



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA

**“Producción de películas orales con extractos
de *Agastache* como potenciadores de sueño”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
BIOPROCESOS**

PRESENTA

I.B.T. DULCE MARIBEL MARTÍNEZ CORTÉS

DIRECTORES DE TESIS

**DRA. YOLANDA DE LAS MERCEDES GÓMEZ Y GÓMEZ
DR. JOSÉ LUIS CASTREJÓN FLORES**

Ciudad de México, Enero 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 20 del mes de diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

"Producción de películas orales con extractos de *Agastache* como potenciadores de sueño"

Presentada por el alumno:

Martínez
Apellido paterno

Cortés
Apellido materno

Dulce Maribel
Nombre(s)

Con registro:

A	1	6	0	5	4	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

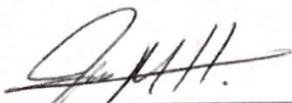
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

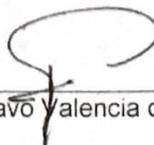
Directores de tesis

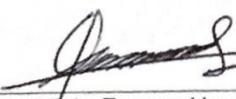

Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez


Dr. José Luis Castrejón Flores


Dr. José Antonio Mondragón Herrera

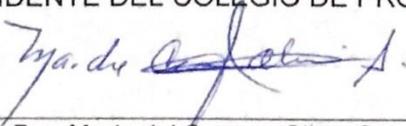



Dr. Gustavo Valencia del Toro


Dra. Marina Olivia Franco Hernández

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dra. María del Carmen Oliver Salvador

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Dulce Maribel Martínez Cortés declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es el producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



I.B.T. Dulce Maribel Martínez Cortés



Dra. Yolanda de las Mercedes

Gómez y Gómez



Dr. José Luis Castrejón Flores

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Dulce Maribel Martínez Cortés, manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "Producción de películas orales con extractos de Agastache como potenciadores de sueño", en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales "Publicación en línea de la tesis en el repositorio institucional" "La Tesis" por un periodo de 2 año contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México, 10 de enero de 2018.

Atentamente



I.B.T. Dulce Maribel Martínez Cortés

RESUMEN

En la actualidad existen fármacos empleados para tratar el insomnio, sin embargo, la mayoría de estos producen efectos adversos cuando se administran de manera continua, por ello se ha recurrido a tratamientos como la fitoterapia ya que es de fácil acceso, bajo costo y presenta menos efectos secundarios, como por ejemplo *Agastache mexicana* que ha sido estudiada por su efecto potenciador de sueño.

El uso de tratamientos fitoterapéuticos requiere una forma de administración que preserve las sustancias de interés, mejore las propiedades farmacocinéticas y asegure la eficacia, por ello, en este trabajo se formularon y caracterizaron películas orales de alginato de sodio al 1.5% como sistema de administración de metabolitos provenientes de *Agastache mexicana mexicana* (*A. m. mexicana*) y *Agastache mexicana xolocotziana* (*A. m. xolocotziana*), los extractos etanólicos se caracterizaron mediante ensayos fitoquímicos, espectroscopia FT-IR y actividad antioxidante, además se reportó que los extractos no presentaron toxicidad en ratones CD1 ($DL_{50} > 5000$ mg/Kg) ni citotoxicidad ($IC_{50} > 20$ µg/mL) en líneas celulares C6 y SH-SY5Y.

Mediante la prueba de potenciación de sueño por pentobarbital se obtuvo que a 100 mg/Kg de ambos extractos se tuvieron tiempos de latencia y de sueño aproximadamente de 2 y 130 min respectivamente, menores a los obtenidos por el fármaco de referencia clonazepam. Además, se comprobó que después del proceso de atrapamiento de los extractos en las películas se preserva la actividad farmacológica manteniendo tiempos de latencia y de sueño similares a los obtenidos por los extractos.

Finalmente se reportó que el efecto farmacológico de las películas con los extractos se vio inhibido por el antagonista GABAérgico Flumazenil, lo que puede indicar que el posible mecanismo de acción involucra la vía GABAérgica.

ABSTRACT

Currently there are drugs used to treat insomnia, however, most of these produce adverse effects when administered continuously, therefore has resorted to treatments such as phytotherapy because it is easily accessible, inexpensive and has fewer side effects, such as *Agastache mexicana*, which has been studied for its sleep-enhancing effect.

The use of phytotherapeutic treatments requires a form of administration that preserves the substances of interest, improves the pharmacokinetic properties and ensures efficacy, therefore, in this work 1.5% sodium alginate oral films were formulated and characterized as an administration system of metabolites of *Agastache mexicana mexicana* (*A. mexicana*) and *Agastache mexicana xolocotziana* (*A. xolocotziana*), the ethanolic extracts were characterized by phytochemical assays, FT-IR spectroscopy and antioxidant activity, and it was reported that the extracts do not present toxicity in CD1 mice (LD50 > 5000 mg / Kg) or cytotoxicity (IC50 > 20 µg / mL) in C6 and SH-SY5Y cell lines.

Through the pentobarbital sleep enhancement test, it was obtained that at 100 mg/kg of both extracts, latency and sleep times were approximately 2 and 130 min respectively, lower times than those obtained by the reference drug clonazepam. In addition, it was found that after the entrapment of the extracts in the films, the pharmacological activity is preserved, maintaining latency and sleep times similar those obtained by the extracts.

Finally, it was reported that the pharmacological effect of the films with the extracts was inhibited by the GABAergic antagonist Flumazenil, which may indicate that the possible mechanism of action involves the GABAergic pathway.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mi mamá y papá que siempre me han brindado cariño y apoyo.

A Jonathan porque es una parte muy importante de mi vida.

A mis amigos porque me motivan a cumplir mis metas.

A todas las personas que han sido parte de mi crecimiento profesional.

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”. Albert Szent-Györgyi

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por el apoyo financiero durante mi posgrado.

Le agradezco al Instituto Politécnico Nacional y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, por brindarme la oportunidad de formarme como maestro en ciencias.

Agradezco a la Universidad Tecnológica de Tecámac por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Agradezco a todos los integrantes del comité evaluador por haberme apoyado a lo largo de la maestría.

Agradezco especialmente a la Dra. Yolanda, por el apoyo que me brindo durante este proceso, por su tiempo, paciencia y consejos.

Gracias Jonathan Alejandro y Marcos por haberme apoyado durante estos dos años.

Gracias Jonathan Vera por apoyarme en todo momento.

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. INTRODUCCIÓN	6
II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	8
2.1 Dormir.....	8
2.1.1 Neurotransmisores involucrados en el sueño.....	9
2.2 Trastornos del sueño	10
2.2.1 Insomnio	11
2.2.2 Tratamiento del insomnio	12
2.3 Fitoterapia e insomnio	16
2.3.1 Agastache mexicana	17
2.4 Formas de dosificación oral.....	22
2.4.1 Películas orales	22
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Estrategia experimental.....	28
5.2 Extracción de metabolitos de <i>A. mexicana</i>	30
5.2.1 Pulverización de las plantas.....	30
5.2.2 Extracción de metabolitos	30
5.2.3 Microfiltración.....	30
5.2.4 Porcentaje de sólidos	31
5.2.5 Tamiz fitoquímico	31
5.2.6 Cuantificación de metabolitos secundarios.	31
5.2.7 Determinación de actividad antioxidante	32
5.2.8 Espectroscopia infrarroja FT-IR	33
5.2.9 Ensayo de toxicidad	33
5.2.10 Ensayo de citotoxicidad.....	33

5.2.11	Prueba de potenciación de sueño con pentobarbital	34
5.3	Elaboración de películas de alginato de sodio.....	35
5.3.1	Preparación y secado de películas	35
5.3.2	Medición de espesor	35
5.3.3	Medición de solubilidad	35
5.3.4	Medición de color	36
5.3.5	Espectroscopia infrarroja FT-IR	36
5.3.6	Microscopia electrónica de barrido	36
5.3.7	Microscopia de fuerza atómica	37
5.3.8	Nanoindentación.....	37
5.4	Elaboración de películas de alginato de sodio con extractos de <i>A. mexicana</i>	37
5.4.1	Preparación y secado de películas	37
5.4.2	Prueba de potenciación de sueño con pentobarbital	38
5.5	Análisis estadístico	38
VI.	<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	39
6.1	Obtención y caracterización de extractos	39
6.1.1	Rendimiento de extracción.....	39
6.1.2	Preliminar fitoquímico	41
6.1.3	Cuantificación de metabolitos secundarios	43
6.1.4	Actividad antioxidante.....	47
6.1.5	Caracterización por FT-IR de los extractos	49
6.1.6	Prueba de toxicidad.....	55
6.1.7	Prueba de citotoxicidad	56
6.1.8	Potenciación del sueño con pentobarbital	59
6.2	Obtención y caracterización de películas de alginato.....	62
6.2.1	Obtención de películas.....	62
6.2.2	Medición de grosor	63
6.2.1	Solubilidad	64
6.2.2	Color	66
6.2.3	Caracterización por FT-IR de películas	67
6.2.4	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de las películas de alginato.....	68
6.2.5	Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)	78
6.2.6	Nanoindentación.....	79

6.3	Obtención y caracterización de películas orales con extractos	80
6.3.1	Obtención de películas	80
6.3.2	Medición de grosor	81
6.3.3	Solubilidad	82
6.3.4	Color	83
6.3.5	Caracterización por FT-IR de películas con extractos.....	84
6.3.6	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de las películas con extractos...	86
6.3.7	Microscopía de Fuerza Atómica.....	89
6.3.8	Nanoindentación.....	91
6.3.9	Potenciación del sueño con pentobarbital de las películas con extractos	92
VII.	CONCLUSIONES.....	95
VIII.	REFERENCIAS.....	96
IX.	ANEXOS.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Rendimientos de extracción	39
Tabla 2.- Preliminar fitoquímico de <i>A. mexicana</i>	42
Tabla 3.- Cuantificación de fenoles	43
Tabla 4.- Cuantificación de taninos	45
Tabla 5.- Cuantificación de flavonoides.....	46
Tabla 6.- Cuantificación de esteroides	47
Tabla 7.- Actividad antioxidante por DPPH	48
Tabla 8.- Actividad antioxidante por ABTS.....	49
Tabla 9.- Resultados de toxicidad	56

Tabla 10.- Valores de las coordenadas L, a y b de las películas.....	67
Tabla 11.-Valores de las coordenadas L, a y b de las películas con extractos	84
Tabla 12.-Valores de las propiedades mecánicas de las películas	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación del sistema excitatorio, donde se encuentran regiones promotoras de la vigilia (A) y del sistema inhibitorio que puede promover el sueño por la inhibición del sistema excitatorio (B).	10
Figura 2.- Representación esquemática del complejo receptor GABA-A	15
Figura 3.- Taxonomía de <i>Agastache mexicana mexicana</i>	19
Figura 4.- Taxonomía de <i>Agastache mexicana xolocotziana</i>	20
Figura 5.- Estructura de los bloques de ácido D-manurónico (M) y L-galurónico (G) de alginato	24
Figura 6.- Etapas en las que se llevó a cabo la metodología	29
Figura 7.- Espectro FT-IR de A. m. xolocotziana.....	50
Figura 8.- Espectro FT-IR de A. m. mexicana	52
Figura 9.- Espectro FT-IR de A. m. xolocotziana y A. m. xolocotziana microfiltrado	53
Figura 10.- Espectro FT-IR de A. m. mexicana y A. m. mexicana microfiltrado	54
Figura 11.-Porcentaje de viabilidad de la línea celular C6 con A. m. mexicana microfiltrado y A. m. xolocotziana microfiltrado	57
Figura 12.-Porcentaje de viabilidad de la línea celular SH-SY5Y con A. m. mexicana microfiltrado	58
Figura 13.- Prueba de potenciación de sueño de A. m. mexicana microfiltrado.....	60
Figura 14.- Prueba de potenciación de sueño de A. m. xolocotziana microfiltrado	61
Figura 15.- Fragmento de película de alginato al 1.5%.....	63
Figura 16.- Grosor promedio de las películas de alginato	64
Figura 17.-Tiempo de solubilidad de las películas de alginato	66

Figura 18.- Espectro FT-IR de la película de alginato de sodio.....	68
Figura 19.- Micrografías película a 1% de alginato	69
Figura 20.- Micrografías película a 1.25% de alginato	71
Figura 21.- Micrografías película a 1.5% de alginato	72
Figura 22.- Micrografías película a 1.75% de alginato	73
Figura 23.- Micrografías película a 2% de alginato	74
Figura 24.- Micrografías película comercial 1.....	76
Figura 25.- Micrografías película comercial 2.....	77
Figura 26.-Imagen topográfica de película de alginato.....	78
Figura 27.- Impresión residual realizadas con una punta Berkovich.	79
Figura 28.-Películas con extractos de <i>A. m. mexicana</i> microfiltrado y <i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	81
Figura 29.-Grosor promedio de las películas <i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado (A) y <i>P. A. m. xolocotziana</i> microfiltrado (B)	82
Figura 30.-Tiempo de solubilidad de las películas <i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado y <i>P. A. m. xolocotziana</i> microfiltrado.	83
Figura 31.-Espectro FT-IR de películas <i>P. A. m. xolocotziana</i> microfiltrado y <i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado.....	85
Figura 32.-Micrografía de <i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado.....	87
Figura 33.-Micrografía de <i>P. A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	88
Figura 34.-Imagen topográfica de <i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado	89
Figura 35.-Imagen topográfica de <i>P. A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	90
Figura 36.- Prueba de potenciación de sueño de <i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado	92
Figura 37.- Prueba de potenciación de sueño de <i>P. Pelicula de A. m. xolocotziana</i> microfiltrado ...	93

I. INTRODUCCIÓN

Dormir es un proceso fisiológico complejo, crucial para el mantenimiento de la homeostasis en mamíferos, la supervivencia y función, sin embargo debido a las tensiones de la sociedad moderna la prevalencia y la tasa de trastornos del sueño están aumentando dramáticamente, siendo la calidad y la duración del sueño nocturno factores capaces de afectar el estado de salud de las personas (Hong *et al.*, 2016; Jeon *et al.*, 2015; Parati *et al.*, 2013), la falta de sueño puede ocasionar efectos cardio metabólicos adversos, incluso se ha demostrado una clara asociación entre el sueño habitual corto y una variedad de resultados de salud a largo plazo, incluyendo enfermedad coronaria, diabetes, obesidad, hipertensión, neumonía y muerte (Ayas *et al.*, 2013).

