



## Obtención y evaluación de extractos etanólicos de *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* con actividad antiepiléptica.

Alejandro Hurtado<sup>a</sup>, Marcos Jiménez<sup>a</sup>, Yolanda Gómez<sup>a</sup>, Guadalupe Ramírez<sup>a</sup>,

<sup>a</sup>Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Bioprocesos, Laboratorio de Farmacología. alejandroj\_hm@hotmail.com, mjimenez.zuniga@hotmail.com, ygomezpn@hotmail.com, gramirez55120@gmail.com.

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** Como se ha descrito el Toronjil Blanco pertenecen al género de *Agastache*. De los cuales *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* ha sido usado por la medicina tradicional y cuyas actividades farmacológicas contra enfermedades como el susto, bilis y relacionadas con el Sistema Nervioso Central. **METODOLOGÍA.** De *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*. Se limpio y se seco en una estufa a 40 °C por 24 horas. La planta fue molida hasta obtener polvos finos. Se pesaron 5 g y se mezclaron con agua:etanol (1:9), se sometió a sonicación durante 15 minutos para obtener el 95% de los componentes activos, el extracto se filtro para que finalmente el líquido fue concentrado en un Rotavapor. Del polvo se pesaron 5 g de la planta y se añadieron 40 mL de hexano y 40 mL de metanol:agua (9:1). La mezcla se sometió a sonicación durante 15 minutos, se filtro el líquido y se separo el extracto en dos fases una polar (metanol-agua) y otra no polar (hexano). **RESULTADOS.** Del tamiz fitoquímico fueron positivo alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, taninos, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos, saponinas y esteroides. Del experimento de Epilepsia las dosis 200, 300 y 400 mg/ratón mostraron los siguientes resultados en relación con el número de convulsiones 8.3, 8.3 y 17 respectivamente, las convulsiones se midieron con base a la escala de Racine; el tiempo de supervivencia se observo en los segundos 384.3, 183 y 1383.3 respectivamente. **CONCLUSIONES.** En las dosis de 400 mg/ratón se observo mayor supervivencia, pero a dosis de 300 mg/ratón presentó menos convulsiones. Respecto al tamiz fitoquímico la presencia de flavonoides nos indica lo siguiente tal y como lo reportan, los Flavonoides tienen efectos sobre el sistema nervioso central (SNC); es decir, tienen un potencial farmacológico en la terapéutica de los trastornos mentales.

### 1. INTRODUCCIÓN

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que la epilepsia es una alteración neurológica que presenta la más alta tasa de incidencia y de prevalencia en el mundo. Más de 40 millones de personas tienen epilepsia, de las cuales el 80% vive en países en desarrollo. Mientras que la prevalencia en los países desarrollados es de 3-4/1000 habitantes, en los del tercer mundo son de 5-77/1000 habitantes. La epilepsia se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes en plena edad productiva (OMS, 2012).

El género *Agastache* (*Lamiaceae*) consiste de 22 especies; de las cuales las más importantes de este género salvaje son del sureste de Asia y Norteamérica y 12 de las especies se encuentran en la parte endémica de México en donde se utiliza como planta medicinal; las más utilizadas de este género son *Agastache mexicana ssp. mexicana* (toronjil morado) y *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* (toronjil blanco); el nombre del toronjil se le atribuye a su color y sabor de cada una (Reyes Estrada et. al. R. , 2014).



Como se ha descrito los toronjiles pertenecen al género de *Agastache* (*Lamiaceae*) (Reyes Estrada et. al. R. , 2014). Del cual *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* ha sido usado por la medicina tradicional para contrarrestar enfermedades como el susto, la bilis y relacionadas con el Sistema Nervioso Central. (Santillán Ramírez, López Villafranco, Aguilar Rodríguez, & Aguilar Contreras, 2008).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Extracción de los metabolitos secundarios del extracto total.

De *Agastache mexicana ssp xolocotziana* se seco en una estufa a una temperatura máxima de 40 °C por 48 horas. Posteriormente la planta fue molida. Del polvo se pesaron 5 g de la planta y se añadieron 40 mL de hexano y 40 mL de solución metanol-agua (9:1). La mezcla se sometió a sonicación durante 15 minutos, se filtro el líquido y se separo el extracto en dos fases una polar (metanol-agua) y otra no polar (hexano). Para la pruebas de identificación se uso la parte polar con excepción para la prueba de saponinas y esteroides.

