración que el de toronjil tanto en H₂O como en HCl, además, la interacción de ambas plantas afecta directamente la concentración a la cual se liberan. Es importante considerar la “formación de moléculas nuevas” que puedan ser de mayor tamaño, dificultando su liberación de la cápsula.

En la Tabla 1 se comparan los tiempos que registraron las ratas con los extractos de ambas especies vegetales solos y combinados, encapsulados y sin encapsular por vía oral y subdérmica.

Tabla 1.- Prueba de laberinto en cruz elevado.

	Toronjil			Valeriana			Mixto		
Sitios de permanencia en laberinto en cruz elevado	Encp.vía oral	s/e vía oral	Subd.	Encp.Vía oral	s/e vía oral	Subd.	Encp.Vía oral	s/e vía oral	Subd.
BAT	12 seg	39 seg	1 min 05 seg	4 min	6 min	5 min 32 seg	1 min 25seg+45 seg	1 min	7 min inmóvil
BCT	7 min	5 min 50 seg	3 min+4 min	2 min	1 min	19 seg	6 min	6 min	7 min inmóvil
BC-BC	7 min	15 seg	1min+ 2min+ 3min	2 min	10-50 seg	10+9 seg	0 min	6 min	7 min inmóvil
BA-BA	12 seg	20 seg- 19 seg	30 seg	3 min + 1 min	6 min	4 min+4 2 min	0 min	1 min	7 min inmóvil

BAT= Tiempo total brazos abiertos; BCT= tiempo total brazos cerrados; BC-BC= transiciones entre brazos cerrados; BA-BA= transiciones entre brazos abiertos.

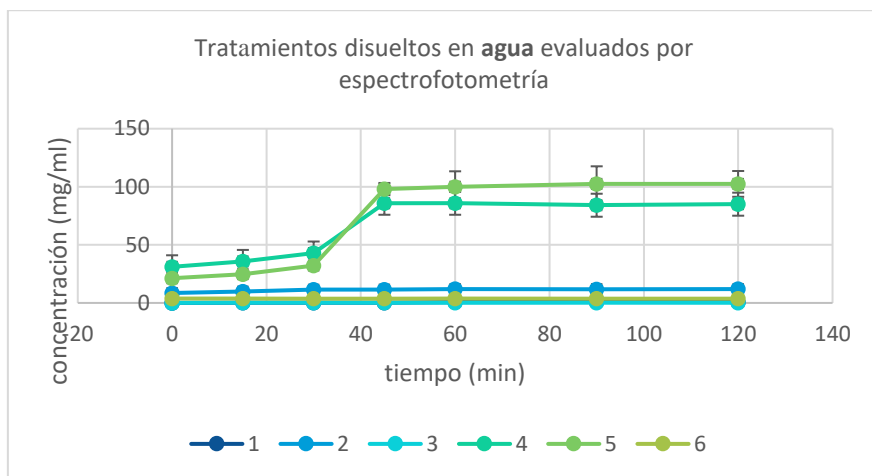
En la siguiente tabla (Tabla 2), se comparan los tiempos que registraron las ratas con los extractos de ambas especies vegetales solos y combinados, encapsulados y sin encapsular.

Tabla 2.- Prueba de suspensión de cola.

	Toronjil			Valeriana			Mixto		
Tiempos de movimiento	Encp.vía oral	s/e vía oral	Sub. Enc.	Encp.Vía oral	s/e vía oral	Subd. Enc.	Encp.Vía oral	s/e vía oral	Subd. Enc.
Tiempo en llegar a la inmovilidad	2 min 36 seg	1 MIN 20 SEG	1 MIN 07 SEG	59 SEG	22 SEG	09 seg	3 MIN 41 SEG	1 MIN 05SEG	2 min 03 seg
Tiempo que permanece inmóvil	1 min resto del tiempo se mueve	1 min 29 seg se mueve	1 min 42 seg	5 min+3 0 seg	4 min+52 seg se mueve	6 minutos 20 seg	se mueve todo el tiempo	se mueve todo el tiempo	se mueve todo el tiempo