A nivel farmacológico, comúnmente se han usado los agonistas de los receptores GABA_A, tales como benzodiazepinas y barbitúricos, para tratar el insomnio, sin embargo, estos compuestos ejercen muchos efectos adversos, como pueden ser; tolerancia al fármaco, adicción y deterioro cognitivo, por lo que es necesario la búsqueda de compuestos que presenten propiedades sedativas con menores efectos adversos (Jeon *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). Adicionalmente, los trastornos del sueño son condiciones psiquiátricas frecuentes que han sido tratados con medicamentos botánicos desde la antigüedad, algunas de las plantas más utilizadas para el tratamiento del insomnio son: *Withania somnifera*, *Humulus lupulus*, *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* y *Valeriana officinalis*. La evidencia empírica indica que varias de estas plantas pueden ayudar en el manejo del insomnio reduciendo la latencia del sueño y mejorando su duración. Se ha comprobado la acción inductora de sueño de algunas plantas ampliamente usadas

en México como *Casimiroa edulis*, *Clinopodium mexicanum*, *Valeriana edulis*, y *Agastache mexicana*, esta última popularmente conocida como "toronjil" (Saris *et al.*, 2011; López-Rubalcava & Estrada-Camarena, 2016).

Algunos autores han reportado que la actividad sedante atribuida a *A. mexicana* se debe principalmente a grupos flavonoides como la tilianina, y a algunos aceites esenciales como mentona, limoneno y pulegona (Estrada Reyes *et al.*, 2004, Estrada Reyes *et al.*, 2014; González-Trujano *et al.*, 2015).

Generalmente la vía de administración de estas plantas es oral ya sea en infusiones o decocciones de partes de la planta. Las tendencias recientes están cambiando hacia el diseño y desarrollo de sistemas innovadores de suministro de fármacos, uno de ellos son las películas de desintegración rápida, que tiene numerosas ventajas no solo sobre las tabletas de desintegración rápida convencionales, sino también frente a las fórmulas líquidas, ya que son de fácil transporte, la dosificación es cómoda y precisa, es conveniente para pacientes difásicos que tienen dificultad de ingerir tabletas y capsulas, además no hay necesidad de tomar agua para su administración (Salazar-Aranda *et al.*, 2009; Irfan *et al.*, 2015; Guzmán *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto inductor de sueño de extractos etanólicos de dos subespecies de *Agastache mexicana* y de sus metabolitos contenidos en películas orales que fueron elaboradas a partir de alginato de sodio.

II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 Dormir

Dormir es parte integral de una buena salud y bienestar, es un estado de comportamiento caracterizado por el reposo, la inmovilidad y una percepción reducida de los estímulos del entorno en el que se suspenden la cognición y la conciencia, el ritmo cardiaco se ralentiza, los músculos se relajan, y la puesta en vigilia del cerebro se calma hasta el punto en que una agradable sensación de satisfacción se produce a medida que mentalmente nos alejamos de nuestro entorno tranquilo en la inconsciencia (Pollak *et al.*, 2010).

El sueño normal se caracteriza por una disminución general de la temperatura corporal, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y otras funciones corporales. Los criterios fisiológicos del sueño en el ser humano se evalúan comúnmente con polisomnografía incluyendo la electroencefalografía (EEG), electromiografía (EMG), y electrooculografía (EOG). Las actividades de estos parámetros definen los tres estados comportamentales principales del ser humano, es decir, la vigilia, el sueño con movimientos oculares no rápidos (NREM, non-rapid eye movement) y el sueño con movimientos oculares rápidos (REM, rapid eye movement), los cuales representan tres procesos biológicos básicos cuyas funciones y mecanismos de control son independientes (Rama y Zachariah, 2013; Chokroverty, 2011).

2.1.1 Neurotransmisores involucrados en el sueño

Durante mucho tiempo se ha sabido que los estados de despertar y de sueño se llevan a cabo mediante distintas oscilaciones neuronales sincronizadas, controladas por estructuras en el sistema nervioso, principalmente en tres áreas: el tronco o tallo cerebral, el cerebro anterior basal, y el hipotálamo. Dentro del tallo cerebral e hipotálamo existen varias poblaciones neuronales que promueven la vigilia mediante la acción de diferentes neurotransmisores como noradrenalina, serotonina, histamina y orexina (Figura 1A). Estos sistemas actúan de manera conjunta en la generación y mantenimiento de la vigilia; sin embargo, aunque cada uno contribuye de manera única, la vigilia no se inhibe completamente en la ausencia de alguno de ellos. En contraste, neuronas localizadas en núcleos específicos del hipotálamo y del tallo cerebral están involucradas en la iniciación y mantenimiento del sueño (Figura 1B). Estas neuronas contienen neurotransmisores como acetilcolina y ácido γ -aminobutírico (GABA), las cuales proyectan y modulan la actividad de los núcleos involucrados en la regulación de la vigilia (Mohler, 2010; Antle, 2015; Franco-Pérez *et al.*, 2012).

En la actualidad, es bien sabido que en el hipotálamo, específicamente en el núcleo preóptico medio (NPOM) y en el núcleo preóptico ventrolateral (VLPO), existen neuronas GABAérgicas, las cuales exhiben un patrón específico de descarga elevada durante el sueño profundo y el sueño REM, estas zonas inervan múltiples regiones promotoras de la vigilia, incluyendo el locus coeruleus (LC), rafé dorsal, núcleo tuberomamilar (TMN), núcleo pedunculopontino tegmental/ núcleo laterodorsal tegmental (PPT/LDT) y el área perifornical del hipotálamo lateral (HL). Se ha planteado que estas neuronas GABAérgicas pueden promover el sueño por medio de la inhibición de los sistemas involucrados en la vigilia y los despertares, la inhibición del sistema de excitación mediante el VLPO durante el sueño es fundamental para el mantenimiento y la consolidación del sueño (Franco-Pérez *et al.*, 2012; Fuller *et al.*, 2010).

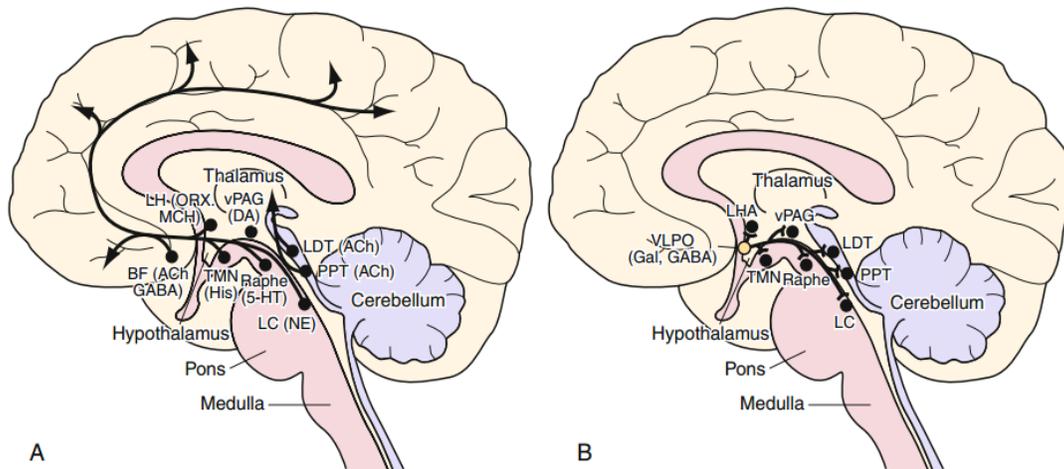


Figura 1.- Representación del sistema excitatorio, donde se encuentran regiones promotoras de la vigilia (A) y del sistema inhibitorio que puede promover el sueño por la inhibición del sistema excitatorio (B).

Núcleo preóptico medio (NPOM), núcleo preóptico ventrolateral (VLPO), locus coeruleus (LC), núcleo tuberomamilar (TMN), núcleo pedunculopontino tegmental PPT, núcleo laterodorsal tegmental (LDT) e hipotálamo lateral (HL).

Fuente; Fuller, 2010

2.2 Trastornos del sueño

Para mantener la vida, se requieren de 3 a 5 horas de sueño por noche, sin embargo, esta cantidad conduce a tener somnolencia, deterioro del rendimiento y funciones productivas reducidas. Para mantener un estado de alerta óptimo a lo largo del día, el requisito varía de un individuo a otro, para algunas personas 5 horas es suficiente, para otras lo son 10 horas, mientras que la media es de 7 a 8 horas para los adultos. Sin embargo, hay enfermedades, medicamentos, estilos de vida y hábitos que pueden afectar negativamente la cantidad y calidad del sueño provocando el deterioro de la calidad de vida, enojo, depresión, disminución de la productividad, absentismo laboral y mayor riesgo de sufrir accidentes en el lugar de trabajo, así como accidentes automovilísticos (Avidan, 2010; Al-Lawati *et al.*, 2009; Hardin, 2013).

La clasificación de los trastornos del sueño es necesaria para discriminar entre los trastornos y facilitar la comprensión de los síntomas, etiología, fisiopatología y tratamiento. La Clasificación Internacional de Trastornos del Sueño en su tercera edición (ICSD-3) publicada en el 2014 por la Academia Americana de Medicina del Sueño, agrupa a los desórdenes del sueño en siete secciones principales: insomnio, trastornos respiratorios relacionados con el sueño, trastornos centrales de la hipersomnolencia, trastornos del ritmo circadiano del sueño, parasomnias, trastornos del movimiento relacionados con el sueño, y otros trastornos del sueño (Sateia y Thorpy, 2017).

2.2.1 Insomnio

El insomnio es el desorden del sueño más común que se caracteriza por una dificultad repetida en la iniciación, duración, consolidación o calidad del sueño que se produce a pesar de contar con la oportunidad adecuada para conciliar el sueño, es un grave problema de salud que afecta a más de un tercio de la población mundial (Doghramji y Choufani, 2010; Wei *et al.*, 2014).

De acuerdo con la clasificación ICSD-3, se pueden distinguir 3 grandes grupos de insomnio: insomnio crónico que dura 3 semanas al mes durante al menos 3 meses consecutivos, no puede explicarse por circunstancias externas, voluntad de no dormir, ni por otros trastornos del sueño; insomnio de corta evolución, es el insomnio, con quejas nocturnas y diurnas de menos de tres meses de evolución, también se le puede denominar insomnio agudo o de ajuste. Con frecuencia se puede detectar un desencadenante y puede coexistir con otros procesos médicos o psiquiátricos; otros tipos de insomnio son los que no pueden incluirse en ninguno de los dos tipos anteriores (Sateia y Thorpy, 2017).

Los pacientes que experimentan insomnio a menudo sufren consecuencias graves en el funcionamiento diurno, incluyendo somnolencia diurna, concentración

deteriorada, problemas de memoria, disminución de la eficiencia, irritabilidad y dificultades para mantener la atención. Estas repercusiones pueden afectar significativamente la calidad de vida de las personas ya que se ha relacionado el insomnio con el aumento del riesgo de hipertensión, diabetes, depresión, dolor, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y muerte. El impacto socioeconómico del insomnio también es significativo, con altas tasas de utilización de la asistencia sanitaria y ausentismo del trabajo, además de que al insomnio con sueño corto se le asocia con hipertensión, diabetes, deterioro del comportamiento neurocomportamental y riesgo de mortalidad. (Villet *et al.*, 2016; Bonnet *et al.*, 2014).

Además, existen diversos estudios que han demostrado una relación entre el insomnio y el estrés oxidativo, estos estudios han demostrado un aumento en el nivel de peróxidos lipídicos, una disminución en el nivel de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa, aumento en los niveles de cortisol urinario y en saliva, de esta manera se puede afirmar que el sueño juega un papel muy importante en la atenuación del estrés oxidativo (Dasgupta & Klein, 2014).

2.2.2 Tratamiento del insomnio

Este trastorno es tratado de manera no farmacológica y farmacológica o con una combinación de ambas. La elección del tratamiento debe basarse cuidadosamente en varios factores como son: los síntomas de los pacientes, las comorbilidades asociadas, el costo y la disponibilidad del tratamiento, los potenciales riesgos y beneficios de las opciones terapéuticas y la preferencia del propio paciente (de Castro-Manglano y Oteo, 2011; Contreras, 2013).

Las medidas no farmacológicas consisten en mejorar todas las circunstancias que rodean el dormir, además de asegurar un ambiente adecuado y óptimo para que el

paciente concilie el sueño. Estas medidas se conocen como higiene del sueño (Avidan y Barkoukis, 2012) entre ellas se encuentran;

1. Acostarse a dormir solo cuando aparezca “sensación de sueño”.
2. Establecer una rutina relajada a la hora de acostarse.
3. Si no se concilia el sueño al cabo de 20-30 minutos, salir de la cama y del dormitorio y realizar alguna actividad tranquila (evitar la televisión, computadora, celulares, etc.). Nunca quedarse dormido fuera de la cama.
4. Establecer horarios regulares de sueño-vigilia. Lo más importante es acostarse y levantarse a la misma hora cada día (incluidos fines de semana y vacaciones). Una vez despierto por la mañana no permanecer en la cama.
5. Limitar las siestas. Lo mejor es no dormir durante el día, no obstante, en el caso de necesitar una siesta que sea de una duración inferior a 15-20 min.
6. No realizar ejercicio físico intenso en las 3-4 horas previas al momento de acostarse.
7. No realizar actividad intelectual en el momento de irse a la cama a dormir.
8. Evitar comidas abundantes durante la noche, la cena debe ser ligera y como mínimo 2 horas antes de acostarse.
9. Evitar bebidas estimulantes (café, té, refrescos, etc.) en las 6 horas antes de acostarse.
10. Evitar las bebidas alcohólicas de 4 a 6 horas antes de acostarse.