De la parte aérea de *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* se sometió a una extracción de los componentes activos, estos fueron extraídos usando una mezcla hidroalcoholica (1:9), se sometió a sonicación durante 15 minutos para obtener el 95% de los componentes activos. El extracto se filtro, mientras que a los sólidos se les sometió a una segunda extracción para obtener el 5% restante. Finalmente el líquido fue concentrado en un Rotavapor.

### 2.2. Pruebas de modelos antiepilépticos en modelos *in vivo*

Para el desarrollo de modelos experimentales de epilepsia generalmente se eligen mamíferos que presentan manifestaciones eléctricas y conductas similares a la epilepsia humana (Fernández Guardiola, 1992). Se probaron los extractos en el siguiente modelo:

- Test de la crisis Pentetrazólica.

La inyección del Pentilentetrazol provoca convulsiones caracterizadas por crisis tónico-clónicas. Se utilizaron lotes de 3 ratones machos de la cepa CD-1, cada lote recibió una dosis de 200 mg/Kg, 300 mg/Kg y 400 mg/ Kg del extracto de *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*, así como un lote de los fármacos control positivo 1 mg/Kg de Diazepam y 90 mg/Kg del control negativo el pentilentetrazol (PTZ).

- Administración del extracto y fármaco

Cada lote formado se administro por vía oral (VO) el extracto de *Agastache mexicana ssp xolocotziana* usando como vehículo tween al 80%, así como el Diazepam; una vez realizado esto se espera 1 hora para posteriormente inyectar por vía intraperitoneal (IP) el Pentilentetrazol (PTZ) el cual se preparo a una concentración de 90 mg/Kg, se diluyo en solución salina. Una vez inyectado el PTZ se comienza a observar las convulsiones del ratón, basándose en una clasificación de la escala de Racine, la cual indicara el número de frecuencias o el nivel de la convulsión que tenga el ratón.



## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Tamiz Fitoquímico

Tabla 1. Resultados generales del tamiz fitoquímico

Metabolito	Reacción	<i>Agastache mexicana</i> <i>ssp. xolocotziana</i>
Alcaloides	Dragendorff	+
	Wagner	-
	Mayer	-
Flavonoides	Shinoda	+-
	Hidróxido de sodio al 10%	-
Cumarinas	Erllich	-
	Hidróxido de amonio	-
Sesquiterpenlactonas	Hidróxido férrico	-
Azúcares Reductores	Fehling	+-
	Benedict	-
Taninos	Cloruro férrico	++
		Ácido gálico
Glicósidos cardíacos	De Legal	+
	De Baljet	+
Glicósidos cianogénicos		+
Quinonas	Ácido sulfúrico	-
Saponinas	Lieberman-Bouchard	+ Triterpenoides
	Rosenthaler	-
Esteroides		+ Triterpenos

NOTA: + presencia, +- poca presencia, - negativo.

Como se observa en la tabla 1 se presentan los metabolitos secundarios encontrados para *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* como cumarinas, quinonas, sesquiterpenlactonas, azúcares reductores, taninos, glicósidos cardíacos y cianogénicos, saponinas de tipo triterpenoides, esteroides de tipo triterpenos, alcaloides y flavonoides de tipo xantonas y flavonas, de estos tres últimos metabolitos, es decir, esteroides, alcaloides y flavonoides son del interés ya que se tienen reporte que se han usado en frecuencia para proteger el Sistema Nervioso Central (Jäger & Saaby, 2011).

### 2.3.2. Test de la crisis Pentetrazólica

En la tabla 2 se muestra el número de convulsiones la media y la DS con n=3 para *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* a dosis de 200, 300 y 400 mg/Kg de peso por ratón, así como el fármaco control diazepam y el Pentilentetrazol (PTZ), mismos que se representan en la figura 1.



Tabla 2. Número de convulsiones para *Agastache mexicana ssp xolocotziana*.