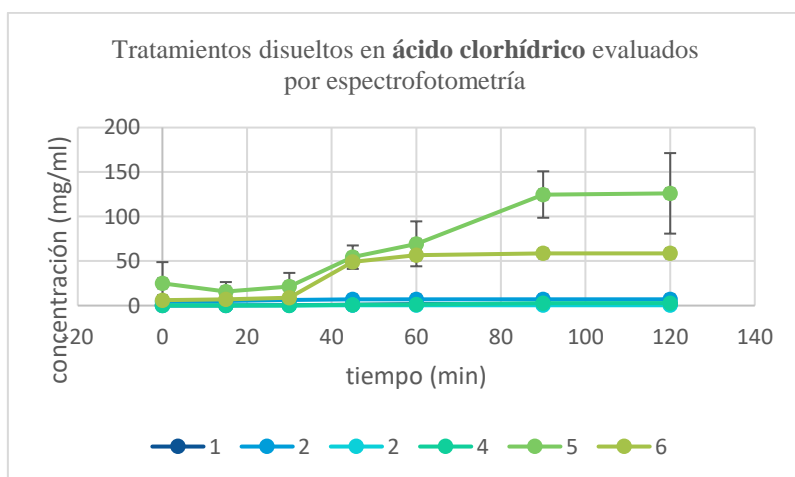
En la siguiente gráfica (Gráfica 1), podemos observar los tratamientos disueltos en agua evaluados por espectrofotometría, en donde se aprecia que conforme pasa el tiempo de evaluación existe una liberación

ascendente del extracto de valeriana sin encapsular, y después del minuto 40 se puede observar una meseta de liberación, siendo este valor el mayor con respecto a los demás extractos.



Gráfica 1.- Tratamientos disueltos en agua evaluados por espectrofotometría. 1= toronjil; 2= toronjil encapsulado; 3=toronjil combinado con valeriana sin encapsular; 4=valeriana sin encapsular; 5=valeriana encapsulado; 6=valeriana con toronjil encapsulado.

Así mismo en la gráfica 2, se muestran los tratamientos disueltos en ácido clorhídrico evaluados por espectrofotometría, en donde se aprecia que conforme pasa el tiempo de evaluación existe también una liberación ascendente del extracto de valeriana sin encapsular, y después del minuto 90 se puede observar una meseta de liberación, siendo este valor el mayor con respecto a los demás extractos.



Gráfica 2.- Tratamientos disueltos en ácido clorhídrico evaluados por espectrofotometría. 1= toronjil; 2= toronjil encapsulado; 3= toronjil combinado con valeriana sin encapsular; 4= valeriana sin encapsular; 5= valeriana encapsulado; 6= valeriana con toronjil encapsulado.

Conclusiones

De los resultados obtenidos podemos concluir que el extracto de valeriana tanto solo como encapsulado presenta un efecto ansiolítico importante en el modelo de ratas Long Evans, pudiendo ser una muy buena

opción como adyuvante para el tratamiento de la ansiedad. Asimismo, estos resultados abren la posibilidad a que posteriormente se puedan realizar más investigaciones utilizando cápsulas de alginato como vehículo que permita una liberación prolongada y constante de una sustancia determinada, reduciendo los inconvenientes actuales en humanos de la dosificación diaria y la vía de administración.

Referencias

- OMS (2013). Traditional Medicine Strategy 2014-2023: Geneva, Switzerland. Consultado el 13 de junio de 2019, en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/
- Can Ortiz G.O.; Cordero W. de J.; Ruenes Morales R. (2016). Médicos tradicionales mayas y el uso de plantas medicinales, un conocimiento cultural que continúa vigente en el municipio de Tzucacab yucatán, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Yucatán. *Teoría y Praxis*. ISSN. 21: 67-89.
- Estrada-Castillón, E.; Villarreal-Quintanilla, J.; Salinas-Rodríguez M. (2013). Usos Tradicionales de los Recursos Naturales, en: Cantú-Ayala et al. (eds.), *Historia Natural del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, México*. UANL-CONANP. México. Pp. 297-323.
- Gleason, H. A. & A.J. Cronquist. 1991. Man. Vasc. Pl. N.E. U.S. (ed. 2) i-910. New York Botanical Garden, Bronx.
- G.A. Paredes-Juarez, et al., The role of pathogen-associated molecular patterns in inflammatory responses against alginate based microcapsules, *J. Control. Release* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.009>
- Secretaría de Salud, Programa de Acción Específico en Salud Mental, 2013-2018
- WHO Global report on traditional and complementary medicine (2019). Medicina tradicional. 134ª Asamblea mundial de la Salud. <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/en/>
- Juszczak G. R. The usage of video analysis system for detection of immobility in the tail suspension test in mice. *PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR*. **85**, 332-338 (2006).