Otra medida no farmacológica que cumple un rol primordial en el manejo del Insomnio es la Terapia Cognitiva Conductual (TCC), la que comprende una combinación de tratamientos no farmacológicos como el control de impulsos con estrategias de relajación, restricción de sueño y terapia cognitiva, la cual debe aplicarse por varias semanas, la TCC tiene la ventaja de no tener efectos secundarios, sin embargo, su costo y disponibilidad pueden limitar su efectividad debido a la falta de profesionales entrenados y a la duración de la intervención, la

cual es más larga en comparación con la prescripción farmacológica (Contreras, 2013; de Castro *et al.*, 2012; Navarrete y Aguirre, 2012).

Si estas medidas no se encuentran disponibles o si el paciente todavía tiene insomnio grave después de que se haya intentado la intervención cognitiva conductual, se considera el uso de fármacos como los barbitúricos, benzodiazepinas (BZD) y otros moduladores agonistas de los receptores benzodiazepínicos que actúan en el complejo receptor GABA_A para potenciar la actividad inhibitoria de GABA y promover el sueño (Mendelson, 2010). Las sustancias más usadas en el tratamiento del insomnio son:

- Hipnóticos: Sustancias que producen somnolencia y facilitan la aparición y mantenimiento del estado de sueño, reforzando el efecto inhibitorio del ácido gamaamino-butírico (GABA), el cual se cree que es uno de los principales neurotransmisores que promueven el dormir. El sitio neuroanatómico de acción de los hipnóticos no ha sido completamente dilucidado, sin embargo, entre los sitios importantes para los agentes que actúan en el receptor GABA-A (Figura 2) se encuentran el NPOM y el VLPO del hipotálamo. Se recomienda su uso cuando no es factible eliminar la causa específica del insomnio. Sus principales efectos adversos incluyen: sedación diurna, disfunción cognitiva, incoordinación motora, ataxia, vértigo. Su uso prolongado puede producir dependencia (Kryger *et al.*, 2012; Mendelson, 2010).
- Antidepresivos: Los antidepresivos con efecto sedante son usados frecuentemente en el insomnio asociado a depresión, ansiedad y dolor crónico. Sus principales efectos adversos son el aumento de peso, aumento de ideas suicidas, toxicidad cardíaca e hipotensión ortostática (Roth y Roehrs, 2010).
- Anticonvulsivantes: Algunos anticonvulsivantes se han utilizado en el manejo del insomnio por sus efectos sedantes, especialmente aquellos cuyo

mecanismo de acción se relaciona con la neurotransmisión GABA. Los más utilizados son la Gabapentina y la Pregabalina, que aumentan el sueño NREM. Están especialmente indicados en pacientes con cuadros de ansiedad, con cuadros de dolor crónicos, o con fibromialgia, asociados a insomnio. Sus principales inconvenientes son el aumento de peso, la sedación diurna, vértigo y disfunción cognitiva (Sullivan, 2010; Roth y Roehrs, 2010).

- Melatonina; La Melatonina es una hormona producida por la glándula pineal, cuya síntesis aumenta con la oscuridad. Esta hormona regula los ciclos de sueño-vigilia y su producción disminuye con la edad. Su indicación principal es el Insomnio secundario a alteraciones del ritmo circadiano. Su eficacia es bastante menor en Insomnio primario, por su vida media corta (Sateia, 2010).
- Otros tratamientos: Los antipsicóticos, antihistamínicos y sustancias naturales, constituyen una amplia variedad de fármacos utilizados para el tratamiento del insomnio (Sullivan, 2010; Mohler, 2015).

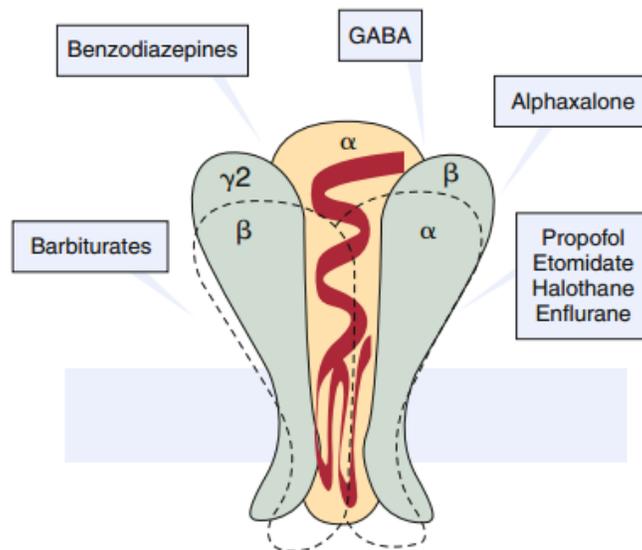


Figura 2.- Representación esquemática del complejo receptor GABA-A

Fuente: Mendelson, 2010

2.3 Fitoterapia e insomnio

De acuerdo con la European Scientific Cooperative On Phytotherapy (ESCOP), la fitoterapia o los medicamentos a base de plantas son "medicamentos que contienen como ingredientes activos, sólo plantas, partes de plantas, materiales vegetales, o sus combinaciones, ya sea en estado crudo o procesado" (Kumar, 2016).

Los trastornos del sueño han sido tratados con medicamentos botánicos desde la antigüedad. La evidencia empírica indica que algunas plantas pueden ayudar en el manejo del insomnio reduciendo la latencia del sueño y mejorando su duración posiblemente a través de interacciones con el ácido glutámico descarboxilasa (GAD), o a través de la modulación de los receptores GABA-érgicos y del 5-HT (Leach y Page, 2015).

Algunos de los compuestos químicos producidos por las plantas son productos del metabolismo primario o transformaciones químicas fundamentales para la existencia de la planta. Sin embargo, las plantas difieren de otras formas de vida en la gran diversidad de los productos químicos adicionales producto del metabolismo secundario denominados de manera general como principios activos dentro de los cuales se encuentran: los aceites esenciales, taninos, cumarinas, flavonoides, saponinas, alcaloides, glucósidos y poliaminas (Kumar, 2016).

Se han identificado más de 4000 variedades diferentes de flavonoides, y se clasifican en seis grupos principales: flavonoides, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, catequinas y antocianinas, de acuerdo con sus diferentes estructuras moleculares. Después de la ingestión, la mayoría de los flavonoides se metabolizan en el tracto gastrointestinal y el hígado, se absorben en el torrente sanguíneo y pueden alcanzar el SNC al cruzar la barrera hematoencefálica (Matias *et al.*, 2016).

De acuerdo con Johnston (2015), algunos flavonoides interactúan con muchos sistemas neurotransmisores incluyendo adenosina, dopamina, GABA y glicina. Los flavonoides pueden actuar en los receptores ionotrópicos del neurotransmisor inhibitorio GABA de muchas maneras. Pueden actuar como moduladores alostéricos positivos, negativos y neutralizantes, así como agentes que modulan otros agonistas alostéricos (Hanrahan *et al.*, 2015).

La Organización Mundial de la Salud estimó que el 80% de la población de los países en desarrollo depende de las medicinas tradicionales, en su mayoría drogas vegetales, para sus necesidades de atención primaria de salud (Alamgir, 2017).

México es un país con una flora muy diversa, y muchas de sus culturas indígenas tienen una extensa farmacopea de plantas medicinales, conocimiento que ha pasado a través de generaciones. Durante los últimos años, ha habido un renacimiento de interés popular en plantas utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Entre las plantas a las que se les han comprobado efectos inductores de sueño se encuentran: *Casimiroa edulis*, *Clinopodium mexicanum*, *Valeriana edulis* y *Agastache mexicana*, esta última conocida popularmente como toronjil (López-Rubalcaba y Estrada-Camarena, 2016).

2.3.1 Agastache mexicana

El género *Agastache* (*Lamiaceae*) 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 (Estrada-Reyes *et al.*, 2014). En México, hay dos subespecies: *Agastache mexicana ssp. mexicana* y *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* (figuras 3 y 4) conocidos en la medicina tradicional como "toronjil morado" y "toronjil blanco", respectivamente y se usan en la medicina tradicional mexicana para el alivio de las condiciones de "susto" y

"nervios". Estas dos subespecies se distinguen fenotípicamente por la forma de las hojas, el color de las flores y su sabor. Sin embargo, no hay preferencia de uso entre ellos en la población (López-Rubalcaba y Estrada-Camarena, 2016; Estrada-Reyes *et al.*, 2004). En México, se le denomina comúnmente "toronjil" y debido a su gran demanda, se cultiva en varias regiones como la Ciudad de México y los estados de Hidalgo, México, Morelos, Puebla y Veracruz. Se utiliza para tratar ansiedad, insomnio y trastornos cardiovasculares, así como reumatismo, dolor de estómago y afecciones gastrointestinales. Las inflorescencias se prefieren para aliviar el dolor y las partes aéreas para producir actividad sedante (González-Trujano *et al.*, 2015).

En estudios preclínicos en ratones, se analizó el efecto ansiolítico de los extractos acuosos de las dos subespecies de *Agastache mexicana* (*ssp. mexicana* y *ssp. xolocotziana*). Ambas redujeron la ansiedad de una manera similar al diazepam, siendo el segundo más potente, además no se tuvieron efectos tóxicos, lo que sugiere que el consumo de estas especies no implica un riesgo significativo para la salud (Estrada-Reyes *et al.*, 2014).

En el 2015 González-Trujano *et al.*, evaluaron la actividad hipnótica de uno de los principales metabolitos activos, identificado como tilianina comparándolo con extracto metanólico. En este trabajo encontraron que no hubo cambios en el tiempo de latencia, sin embargo, el tiempo de sueño fue mayor con el extracto, sugiriendo un sinergismo entre los diferentes compuestos del extracto.

Además de tilianina se ha reportado la presencia de varios flavonoides en los extractos acuosos y orgánicos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana*, entre los que se encuentran luteolina, diosmetina, acacetina y gardenina (Estrada-Reyes *et al.*, 2014).

- *Agastache mexicana mexicana*

Es una hierba perenne, de 40 a 100 cm de altura, con rizomas rastreros, las hojas son en forma ovado-lanceolada con 4.4-6.3 cm de largo y 2.1-2.5 cm de ancho ápice

atenuado y base redonda. El tallo es cuadrangular en sección transversal; la parte basal y media del tallo es de color morado. La cutícula es lisa, pero en los ángulos se observa crenada, con un grosor de 4-6 μm . Inflorescencia en racimos terminales interrumpidos; flores bisexuales, zigomorfas, cáliz sin sépalo, de color rojizo–morado, cilíndrico, 5-dentado, ligeramente bilabiado, de 6.5 a 11.5 mm de largo; corola simpétala, de color rojizo–morado (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

REINO	Plantae
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Lamiaceae
SUBFAMILIA	Neopetoideae
GENERO	Agastache
ESPECIE	mexicana
SUBESPECIE	mexicana



Figura 3.- Taxonomía de *Agastache mexicana mexicana*

Fuente: Santillán-Ramírez, *et al.*, 2008

- *Agastache mexicana xolocotziana*

Es una hierba perenne, de 1.5 m de altura, con rizomas rastreros, delgados y esparcidos, tallos erectos, ramificados, cuadrangulares, con vellosidades o pelos blancos, las hojas son en forma ovado-lanceolada con 4.6 a 6.2 cm de largo y 1.7 a 3 cm de ancho, ápice atenuado y base redonda. Inflorescencia en racimos terminales interrumpidos, flores bisexuales, zigomorfas, cáliz sin sépalo, de color verde a blanco, cilíndrico, 5-dentado, ligeramente bilabiado, de 7 a 8 mm de largo, corola simpétala, de color blanco, tubulosa, infundibuliforme, limbo bilabiado, el

labio superior plano, el inferior trilobulado con vellosidades sobre su superficie sección transversa (Santillán *et al.*, 2008; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

REINO	Plantae	
CLASE	Magnoliopsida	
SUBCLASE	Asteridae	
ORDEN	Lamiales	
FAMILIA	Lamiaceae	
SUBFAMILIA	Nepetoideae	
GENERO	Agastache	
ESPECIE	mexicana	
SUBESPECIE	xolocotziana	

Figura 4.- Taxonomía de *Agastache mexicana xolocotziana*

Santillán-Ramírez, *et al.*, 2008

Históricamente, los seres humanos han sido conscientes de las funciones medicinales de los recursos naturales, especialmente de las plantas y muchos medicamentos se han desarrollado a partir de ellas, como por ejemplo los taxanos provenientes del compuesto paclitaxel o taxol obtenido de *Taxus brevifolia* (usado como antineoplásicos), las campotecinas obtenidas de *Camptotheca acuminata* (usado como anticancerígeno), digoxina obtenida de *Digitalis lanata* (usado como cardiotonio), entre otros (Konishi, 2014; Nama *et al.*, 2017). El desarrollo de fármacos convencionales y, hasta cierto punto, la farmacognosia tradicional (estudio de fármacos derivados de la naturaleza) usa a menudo principios activos individuales aislados a partir de material vegetal. En algunos casos esto es altamente eficaz, sin embargo, en ciertos casos, los intentos de aislar los principios activos de los extractos de plantas pueden ser en última instancia, contraproducentes ya que los efectos biológicos generales dependen a menudo de

interacciones sinérgicas y polivalentes entre los componentes de la planta (Sarris *et al.*, 2011).

El uso de medicinas derivadas de plantas es muy diverso e incluye, compuestos puros, plantas medicinales usadas tradicionalmente como infusiones (tisanas o tés), tinturas, partes de las plantas cortadas o pulverizadas, extractos no estandarizados, con poca información de calidad y, por lo tanto, sin datos acerca de la eficacia clínica y los efectos farmacológicos.

Los medicamentos que usamos comúnmente deben ser formulados de manera que se facilite su administración. Por ejemplo, los medicamentos que se deben poner en forma líquida no solo deben disolverse, sino que deben permanecer en solución; si deben ser emulsionados, se debe usar el agente emulsionante adecuado, además de otros problemas en la preparación, ya que algunos medicamentos son tan amargos que son imposibles de tomar, y otros irritan tanto que tomarlos podría dañar la boca.