Tratamiento	Número de convulsiones
<i>Agastache mexicana ssp. Xolocotziana</i> 200 mg/kg	8.33±2.51
<i>Agastache mexicana ssp. Xolocotziana</i> 300 mg/kg	8.33±3.51
<i>Agastache mexicana ssp. Xolocotziana</i> 400 mg/kg	17±6.08*
Diazepam	6.83±2.75
Pentilentetrazol	13.66±5.48

Los valores indican la media ± DS de una n=3 por duplicado en cada grupo con  $p < 0.05^*$

Una vez obtenido el número de convulsiones con la escala de Racine, se prosiguió a obtener el tiempo de sobrevivencia de cada lote de estudio teniendo los resultados en la tabla 3 que se muestra a continuación.

Tabla 3. Tiempo de sobrevivencia para *Agastache mexicana ssp xolocotziana*

Tratamiento	Tiempo de sobrevivencia [s]
<i>Agastache mexicana ssp. Xolocotziana</i> 200 mg/kg	384.33±53.05*
<i>Agastache mexicana ssp. Xolocotziana</i> 300 mg/kg	183±81.50*
<i>Agastache mexicana ssp. Xolocotziana</i> 400 mg/kg	1383.33±721.68*
Diazepam	1641.66±274.24
Pentilentetrazol	331±64.52

Los valores indican la media ± DS de una n=3 por duplicado en cada grupo con  $p < 0.05^*$

En la tabla 3 se muestra el tiempo de sobrevivencia al someter a los ratones a la crisis pentretazólica; mismo que nos da un auge para determinar la concentración ideal. Para datos estadísticos se maneja que el tiempo de sobrevivencia es de 1800 s que es igual a los 30 min que no murió el ratón, notando así que los ratones sobrevivieron a la crisis pentretazólica.

En la tabla 2 se observa que para *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* la mayor concentración es de 400 mg/ Kg de peso por ratón, se produjeron más convulsiones de 17±6.08 que a 200 mg/Kg que fue de 8.33±2.51 y 300 mg/Kg de 8.33±3.51 siendo muy similares dichas concentraciones; se deduce que el toronjil blanco a concentración de 400 mg/Kg produce más convulsiones que el fármaco PTZ, descartando esta concentración.

Al comprar el toronjil blanco con el fármaco control diazepam las dosis pequeñas de 200 mg/Kg y 300 mg/Kg se llega a una similitud con dicho fármaco reduciendo convulsiones. Como se observa en la tabla 3 que para *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* el mayor tiempo de sobrevivencia se obtuvo a la dosis mayor de 400 mg/Kg que fue de 1383.33±721.68 (s) casi igual que el diazepam.



#### 4. CONCLUSIONES

- Se determinó por medio del tamiz fitoquímico que el toronjil blanco contiene azúcares reductores, taninos, glicósidos cianogénicos y cardíacos, saponinas, esteroides, alcaloides y flavonoides; siendo estos tres últimos de interés farmacológico.
- Comparando con el tiempo de sobrevivencia y el número de convulsiones para *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*., se comprobó que poseen una gran actividad antiepiléptica, mostrando un valor aceptable de número de convulsiones de  $8.33 \pm 2.51$  comparada con el Diazepam de  $6.83 \pm 2.75$  y un tiempo de sobrevivencia de  $1383.33 \pm 721.68$  (s) semejante al diazepam de  $1641.66 \pm 274.2$  (s).

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández Guardiola, A. (1992). Modelos Experimentales de Epilepsia. Gaceta Médica de México , 343-347.
2. Jäger, A. K., & Saaby, L. (2011). Flavonoids and CNS. molecules , 16, 1471-1485.
3. OMS, O. M. (Octubre de 2012). Organización Mundial de la Salud OMS. Obtenido de La epilepsia: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>
4. Reyes Estrada et. al., R. (21 de enero de 2014). Centra Inervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. Journal of Ethnopharmacology, 153, 98-110.
5. Santillán Ramírez, M. A., López Villafranco, M. E., Aguilar Rodríguez, S., & Aguilar Contreras, A. (2008). Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. Revista Mexicana de biodiversidad , 79, 513-524.