Existe una gran variedad de preparaciones farmacéuticas que se utilizan de manera convencional para facilitar la administración y aplicación de fármacos como: píldoras, comprimidos, capsulas, emulsiones, etc., (Salazar-Aranda *et al.*, 2009; Modell y Place, 2013). Sin embargo, las tendencias recientes están cambiando hacia el diseño y desarrollo de sistemas innovadores de suministro de fármacos, uno de ellos son las películas de desintegración rápida, que tiene numerosas ventajas no solo sobre las tabletas de desintegración rápida convencionales, sino también frente a las fórmulas líquidas, ya que son de fácil transporte, la dosificación es cómoda y precisa, es conveniente para pacientes disfásicos que tienen dificultad de ingerir tabletas y capsulas y además no hay necesidad de tomar agua para su administración (Irfan *et al.*, 2015; Guzmán *et al.*, 2014).

2.4 Formas de dosificación oral

La vía oral sigue siendo la ruta perfecta para la administración de agentes terapéuticos porque el bajo coste de la terapia y la facilidad de administración conducen a altos niveles de cumplimiento por parte del paciente. Las formas de dosificación oral son más populares que otras formas de dosificación debido a la facilidad de administración, dosificación precisa, automedicación, evitación del dolor, etc. (Bhattarai & Gupta, 2015).

El desarrollo de un producto farmacéutico para la administración oral, independientemente de sus formas físicas (sólidos, semisólidos, o forma de dosificación líquida oral) implica grados variables de optimización de la forma de dosificación (Chaudhary *et al.*, 2013). En literatura existen varios procesos de fabricación y formulación de fármacos, algunos de los que ya se encuentran disponibles en el mercado farmacéutico son; liofilizados orales (Zofran; ondasetrón indicado para prevenir y tratar náuseas y vómito), comprimidos orodispersables (Allegra; fexofenadina indicada como antihistamínico en rinitis alérgica y urticaria), gránulos orodispersables (Ibupril; ibuprofeno indicado analgésico, anti inflamatorio y antipirético) y películas orodispersables (Benadril; difenhidramina indicado en el tratamiento de alergias) (Slavkova & Breitreutz, 2015).

2.4.1 Películas orales

Se han utilizado varios términos para designar una nueva forma de dosificación farmacéutica, película oral, película delgada, oblea, tira oral, película delgada oral y película soluble oral, que describen una película delgada que se disuelve fácilmente en la cavidad oral (Zhao *et al.*, 2015). Los sistemas de administración oral de rápida disolución son formas de dosificación sólidas, que se desintegran o disuelven aproximadamente en 1 min cuando se coloca en la boca sin la necesidad de beber

o masticar (Cilurzo *et al.*, 2008). Estas películas representan una alternativa a los comprimidos, cápsulas, jarabes y otra formulación principalmente para pacientes pediátricos y geriátricos, que experimentaban dificultades para deglutir formas de dosificación sólidas tradicionales (Chaudhary *et al.*, 2013).

Las películas orales son matrices poliméricas esencialmente complejas que pueden utilizarse eficazmente como plataformas de liberación de fármacos. Estas matrices poliméricas pueden estar compuestas de varios componentes con el fin de conseguir plataformas de suministro de fármacos bien diseñadas, pero usualmente los polímeros hidrófilos son su núcleo principal. Además, el conocimiento de los conceptos básicos de los polímeros, como la química, las propiedades y los tipos puede ser crítico para desarrollar nuevos o mejorar los sistemas convencionales de administración de fármacos (Borges *et al.*, 2015).

Las principales ventajas de las películas orales frente a las capsulas, tabletas, o jarabes son su sabor, textura, tamaño, rápida solubilidad, liberación inmediata del compuesto activo, fácil transporte además de que no se requiere ingerir líquidos para su consumo (Castro *et al.*, 2015). La fabricación de películas orales generalmente se basa en tecnologías establecidas, como las técnicas de disolución casting y extrusión de fusión en caliente, aunque nuevas técnicas se están desarrollando y evaluando, tales como la tecnología de impresión. (Silva *et al.*, 2015)

El método de disolución casting consiste esencialmente en una mezcla acuosa o hidroalcohólica de excipientes, medicamento y sustancia (s) que se disuelven sobre una superficie, se seca, y se corta en un tamaño conveniente. Por otra parte, la extrusión de fusión en caliente consiste simplemente en la formación de una mezcla adecuada de polímero (s), excipientes, fármaco y otra (s) sustancia (s) en una película por fusión de todos los componentes. Ambas técnicas permiten la preparación de las películas con buenas características, pero en general el método de disolución casting es el más utilizado, debido probablemente al equipo especial requerido y los altos costos asociados con el método de extrusión por fusión en caliente (Borges *et al.*, 2015).

La funcionalidad de las películas dependerá en gran medida de las características físicas y químicas de los biopolímeros seleccionados, los materiales que generalmente se utilizan para la elaboración de películas son proteínas, polisacáridos y lípidos o combinaciones de estos (Ozdemir y Floros, 2008).

En los últimos años, debido a la búsqueda de la química verde y los materiales respetuosos con el medio ambiente, ha resurgido el interés en el uso de polisacáridos como fuente de materiales poliméricos no tóxicos, biocompatibles, biodegradables y solubles en agua, haciendo que estos compuestos sean adecuados para diferentes aplicaciones. Varios polisacáridos, incluyendo almidón, pectina, celulosa, quitina y quitosano, han encontrado usos potenciales en los campos farmacéutico y biomédico (Sibaja *et al.*, 2015).

Los alginatos son otro tipo de polisacáridos que se han utilizado ampliamente por sus buenas características para formar películas (Lin y Zhao, 2007). Los alginatos son biopolímeros estructurales extraídos de las algas marinas pardas y están compuestos de unidades de (1-4) β -D-manurato (M) y (1-4) α -L-galuronato (G) (Ostrowska y Gierszewska, 2009). Estas unidades están arregladas en bloques G, bloques M y secuencias alternadas de bloques G-M formando la estructura polimérica (figura 5); el arreglo secuencial dependerá de diferentes factores tales como la especie, edad o partes de las algas de donde es obtenido el material (Rhim, 2004; Da Silva *et al.*, 2009; Ashikin *et al.*, 2010).

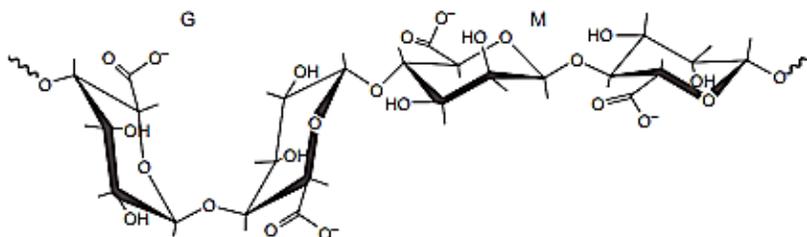


Figura 5.- Estructura de los bloques de ácido D-manurónico (M) y L-galurónico (G) de alginato

Existen algunos trabajos en los que se han desarrollado y caracterizado películas orales de desintegración rápida en las que se incluyen compuestos naturales como extractos de plantas.

Entre los trabajos que se pueden encontrar en literatura está el de Daud *et al.*, (2011) en el que incluyeron un extracto de *Zingiber officinale* en películas de hidroxipropil metilcelulosa, maltodextrina, pululan y polivinil alcohol. En el 2015 Borges & De Carvalho, elaboraron y caracterizaron películas de gelatina y colágeno hidrolizado en las que, adicionaron un extracto etanólico de propóleo. Por otra parte, Visser *et al.*, (2017) incorporaron extractos de cinco plantas medicinales de indonesia (*Lagerstroemia speciosa*, *Phyllanthus niruri*, *Cinnamomum burmanii*, *Zingiber officinale* and *Phaleria macrocarpa*), en películas a base de hidroxipropil metilcelulosa con carbomero 974P y en películas de hidroxipropilcelulosa. Otro trabajo es el de Tedesco *et al.*, (2017) quienes formularon películas a base de gelatina e hidroxipropil metilcelulosa con el objetivo de incorporar un extracto de piel de cacahuate como vehiculo de compuestos fenólicos.

III. JUSTIFICACIÓN

En promedio los seres humanos no podemos prescindir del sueño por más de algunos días (2 o 3), sin embargo, en la sociedad contemporánea no se tiene consideración de la importancia que tiene el sueño ya que en general dormimos 2 horas menos que hace 40 años y esto incide en forma negativa en una infinidad de procesos fisiológicos. Por ejemplo, el insomnio que es el desorden del sueño más común afecta los niveles de cortisol, la frecuencia cardiaca/activación simpática, niveles de glucosa, tasa metabólica, puede provocar procesos de inflamación y déficit del sistema inmune. Este desorden es tratado de manera farmacológica y no farmacológica o con una combinación de ambas. Una de las desventajas de los fármacos empleados es que pueden presentar efectos secundarios como vértigo, pérdida de la memoria reciente, reacciones de hostilidad, depresión o reacciones mediadas por el sistema inmune.

Adicionalmente, en todo el mundo se han utilizado varias plantas como inductores del sueño. En México, *Agastache mexicana* es ampliamente utilizado como planta medicinal en el tratamiento del insomnio ya que se ha demostrado la efectividad de dos de sus subespecies *A. m. mexicana* (toronjil morado) y *A. m. xolocotziana* (toronjil blanco) mediante pruebas como la potenciación de sueño por pentobarbital. Estos extractos son normalmente administrados por vía oral como resultado de infusiones de diversas partes de la planta. Sin embargo, su administración contenida en películas orales de desintegración rápida representa una ventaja ya que se disuelven fácilmente en la cavidad oral liberando inmediatamente los metabolitos de la planta.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo radica en el desarrollo de un producto con actividad comprobada en el tratamiento del insomnio basado en *Agastache*, como alternativa a los productos farmacéuticos comerciales.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Elaborar una película oral como vehículo de metabolitos extraídos de *Agastache mexicana mexicana* y *Agastache mexicana xolocotziana* para evaluar su efecto potenciador de sueño.

4.2 Objetivos específicos

- Extraer y caracterizar metabolitos de dos subespecies de *Agastache mexicana*.
- Realizar pruebas *in vivo* e *in vitro* que demuestren la toxicidad y citotoxicidad de los extractos.
- Comprobar el efecto potenciador de sueño de los extractos.
- Elaborar y caracterizar películas orales de alginato de sodio con extractos de *Agastache mexicana*.
- Comprobar el efecto potenciador de sueño de los extractos y evaluar el posible mecanismo de acción de los metabolitos contenidos en las películas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

La metodología se dividió en tres etapas, como se muestra en la figura 6. En la etapa 1 se llevó a cabo la extracción etanólica de *A. m. xolocotziana* y *A. m. mexicana* a partir de planta seca y pulverizada, los extractos obtenidos se microfiltraron y se caracterizaron mediante la cuantificación de metabolitos de interés, determinación de actividad antioxidante y espectroscopia infrarroja. Además de determinar la toxicidad y citotoxicidad de los extractos microfiltrados, se realizó la prueba de potenciación de sueño para evaluar su actividad farmacológica.

La segunda etapa consistió en la elaboración de películas orales de alginato de sodio, las cuales fueron caracterizadas mediante la medición de grosor, determinación de color, tiempo de solubilidad, espectroscopia infrarroja, microscopia electrónica de barrido, microscopia de fuerza atómica y nanoindentación.

Finalmente, la tercera etapa se refiere a la elaboración de películas orales con extractos de *Agastache mexicana*, estas películas fueron caracterizadas de la misma forma que las de la etapa dos, además, se llevó a cabo la prueba de potenciación de sueño de las películas con los extractos de la misma manera que en la primera etapa.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

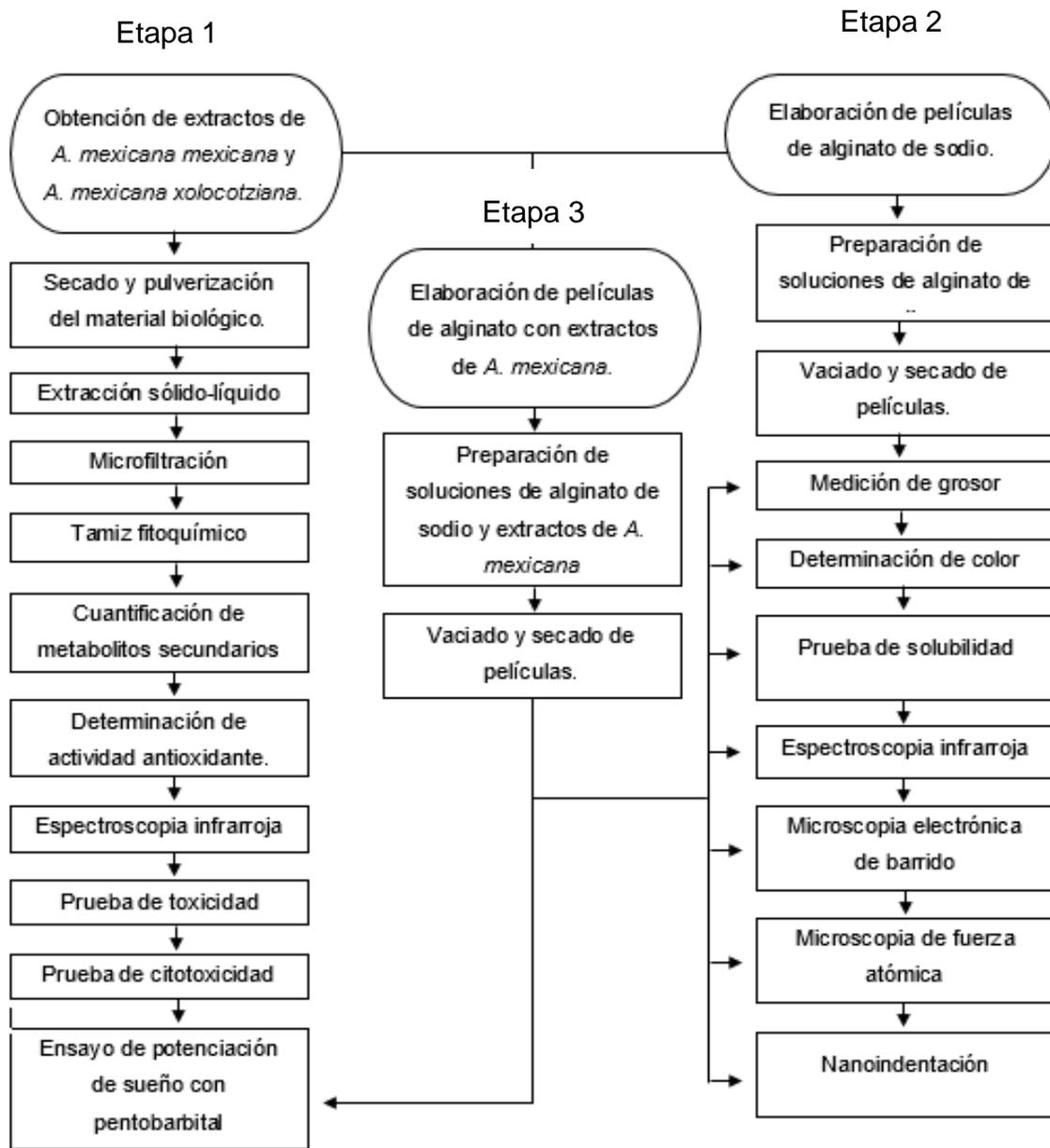


Figura 6.- Etapas en las que se llevó a cabo la metodología

5.2 Extracción de metabolitos de *A. mexicana*

5.2.1 Pulverización de las plantas

Las plantas *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*. (*A. m. xolocotziana*) y *Agastache mexicana ssp. mexicana* (*A. m. mexicana*) fueron adquiridas en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. Las partes aéreas (tallo, flor y hoja) de *A. m. xolocotziana* y *A. m. mexicana* se limpiaron y se secaron en un horno a temperatura máxima de 40 °C durante 48 horas, posteriormente las plantas secas fueron pulverizadas de acuerdo con el método modificado de Ibarra-Alvarado *et al.*, (2010).

5.2.2 Extracción de metabolitos

Se llevó a cabo una extracción sólido líquido de acuerdo con la metodología modificada de Hernández-Abreu *et al.*, (2011), colocando 20 g de los polvos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* en 250 mL de etanol. Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 24 horas y posteriormente los extractos se hicieron pasar por papel filtro para remover los sólidos.

5.2.3 Microfiltración

Se realizó de acuerdo con lo propuesto por dos Santos *et al.*, (2016), empleó un módulo de filtración Mintrech (modelo Fiber flow) de 0.05 micras, con un sistema compuesto por un motor pump drive (modelo 7591-50), un cabezal (modelo Easy Lead 77-601-10) y un controlador (modelo 7591-50). Se microfiltraron los extractos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* como un tratamiento para eliminar los sólidos en suspensión, polisacáridos, restos celulares y otros materiales presentes en la solución, que generalmente no se pueden eliminar mediante filtración convencional, esto ayuda a formular películas con texturas lisas, además, se puede considerar como un sistema de esterilización

5.2.4 Porcentaje de sólidos

Para determinar el porcentaje de sólidos se siguió la metodología modificada de Sun et al., (2014) en la que se colocaron 5 g de muestra en una termo balanza Sartorius Mark 3, en condiciones de 100 °C y una pendiente de 0.001 %IW.

5.2.5 Tamiz fitoquímico

Los ensayos cualitativos se realizaron de acuerdo con el manual de prácticas de productos naturales de Valencia y Garín (2010), tanto para el extracto total como para el clarificado.

Se pesaron 20 mL de cada extracto y se añadieron 40 mL de hexano y 40 mL de solución metanol-agua (9:1). Se realizó una separación del extracto en dos fases una polar (metanol-agua) y otra no polar (hexano). La fase polar se empleó para alcaloides, flavonoides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, azúcares reductores, taninos, quinonas, glicósidos cardíacos y cianogénicos, mientras que la fase no polar se utilizó para las pruebas de saponinas y esteroides.

5.2.6 Cuantificación de metabolitos secundarios.

Fenoles

Para la cuantificación de fenoles totales se determinó por el método descrito por Singleton & Rossi, (1965). Se realizó una curva tipo como se muestra en el anexo a concentraciones de 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 y 0.0156 mg/mL de ácido gálico.

Flavonoides

Para la cuantificación se realizó por el método descrito por Chang *et al.*, (2002). Con una curva tipo de 5, 10, 20, 30 y 40 µg/mL de quercetina.

Taninos

Se realizó la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Makkar et al., (1993). Se realizó una curva tipo como se muestra en el anexo a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL de ácido tánico.

Esteroides

Para la cuantificación de esteroides totales con una modificación del método descrito por (Galindo *et al.*, 1989). Se realizó una curva tipo como a concentraciones de 0.097, 0.195, 0.390, 0.781, 1.562 y 3.125 mg/mL de colesterol.

5.2.7 Determinación de actividad antioxidante

Actividad antioxidante por el método del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS)

Se realizó la cuantificación de la actividad antioxidante por el método de ABTS descrita por (Re et al., 1999). El radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (± 25 °C) y en oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS se tomó 1 mL y se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.01) a 734 nm. Todo el proceso ocurre en total oscuridad.

Actividad antioxidante por el método del 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Se realizó la cuantificación de la actividad antioxidante por el método de DPPH modificado de (Brand-Williams, *et al.*, 1995) el cual se basa en la reducción de la absorbancia a 517 nm del radical DPPH. Todo el proceso ocurre en total oscuridad.

5.2.8 Espectroscopia infrarroja FT-IR

El extracto total y el extracto clarificado se analizaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, de acuerdo con lo reportado por Bhadane y Patil (2017) con algunas modificaciones, se utilizó un espectrómetro Spectrum Two de la marca Perkin Elmer con el módulo ATR, las lecturas se tomaron en el rango de 4000 a 500 cm^{-1} .

5.2.9 Ensayo de toxicidad

La determinación de la dosis letal 50 (DL_{50}) por sus siglas, de los extractos se determinará por el método modificado de Lorke (1983), se dividirá el experimento en dos fases experimentales:

En la primera fase de experimentación el extracto se administrará vía oral a dosis de 250, 500, 750 y 1000 mg/Kg a grupos de 3, los animales serán observados durante las primeras 2 horas para detectar signos y síntomas de toxicidad, posteriormente se observaron a las 24, 48 y 96 horas.

En la segunda fase experimental se aumentarán las dosis a 2500 y 5000 mg/Kg se administrarán nuevamente por vía oral a grupos de 3, observándolos durante las primeras 2 horas para detectar signos y síntomas de toxicidad, posteriormente se observarán a las 24 horas, todos los extractos en todas las concentraciones se disolverán en tween al 80%.

5.2.10 Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo se realizó con dos líneas celulares de sistema nervioso central, la línea celular C6 glial y la línea celular SH-SY5Y bajo las siguientes condiciones: 37 °C, 5% de CO_2 , con medio de cultivo DMEM Hams F12 complementadas con 10% suero fetal bobino (FBS) y 1% de antibiótico (1000 unidades/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin) los subcultivos se realizaron al alcanzar una confluencia de 70%,

revisando periódicamente la ausencia de contaminación y verificando que las células mantengan su morfología.

Las células se incubaron (5×10^4 células/mL) en placas de 96 pozos durante 24 horas. Al término del periodo de incubación se adicionaron los extractos totales de los toronjiles en diferentes concentraciones (0.1 a 2 mg/mL), por 24 horas más. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionó 10-20 μ L de MTT (5 mg/mL) completando el volumen final con medio en ausencia de rojo de fenol e incubadas durante 3 horas; al término de este periodo se retiró el sobrenadante y posteriormente se adicionó 100 μ L de isopropanol por cada pozo. La lectura de densidad óptica (DO) se realizó en un multiskan EX con agitación de 1020 rpm durante 30 segundos a una longitud de onda de 570 nm. (Mosmann, 1983). El porcentaje de viabilidad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{(DO \text{ células tratadas})}{(DO \text{ células control})} \times 100$$

5.2.11 Prueba de potenciación de sueño con pentobarbital

Para la prueba de duración de sueño inducido por pentobarbital sódico se utilizaron once grupos de ratones CD1. Ocho grupos fueron tratados con los extractos de las plantas (cuatro grupos por planta), que se administraron por vía oral a dosis de 5, 10, 100 y 300 mg/kg. Como control positivo se administró a un grupo clonazepam por vía intraperitoneal (0.5 mg/kg i.p.), como control negativo se administró cafeína (7.5 mg/kg i.p.). Treinta minutos después, a los grupos control y tratados se les administró pentobarbital sódico (42 mg/kg i.p.), el último grupo solo fue tratado con pentobarbital. Se evaluó el tiempo en que tarda el ratón en dormir (perdida del enderezamiento o latencia) y el tiempo que duró el sueño (tiempo que tarda en cobrar el conocimiento y el equilibrio) (Jiménez, 2015).

5.3 Elaboración de películas de alginato de sodio

5.3.1 Preparación y secado de películas

Se prepararon 20 mL de soluciones de alginato de sodio al 1, 1.25, 1.5, 1.75 y 2% en agua destilada, se dejaron en agitación aproximadamente 24 h.

Para la formación de las películas se siguió a técnica de vaciado de la solución y evaporación del solvente, descrita por Borges *et al.*, (2015), con algunas modificaciones, 15 mL de las soluciones se depositaron en contenedores de teflón con una superficie de 30 cm² y se secaron en estufa de vacío a 45 °C y 15 inHg. Posteriormente fueron cortadas en cuadrados de 1x1 cm.

5.3.2 Medición de espesor

El espesor de las películas fue medido usando un micrómetro digital (Big Horn,) con una sensibilidad de 0.001 mm. Las películas fueron colocadas entre los palpadores del micrómetro y la medición se tomó en la primera indicación de contacto entre la película y los palpadores. Se realizaron 15 mediciones sobre diferentes posiciones de cada muestra, el análisis se hizo por triplicado (Ashikin *et al.*, 2010). Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.3.3 Medición de solubilidad

Para determinar el tiempo de solubilidad se adaptó la metodología propuesta por Dinge y Nagarsenker (2010). En un vaso de precipitados de vidrio de 50 mL se colocaron 20 mL de buffer de fosfatos pH 6.4, a 37 ± 0.5 ° C, se mantuvo en agitación a 100 rpm con un agitador magnético, las películas se colocaron en una canastilla en el centro del vaso cuidando que no tocará el agitador. Se tomaron alícuotas cada minuto y se midió la absorbancia a 205 nm hasta obtener mediciones

constantes. Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.3.4 Medición de color

El color de las películas se midió en un espectrofotómetro (GBC, modelo Cintra 10) utilizando el aditamento de esfera de integración, las mediciones se realizaron de acuerdo con el espacio de color CIE L*a*b* utilizando un observador de 2º y un iluminante A (Ayola y Hernández, 2010). Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.3.5 Espectroscopia infrarroja FT-IR

Las películas se analizaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, de acuerdo con lo reportado por Bhadane y Patil (2017) con algunas modificaciones, se utilizó un espectrómetro Spectrum Two de la marca Perkin Elmer con el módulo ATR, las lecturas se tomaron en el rango de 4000 a 500 cm^{-1} . Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.3.6 Microscopia electrónica de barrido

La estructura superficial de las películas fue caracterizada mediante microscopia electrónica de barrido empleando un microscopio electrónico de barrido JEOL JCM-6000 plus. Debido a que las películas se elaboraron con un material no conductor (alginato de sodio), fue necesario recubrirlas con grafito coloidal para poder procesarlas. Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.3.7 Microscopia de fuerza atómica

La topografía de la superficie de las películas orales a nivel micro fue analizada con un Microscopio de Fuerza Atómica (diMultimode V conectado a un micro controlador di Nanoscope V, Veeco, USA). Las superficies fueron escaneadas usando el modo “tapping air” a una velocidad de escaneo de 1 Hz. Se analizó una superficie de 225 μm de cada película. Para procesar las imágenes se utilizó el software NanoScope Versión 1.5. Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.3.8 Nanoindentación

Las propiedades mecánicas de las películas orales de alginato fueron caracterizadas usando un Nano-Hardness Tester (NHT) desarrollado por CSM Instruments (Suiza). Los parámetros empleados fueron; valor de carga máxima 5 mN, tiempo de pausa 10 s y velocidad de carga y descarga 15 mN/min. La punta que se utilizó fue de diamante piramidal base triangular conocida como Berkovich. Esto se realizó también para las películas con los extractos etanólicos microfiltrados.

5.4 Elaboración de películas de alginato de sodio con extractos de *A. mexicana*

5.4.1 Preparación y secado de películas

Para la formación de las películas orales con los extractos se prepararon dos soluciones de 25 mL de alginato de sodio al 1.5% y a cada una se le adicionó un extracto a una concentración final de 1 mg de sólidos/mL. Ambas soluciones se dejaron en agitación aproximadamente 24 h. El proceso de vaciado y secado de las películas fue de la misma manera que en las películas sin extracto.

5.4.2 Prueba de potenciación de sueño con pentobarbital

Para la prueba de duración de sueño inducido por pentobarbital sódico se utilizaron 6 grupos de 11 ratones CD1. Dos grupos fueron tratados con las películas con extractos (100 mg sólidos/Kg), para facilitar la administración por vía oral las películas se resuspendieron en agua. Se administró flumazenil (5 mg/kg i.p.) a otros dos grupos 15 min antes de administrar las películas (uno por cada película con extracto). Como control positivo se administró a un grupo clonazepam por vía intraperitoneal (0.5 mg/kg i.p.). Treinta minutos después, a los grupos control y tratados se les administró pentobarbital sódico (42 mg/kg i.p.), el último grupo solo fue tratado con pentobarbital. Se evaluó el tiempo en que tarda el ratón en dormir (perdida del enderezamiento o latencia) y el tiempo que duró el sueño (tiempo que tarda en cobrar el conocimiento y el equilibrio) (Jiménez, 2015).

5.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las pruebas de potenciación de sueño por pentobarbital fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnet. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos. El análisis se realizó con ayuda del software OriginLab 2015.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención y caracterización de extractos

6.1.1 Rendimiento de extracción

Conocer la concentración de sólidos que se tiene en los extractos es importante ya que como parte de la estandarización de los extractos esto nos permite tener una mayor consistencia en la dosificación y a su vez una mayor predictibilidad de la respuesta terapéutica (Kumar, 2016). Los resultados mostrados en la tabla 1 corresponden a los valores obtenidos de la determinación de sólidos tanto de los extractos completos como de los microfiltrados, en ellos se puede observar que por mililitro de extracto se obtuvieron 4.2 mg para *A. m. mexicana* y 4.8 mg para *A. m. xolocotziana*, además, se puede observar que con el proceso de microfiltración se obtuvo por cada mililitro 4.1 mg de sólidos para *A. m. mexicana* microfiltrado y 4.7 mg para *A. m. xolocotziana* microfiltrado, cerca del 98% de los sólidos obtenidos de la extracción etanólica.

Tabla 1.- Rendimientos de extracción

Extracto etanólico	mg/mL de extracto	mg/g de planta seca	Rendimiento %
<i>A. m. mexicana</i>	4.295 ± 0.175	53.687 ± 2.192	5.368 ± 0.219
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	4.193 ± 0.041	52.416 ± 0.520	5.241 ± 0.052
<i>A. m. xolocotziana</i>	4.86 ± 0.15	60.75 ± 1.887	6.075 ± 0.188
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	4.765 ± 0.159	59.562 ± 1.993	5.956 ± 0.199

Los valores indican la media ± DS de una n=3

La tabla también nos muestra los mg que se pueden obtener por cada gramo de planta utilizada en la extracción, en el caso de *A. m. mexicana* 53 mg y para *A. m. xolocotziana* 60 mg, teniendo así un rendimiento de extracción de 5% y 6% respectivamente. En el 2004 Estrada-Reyes *et al.*, obtuvieron rendimientos de extracción de *A. m. mexicana* de 2.01% con hexano, 2.36 con acetato de etilo y 10.17 con metanol, para *A. m. xolocotziana* obtuvieron 1.34% con hexano, 2.78 con acetato de etilo y 11.46% para metanol, si bien estos resultados no son muy cercanos se debe tener en cuenta que la extracción no se realizó a las mismas condiciones, ni se emplearon los mismos disolventes. González-Ramírez *et al.*, en el 2012 reportaron rendimientos de extracción de *A. m. xolocotziana* de 1.75% con hexano, 3.38% con acetato de etilo y 14.98% con metanol.

La principal razón por la cual los rendimientos son diferentes a lo reportado por los distintos autores es a la propia constitución fitoquímica de las plantas ya que la calidad y cantidad de estos metabolitos depende principalmente de las condiciones de crecimiento (Attard *et al.*, 2015). Además, el proceso de extracción se ve afectada por algunos factores importantes como el tipo de disolvente, la relación del disolvente con el material vegetal, la temperatura, el tiempo, el tamaño de partícula de la planta, entre otros (Harbourne *et al.*, 2013).

Por otro lado, Hurtado en el 2016, reportó para extractos etanólicos rendimientos de 19.07% para *A. m. xolocotziana* y 18.75% para *A. m. mexicana*, en este trabajo la extracción se llevó a cabo mediante sonicación que, de acuerdo a Both *et al.*, (2015) es un proceso mecánico de ultrasonido que acelera la liberación de compuestos orgánicos que se encuentran dentro del cuerpo de la planta por el rompimiento de las paredes celulares, mejorando la transferencia de masa y facilitando el acceso del solvente al contenido celular. Sin embargo, Handa reportó en el 2008 que la energía ultrasónica (más de 20 kHz) tiene un efecto deletéreo sobre los constituyentes activos de las plantas medicinales a través de la formación de radicales libres y, por consiguiente, cambios indeseables en las moléculas del fármaco. Estos cambios pueden deberse a la producción de radicales libres dentro

de las burbujas de cavitación. Por ejemplo, Paniwnyk *et al.*, (2001), describen que la sonicación del agua da como resultado la formación de radicales hidroxilos altamente reactivos que pueden combinarse para formar peróxido de hidrógeno que puede o no ser beneficioso para el propio proceso de extracción.

6.1.2 Preliminar fitoquímico

Los fitoquímicos son compuestos químicos que se encuentran naturalmente en el reino vegetal. Este término generalmente se usa para referirse a aquellas sustancias químicas que pueden tener significado biológico, por ejemplo, carotenoides, flavonoides o cumarinas, pero no todas se establecen como nutrientes esenciales (Matos *et al.*, 2015). La tabla 2 muestra los resultados cualitativos obtenidos del tamiz fitoquímico de los extractos etanólicos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana*, en donde + significa la presencia y – la ausencia.

Tanto *A. m. mexicana* como *A. m. xolocotziana* resultaron positivos a la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, azúcares reductores, taninos y esteroides del tipo triterpenos. Siendo mayor en *A. m. xolocotziana* la presencia de cumarinas, azúcares reductores y esteroides.

En el trabajo realizado por Hurtado en el 2016, se reporta que *A. m. mexicana* dio positivo a alcaloides, flavonoides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, azúcares reductores, taninos, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos, saponinas y esteroides. Siendo mayor la presencia de alcaloides y glicósidos cianogénicos en *A. m. mexicana*.

En el 2014 Estrada-Reyes *et al.*, reportaron la presencia de fenoles, flavonoides saponinas y taninos para ambas plantas. Entre los flavonoides reportados se encuentran; diosmetina, gardenina A, 8-OH-salvigenina, Acacetina y 7-O- β -glucósido.

Tabla 2.- Preliminar fitoquímico de *A. mexicana*

Metabolito	Reacción	<i>A. m. mexicana</i>	<i>A. m. xolocotziana</i>
Alcaloides	Dragendorff	+	+
	Wagner	-	-
	Mayer	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+
	Hidróxido de sodio al 10%	-	-
Cumarinas	Erlich	-	-
	Con Hidróxido de amonio	+	++
Sesquiterpenlactonas	Con hidróxido férrico	-	-
Azucares Reductores	Fehling	+	++
	Benedict	+	++
Taninos	Cloruro férrico	+	++
Glicósidos cardiacos	Legal	-	-
	Baljet	-	-
Glicósidos cianogénicos	Grignard	-	-
Quinonas	Con ácido sulfúrico	-	-
Saponinas	Lieberman-Bouchard	-	-
	Rosenthaler	-	-
Esteroides	Lieberman-Bouchard	+	++

La presencia de metabolitos se simboliza como + mientras que la ausencia es -

6.1.3 Cuantificación de metabolitos secundarios

6.1.3.1 Fenoles

Los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles (tabla 3) muestra que por cada mL de extracto se tienen 1.9 y 1.8 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) para *A. m. mexicana* y *A. m. mexicana* microfiltrado respectivamente, mientras que *A. m. xolocotziana* tuvo 1.1 mg y su microfiltrado 0.9 mg EAG, este ultimo es similar al reportado en 2016 por Hurtado quien obtuvo para *A. m. xolocotziana* 0.903 (mg EAG/mL), mientras que para *A. m. mexicana* reportó 2.698 (mg EAG/mL), la diferencia en estos resultados puede deberse a la propia constitución del material biológico.

Tabla 3.- Cuantificación de fenoles

Extracto etanólico	CFenoles [mg EAG/mL]	CFenoles [mg EAG/g extracto seco]
<i>A. m. mexicana</i>	1.994 ± 0.099	464.975 ± 23.236
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	1.895 ± 0.030	390.910 ± 6.288
<i>A. m. xolocotziana</i>	1.166 ± 0.0734	278.351 ± 17.536
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	0.954 ± 0.071	200.536 ± 15.042

Los valores indican la media ± DS de una n=3

De igual manera en la columna de la derecha, los resultados muestran que por cada gramo de extracto seco se obtienen 464.9 mg EAG para *A. m. mexicana*, 390.9 mg EAG para *A. m. mexicana* microfiltrado, 278.3 mg EAG para *A. m. xolocotziana* y 200.5 mg EAG para *A. m. xolocotziana* microfiltrado, estos resultados son mayores a los reportado por Estrada-Reyes *et al.*, en el 2014 donde se obtuvo para *A. m. mexicana* 320 (mg EAG/g de extracto seco) y para *A. m. xolocotziana* 162 (mg EAG/g de extracto seco), en este trabajo la extracción se llevo a cabo con agua destilada caliente. La polaridad que le confiere el grupo hidroxilo a los fenoles podría explicar que los resultados obtenidos utilizando etanol sean mayores.

6.1.3.2 Taninos

Los resultados obtenidos de la cuantificación de taninos se muestran en la tabla 4, en ella se puede observar que por cada mL de extracto se obtuvieron 0.1 mg de equivalentes de ácido tánico (EAT) para *A. m. mexicana* y *A. m. mexicana* microfiltrado, para *A. m. xolocotziana* y *A. m. xolocotziana* microfiltrado se obtuvieron 0.07 mg EAT. Estos resultados son menores a lo reportado por Hurtado (2016) quien obtuvo 0.2657 mg EAT/mL para *A. m. xolocotziana* y 0.3791 mg EAT/mL para *A. m. mexicana*. Aun cuando los valores no son similares nos permiten observar que en ambos casos la planta que tuvo mayor concentración de taninos fue *A. m. mexicana*.

Tabla 4.- Cuantificación de taninos

Extracto etanólico	C _{taninos} [mg EAT/mL]	C _{taninos} [mg EAT/g extracto seco]
<i>A. m. mexicana</i>	0.109 ± 0.004	25.487 ± 1.115
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	0.107 ± 0.001	22.193 ± 0.378
<i>A. m. xolocotziana</i>	0.072 ± 0.007	17.331 ± 0.086
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	0.074 ± 0.003	15.646 ± 0.077

Los valores indican la media ± DS de una n=3

Khaled-Khodja y Boulekbache-Makhlouf realizaron un estudio en el 2014, donde analizaron cuatro plantas de la misma familia de *Agastache* (*Lamiaceae*), para las cuales obtuvieron los siguientes resultados; *Ajuga iva* 6.88 (mg EAT/g extracto seco), *Marrubium vulgare* 10.44 (mg EAT/g extracto seco), *Mentha pulegium* 11.54 (mg EAT/g extracto seco), y *Teucrium polium* 21.19 (mg EAT/g extracto seco). En estos resultados se puede observar que los valores mas cercanos a los obtenidos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* son los de *Mentha pulegium* y *Teucrium polium*.

6.1.3.3 Flavonoides

Los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides se pueden ver en la tabla 5 en donde indica que por cada mL de extracto de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* se obtuvieron 0.62 y 0.64 mg de equivalentes de quercetina (EQ) respectivamente, mientras que para *A. m. mexicana* microfiltrado y *A. m. xolocotziana* microfiltrado fueron 0.61 y 0.64 mg EQ/mL. Estos resultados fueron mayores a los reportados por Hurtado en el 2016 en donde obtuvo 0.32 y 0.35 mg EQ/mL para *A. m. xolocotziana* y *A. m. mexicana* respectivamente. Una posible

causa de esta diferencia puede ser que el autor empleó sonicación en el proceso de extracción y si esta fue a más de 20 kHz, pudo haber formación de radicales libres afectando considerablemente los grupos flavonoides presentes.

Tabla 5.- Cuantificación de flavonoides

Extracto etanólico	C _{Flavonoides} [mg EQ/mL]	C _{Flavonoides} [mg EQ/g extracto seco]
<i>A. m. mexicana</i>	0.621 ± 0.01	144.804 ± 2.369
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	0.616 ± 0.017	127.163 ± 3.651
<i>A. m. xolocotziana</i>	0.645 ± 0.016	154.167 ± 4.044
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	0.640 ± 0.001	134.623 ± 0.375

Los valores indican la media ± DS de una n=3

6.1.3.4 Esteroides

La cuantificación de esteroides (tabla 6) muestra que por cada mL de extracto se tienen 0.23 mg de equivalentes de colesterol (EC) para *A. m. mexicana* y 0.27 mg EC para *A. m. xolocotziana*, mientras que para *A. m. mexicana* microfiltrado se obtuvieron 0.21 mg EC y para *A. m. xolocotziana* microfiltrado 0.26 mg EC. Estos resultados se encuentran por debajo de lo reportado por Hurtado, puesto que él obtiene para *A. m. mexicana* 6.38 mg EC/g muestra y para *A. m. xolocotziana* 2.96 mg EC/g muestra.

Tabla 6.- Cuantificación de esteroides

Extracto etanólico	C _{Esteroides} [mg EC/mL]	C _{Esteroides} [mg EC/g extracto seco]
<i>A. m. mexicana</i>	0.237 ± 0.017	55.387 ± 4.067
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	0.212 ± 0.006	43.9 ± 1.297
<i>A. m. xolocotziana</i>	0.272 ± 0.01	65.043 ± 2.592
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	0.26 ± 0.003	54.791 ± 0.675

Los valores indican la media ± DS de una n=3

6.1.4 Actividad antioxidante

Además de los efectos ansiolíticos y sedantes atribuidos a diversos grupos fenólicos, los grupos hidroxilo en los anillos de fenilo tienen una fuerte capacidad donadora de electrones. Por lo tanto, permite la fácil pérdida de electrones y tienen el potencial de oxidarse actuando en el organismo como antioxidantes (Li *et al.*, 2016). La diversidad de la naturaleza y la complejidad de los compuestos fitoquímicos de los extractos de plantas imponen el desarrollo de muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante y estimar la efectividad de estas sustancias (Khaled-Khodja y Boulekbache-Makhlouf, 2014). Los métodos más aplicados son los basados en la capacidad de inhibir los radicales DPPH y ABTS, los cuales a ciertas condiciones presentan una excelente estabilidad (Kuskoski *et al.*, 2005).

Para la determinación de actividad antioxidante se diluyeron tanto los extractos completos como los microfiltrados, los resultados obtenidos por el método DPPH se muestran en la tabla 7 en la cual se puede ver que después del proceso de microfiltración se conserva más del 90% de la capacidad antioxidante, el extracto de *A. m. mexicana* fue el que obtuvo mayor porcentaje de inhibición y al compararlo

con el antioxidante de referencia (Trolox), se obtiene 7.77 μM de equivalentes de trolox (ET) por mL de extracto y 1.811 mM ET por gramo de extracto seco mientras que el extracto de *A. m. xolocotziana* presentó 6.914 μM ET/ mL y 5.816 mM ET/g extracto seco.

Estos resultados son mayores a lo reportado por Ibarra-Alvarado *et al.*, en el 2010 dónde determinaron la actividad antioxidante de un extracto acuoso de *A. mexicana* obteniendo mediante la prueba de DPPH una concentración de 0.926 mM Trolox/g extracto.

Tabla 7.- Actividad antioxidante por DPPH

Extracto etanólico	% de inhibición	C _{Trolox} [μM ET/mL]	C _{Trolox} [mM ET/g de extracto seco]
<i>A. m. mexicana</i>	37.419 \pm 0.027	7.77 \pm 0.005	1.811 \pm 0.001
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	36.445 \pm 0.018	7.559 \pm 0.003	1.558 \pm 0.0008
<i>A. m. xolocotziana</i>	18.241 \pm 0.074	6.914 \pm 0.444	1.65 \pm 0.106
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	15.031 \pm 0.016	5.816 \pm 0.235	1.221 \pm 0.049

Los valores indican la media \pm DS de una n=3

Los resultados obtenidos mediante la prueba de ABTS se encuentran en la tabla 8, como puede verse, al igual que lo obtenido en DPPH el extracto que presentó mayor capacidad antioxidante fue el de *A. m. mexicana* que al compararlo con Trolox se obtuvo una concentración de 11.02 μM ET/mL mientras que para *A. m. xolocotziana* se obtuvo 8.9 μM ET/mL. Manteniendo más del 98% de su actividad después del proceso de microfiltración.

Tabla 8.- Actividad antioxidante por ABTS

Extracto etanólico	% de inhibición	C _{Trolox} [μ M ET/mL]	C _{Trolox} [mM ET/g de extracto seco]
<i>A. m. mexicana</i>	82.994 \pm 7.558	11.027 \pm 0.146	2.570 \pm 0.047
<i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	81.912 \pm 5.648	10.666 \pm 0.104	2.199 \pm 0.03
<i>A. m. xolocotziana</i>	73.885 \pm 4.719	8.9 \pm 0.849	2.124 \pm 0.202
<i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	72.609 \pm 4.578	8.779 \pm 0.121	1.844 \pm 0.025

Los valores indican la media \pm DS de una n=3

6.1.5 Caracterización por FT-IR de los extractos

Análisis mediante FT-IR de extracto de *A. m. xolocotziana*

En la descripción de espectros infrarrojos se suele indicar el tipo de vibración molecular que genera las señales como: ν =modo de tensión, δ = modo de deformación, sim= simétrico y asim= asimétrico. La figura 7 muestra el espectro infrarrojo del extracto de toronjil blanco donde el pico (ancho) 3262 cm^{-1} corresponde al grupo funcional OH asociación intermolecular (polímero), que es debida al tipo de vibración ν O-H, característica de la familia de los fenoles y alcoholes en las bandas de 3200 – 3400 cm^{-1} . El pico 2931 cm^{-1} corresponde a los grupos funcionales CH₃, CH₂ y CH que son pertenecientes a la familia de los alcanos en las bandas 2880-2975 cm^{-1} y que son debidas a la vibración ν C-H.

La señal 2846 cm^{-1} es característica de la familia de los ácidos, donde se identifica el grupo funcional -COOH (dímero) y que se identifica por la vibración ν O-H que se encuentra en las bandas 2500 – 3000 cm^{-1} . El pico 1743 cm^{-1} puede corresponder al grupo -COOR perteneciente a la familia de esterres y caracterizada por la vibración ν C=O. La señal 1601 cm^{-1} y es provocada por la vibración δ NH (banda II), que corresponde al grupo funcional RCONH₂ (primaria) de la familia de las amidas.

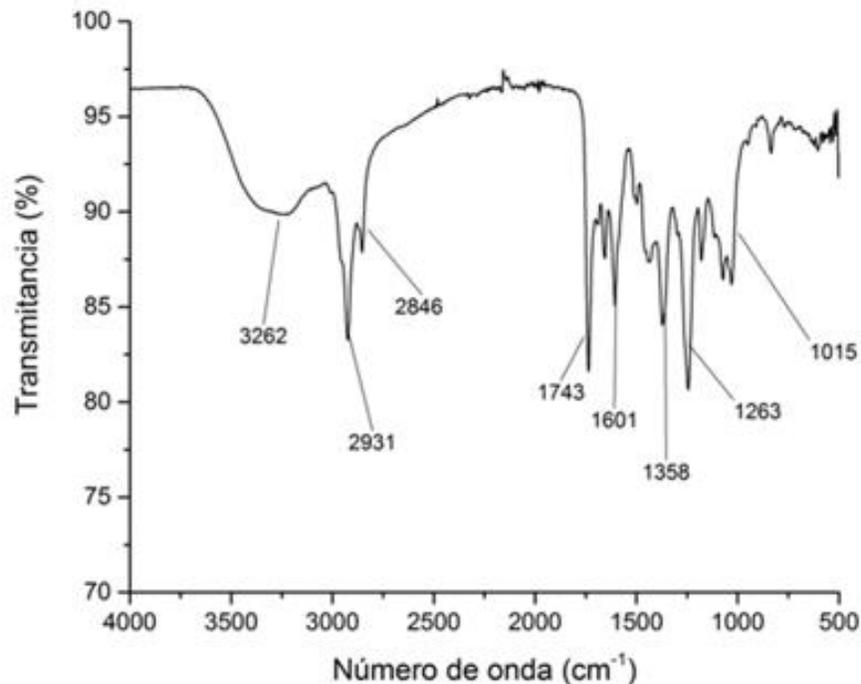


Figura 7.- Espectro FT-IR de A. m. xolocotziana

La presencia de nitrocompuestos en el extracto puede ser atribuida a la señal 1380 cm^{-1} que correspondería a los grupos funcionales $-\text{NO}_2$ alifáticos y aromáticos originados por la vibración molecular ν NO asimétrica. El pico 1263 cm^{-1} confirma la presencia de grupos hidroxilo debida a la presencia de fenoles por la vibración δ O-H, esta señal está relacionada al pico en la banda 3262 cm^{-1} . La señal 1015 cm^{-1} indica la presencia de aminas, expresadas en el espectro por la vibración molecular ν C-N.

De acuerdo con Petenatti et al., (2014) en la planta *Melissa officinalis* de la familia *Lamiaceae* reportan modos de vibración OH y CH y de estiramiento de C=O, que concuerdan a las señales (3262, 2931, 1743 cm^{-1}) mostradas en el espectro de toronjil blanco. En otra planta (*Pyrus pyrifolia*) de la familia *Lamiaceae* Sundaramurthy et al., (2015) reportan el espectro infrarrojo que muestra un pico ancho en la región de mayor energía debido al estiramiento de O-H debido a la

presencia de alcoholes y fenoles unidos entorno a las bandas (3340 y 3435 cm^{-1}), también indican que la banda de vibración de estiramiento C-H, que surge en torno a (2927, 2924 cm^{-1}) representa la presencia de grupos alcanos, y que los picos de absorción en torno a 1066 y 1022 cm^{-1} representan aminas alifáticas de estiramiento C - N.

Análisis mediante FTIR de extracto de *A. m. mexicana*.

La figura 8 muestra el espectro infrarrojo del extracto de toronjil morado, el cual tiene mucha similitud al espectro del toronjil blanco donde los picos indicados en la figura tienen ligeros desplazamientos. La señal 3266 cm^{-1} corresponde al grupo funcional OH, que es originada por la vibración ν O-H, característica de la familia de los fenoles y alcoholes en las bandas de 3200 – 3400 cm^{-1} .

La señal 2935 cm^{-1} corresponde a los grupos funcionales CH_3 , CH_2 y CH que son pertenecientes a la familia de los alcanos en las bandas 2880-2975 cm^{-1} y que son debidas a la vibración ν C-H. La señal 2848 cm^{-1} es característica de la familia de los ácidos, donde se identifica el grupo funcional -COOH (dímero) y que se identifica por la vibración ν O-H que se encuentra en las bandas 2500 – 3000 cm^{-1} . El pico 1729 corresponde al grupo -COOR perteneciente a la familia de esterés y caracterizada por la vibración ν C=O.

La señal 1597 cm^{-1} es provocada por la vibración δ NH (banda II), que corresponde al grupo funcional RCONH₂ (primaria) de la familia de las amidas. La presencia de nitrocompuestos en el extracto puede ser atribuida a la señal 1388 que correspondería a los grupos funcionales -NO₂ alifáticos y aromáticos originados por la vibración molecular ν NO asimétrica. El pico 1271 cm^{-1} confirma la presencia de grupos hidroxilo debida a la presencia de fenoles por la vibración δ O-H, esta señal está relacionada al pico en la banda 3266 cm^{-1} .

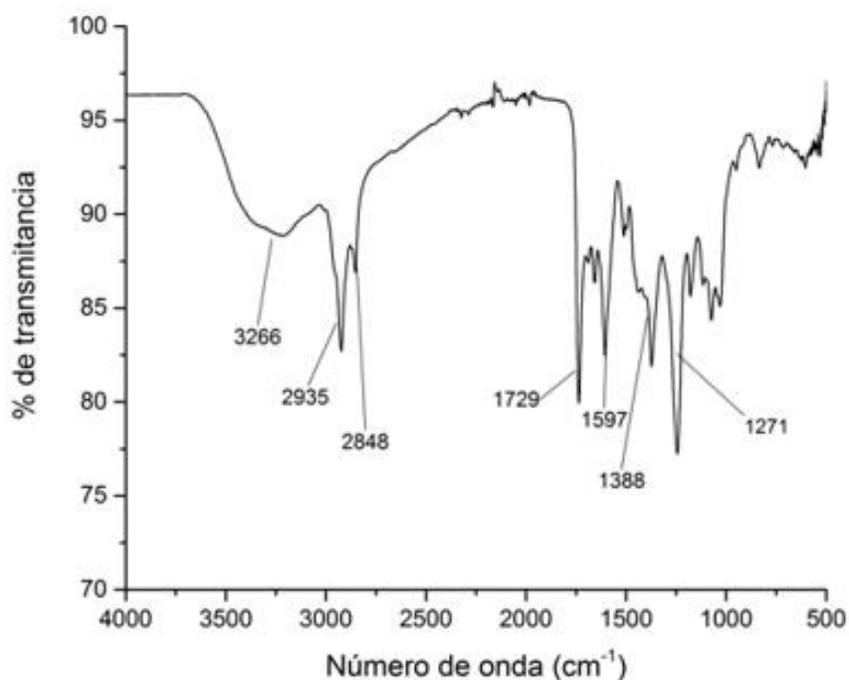


Figura 8.- Espectro FT-IR de A. m. mexicana

De acuerdo con Ramana *et al.*, (2014) el FTIR de *Ocimum basilicum* una planta de la familia *Lamiaceae*, indica que la banda a 3463 cm^{-1} se asigna al estiramiento de O-H de alcoholes y fenoles unidos a H. El pico fuerte a 1737 cm^{-1} muestra las vibraciones de estiramiento de C = O. La banda a 1639 cm^{-1} corresponde a la flexión N - H de aminas primarias. El valor 1440 cm^{-1} está relacionado con el estiramiento C - C de la estructura de anillo aromático. Las bandas a 1367 cm^{-1} están relacionadas con el estirado C-N del grupo amina aromática y que los picos de absorción considerables a $3463, 2962, 1737, 1639, 1440, 1367\text{ cm}^{-1}$ son característicos de eugenol, linalool, estragol y flavonoides.

De acuerdo con Shaik *et al.*, 2015 espectros FTIR de *tetradenia riparia*, una planta de la familia *Lamiaceae*, revelan picos a $2900\text{-}2810\text{ cm}^{-1}$ corresponden al estiramiento-CH alifático, los picos a $1450\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$ sugieren que -CH se flexiona mientras que el pico a $1050\text{-}1010$ corresponde al estiramiento -CO. El pico a 3250

cm^{-1} corresponde al grupo alcohol-OH que indica la posible implicación de los terpenoides. El pico a 1700 cm^{-1} sugiere un estiramiento del grupo $\text{C} = \text{O}$ causado por la presencia de este grupo funcional en pironas. El estiramiento de alqueno para los picos en $1640\text{-}1510$ y $2090\text{-}1890 \text{ cm}^{-1}$ es posiblemente el resultado de los enlaces $-\text{C} = \text{C}$ y $-\text{CH}$ presentes en la estructura de anillo de terpenoides.

Las figuras 9 y 10 muestran los espectros de los extractos completos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* y sus microfiltrados, donde se puede observar que las señas detectadas concuerdan en ambos espectros, sin embargo, los espectros correspondientes a los microfiltrado indican un menor porcentaje de transmitancia, debido a la menor cantidad de solidos que contienen. La similitud de las bandas después del proceso de microfiltración indica que se están conservando las características (grupos funcionales) del extracto después de este proceso.

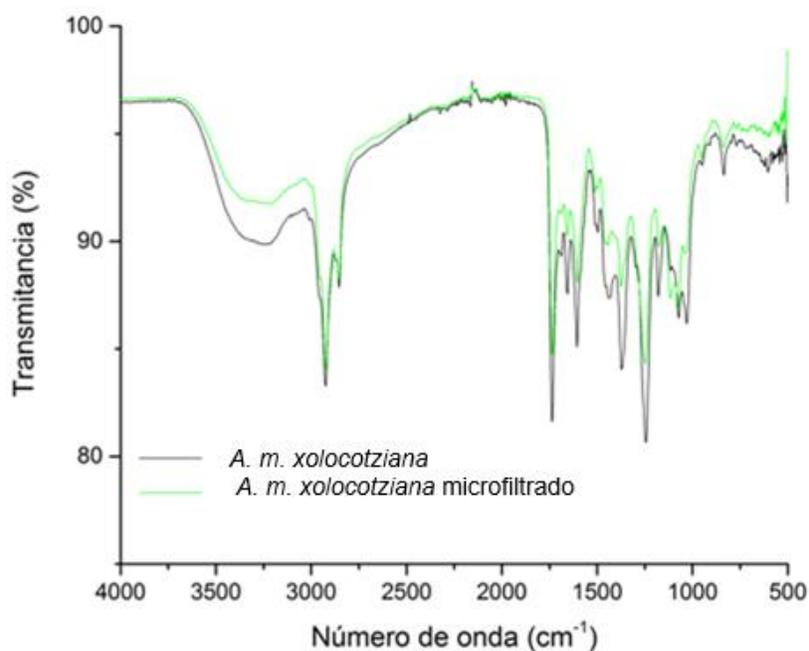


Figura 9.- Espectro FT-IR de *A. m. xolocotziana* y *A. m. xolocotziana* microfiltrado

De acuerdo con Ortega et al., (2007) la banda de absorción a 1233 cm^{-1} se asigna al estiramiento de los anillos de pirano, típicos de los compuestos flavonoides y las bandas que aparecen entre 1300 y 1380 cm^{-1} asignadas al enlace C-O muestra deformidades angulares de fenoles. De acuerdo con Pereira et al., (2015) las bandas características de los flavonoides son: grupos OH (de fenoles y de alcoholes del azúcar), grupos C=O (1719 cm^{-1}) de cetona, CH₃ y éter cíclico (2960 cm^{-1}), muestran una banda de absorción fuerte con un pico a 1015 cm^{-1} asignado a la deformación del anillo aromático C-H, así como bandas a 1650 y 1455 cm^{-1} correspondientes a la vibración de estiramiento del anillo aromático C = C.

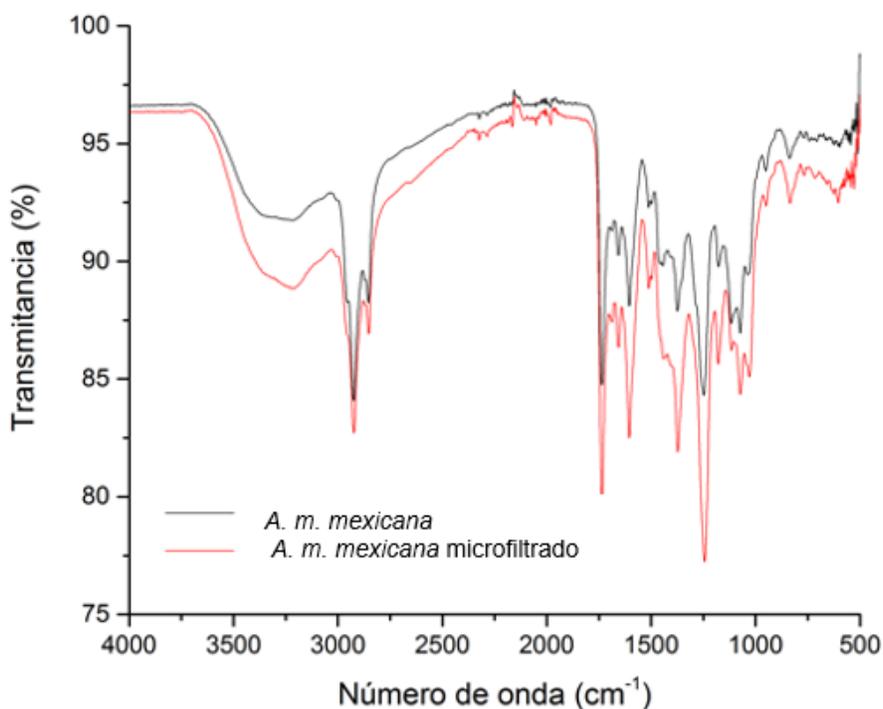


Figura 10.- Espectro FT-IR de A. m. mexicana y A. m. mexicana microfiltrado

6.1.6 Prueba de toxicidad

Se evaluó la toxicidad de los extractos a diferentes concentraciones desde 250 a 5000 mg/Kg por vía oral, la tabla 9 muestra que ninguno de los ratones murió, aun en las dosis más elevadas, de acuerdo con el método de Lorke los extractos se consideran no tóxicos, la única reacción que se presentó fue el erizamiento del pelo de los ratones administrados con *A. m. xolocotziana microfiltrado* a una dosis de 5000 mg/Kg, después de 30 min este efecto desapareció por completo. Estrada-Reyes *et al.*, (2014) también reportaron que para *A. m. mexicana* la DL_{50} fue superior a 5000 mg/Kg, pero a menor dosis (2600 mg/Kg) los ratones presentaron efectos adversos como diarrea, ataxia y sarpullido, mientras que para *A. m. xolocotziana* la DL_{50} fue de 3807mg/Kg, considerándolo como un extracto ligeramente tóxico. Otro estudio realizado en el 2013 por Verano *et al.*, determinaron para un extracto hexánico de *Agastache mexicana* una DL_{50} de 3506 mg/Kg, mientras que para extractos con acetil acetato y metanol reportaron una DL_{50} de 2828 mg/Kg.

De acuerdo con Lorke (1983), la DL_{50} no debe considerarse como una constante biológica, ya que se pueden obtener resultados diferentes al momento de hacer una repetición o cuando las determinaciones son llevadas a cabo en diferentes laboratorios y aun cuando este parámetro no pueda extrapolarse a humanos es importante ya que nos permite conocer los signos de intoxicación, los órganos diana de toxicidad aguda, la reversibilidad de las lesiones, etc.

Tabla 9.- Resultados de toxicidad

Dosis [mg/Kg]	Mortalidad <i>A. m. mexicana</i> microfiltrado	Mortalidad <i>A. m. xolocotziana</i> microfiltrado
250	0/3	0/3
500	0/3	0/3
1000	0/3	0/3
2500	0/3	0/3
5000	0/3	0/3 *

*presentaron erizamiento del pelo.

Las dosis fueron administradas vía oral, cada dosis se administro a grupos con n=3

6.1.7 Prueba de citotoxicidad

Se determinó la concentración media inhibitoria en dos líneas celulares mediante el método MTT, la primera línea fue de células C6 provenientes de glía de ratón, la figura 11 muestra el porcentaje de viabilidad de células respecto a las concentraciones evaluadas de extractos de *A. m. mexicana microfiltrado* y *A. m. xolocotziana microfiltrado*, de acuerdo con los resultados obtenidos se pudo determinar que el IC₅₀ es de 1.13 mg/mL para *A. m. mexicana microfiltrado* y para el extracto de *A. m. xolocotziana microfiltrado* el IC₅₀ es de 1.09 mg/mL. Un estudio realizado en el 2012 por Dutra *et al.*, (2012) obtuvieron una IC₅₀ de 0.0249 mg/mL al estudiar la actividad citotóxica de aceite esencial de *Pterodon emarginatus* en la línea celular C6 glíal, en este estudio los autores consideran que el aceite obtenido es potencialmente toxico.

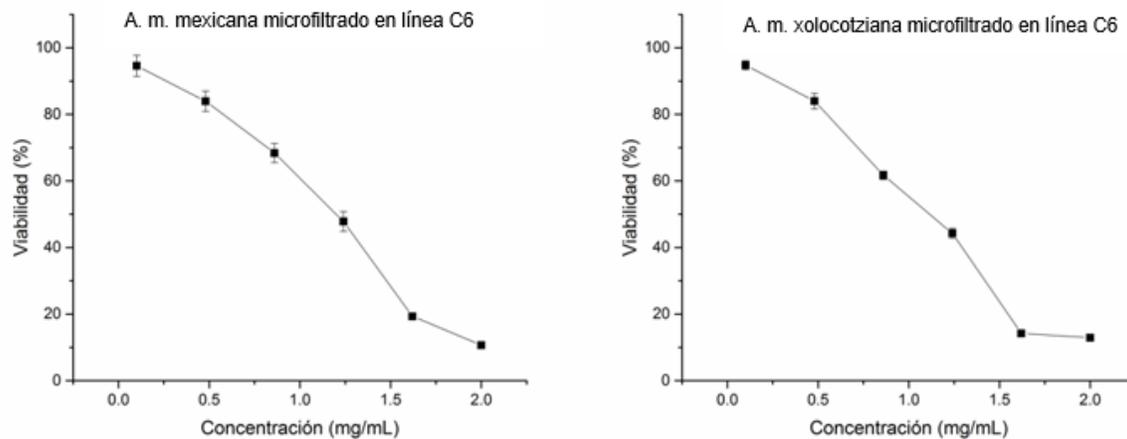


Figura 11.-Porcentaje de viabilidad de la línea celular C6 con *A. m. mexicana* microfiltrado y *A. m. xolocotziana* microfiltrado

La segunda línea celular evaluada fue la línea celular humana SH-SY5Y, estas células se utilizan como modelos *in vitro* de la función y diferenciación neuronal. Para determinar el porcentaje de viabilidad de estas células (figura 12) se evaluaron las mismas concentraciones que con la línea C6, para el extracto de *A. m. mexicana microfiltrado* se obtuvo un IC₅₀ de 1.29 mg/Kg y para *A. m. xolocotziana microfiltrado* se determinó un IC₅₀ de 1.05 mg/Kg. Los resultados obtenidos son similares entre las dos líneas celulares evaluadas, en ambas se puede observar que *A. m. xolocotziana microfiltrado* presenta menor IC₅₀ que *A. m. mexicana microfiltrado*.

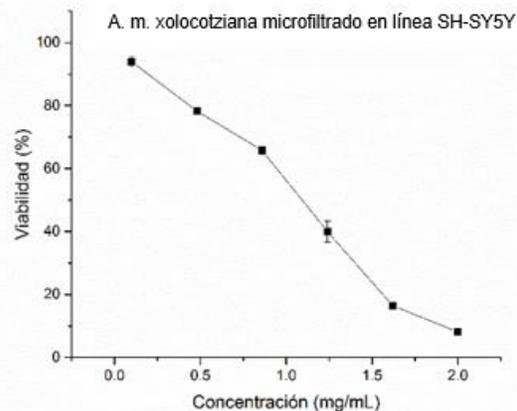
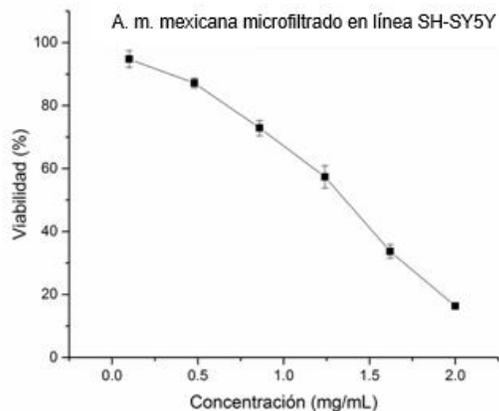


Figura 12.-Porcentaje de viabilidad de la línea celular SH-SY5Y con A. m. mexicana microfiltrado

De acuerdo con Kuete *et al.*, (2013), en el programa de detección de plantas del Instituto Nacional del Cáncer (US-NCI), generalmente se considera que un extracto crudo tiene actividad citotóxica *in vitro*, con un valor de IC_{50} inferior a 0.02 mg/ml después de la incubación entre 48 y 72 h. De esta manera se considera que entre menor sea el valor de IC_{50} mayor será el potencial de citotoxicidad de los extractos, por lo tanto, se puede considerar que los extractos evaluados en las dos líneas celulares no son citotóxicos.

Los resultados obtenidos nos permiten identificar las concentraciones que se pueden usar en ensayos *in vitro* posteriores, al relacionar el valor de la concentración inhibitoria del 50% de viabilidad con la concentración efectiva o dosis terapéutica *in vitro*, se puede determinar el índice terapéutico, lo que nos puede permitir identificar el margen de seguridad de los extractos.

En este trabajo, para poder determinar el índice terapéutico es necesario llevar a cabo un ensayo que nos permita obtener la dosis efectiva, es decir la concentración a la cual los extractos presentan la mayor actividad inductora de sueño.

6.1.8 Potenciación del sueño con pentobarbital

Se evaluaron diferentes dosis de extractos de *A. m. xolocotziana microfiltrado* y *A. m. mexicana microfiltrado* comparando su efecto contra clonazepam, fármaco usado en el tratamiento del insomnio, y contra cafeína un alcaloide que estimula el sistema nervioso central, aumentando el nivel de alerta.

En la figura 13 se puede observar que el mejor tiempo de latencia fue para *A. m. mexicana microfiltrado* a dosis de 100 mg/kg (2.15 min), tiempo menor al mostrado con clonazepam o pentobarbital sódico que fue de 3.13 min y 5.26 min respectivamente. Debido a que la cafeína es un alcaloide que estimula el SNC, se puede observar que el tiempo de latencia es mayor que el resto de los tratamientos (9 min) y el tiempo de sueño es menor (43 min), logrando que los ratones durmieran solamente 40 min ya que inhibe parcialmente el efecto sedante del pentobarbital.

Las dosis de 5, 10 y 300 mg/Kg no presentaron diferencia significativa en los tiempos de latencia comparadas con clonazepam, la dosis de 100 mg/Kg si presentó diferencia significativa, al comparar el tiempo de duración de sueño, se puede observar que si existe diferencia significativa entre las cuatro dosis administradas y el clonazepam, pero de las diferentes concentraciones de *A. m. mexicana microfiltrado* administradas, la que mejor tuvo un tiempo de duración de sueño más cercano al del control positivo fue la dosis de 100 mg/Kg ya que alcanzo un tiempo de 131.16 min contra 165.28 min del control.

Si comparamos los resultados obtenidos con el grupo al que solo se le administró pentobarbital, podemos observar que los tiempos de latencia en las cuatro dosis administradas disminuyeron, y que los tiempos de duración de sueño aumentaron a dosis mayores de 10 mg/Kg.

En un estudio realizado por González-Trujano *et al.*, (2015) evaluaron el efecto ansiolítico e hipnótico inducido por pentobarbital de un extracto metanólico de *Agastache mexicana* y de tilianina (considerado uno de los principales metabolitos

de esta planta), como resultado tuvieron que el tiempo de latencia no se vio afectado con la administración del extracto ni con tilianina, pero el tiempo de duración de sueño aumentó siendo mejor el tiempo reportado para el extracto completo, atribuyendo el efecto al sinergismo de los diferentes compuestos del extracto.

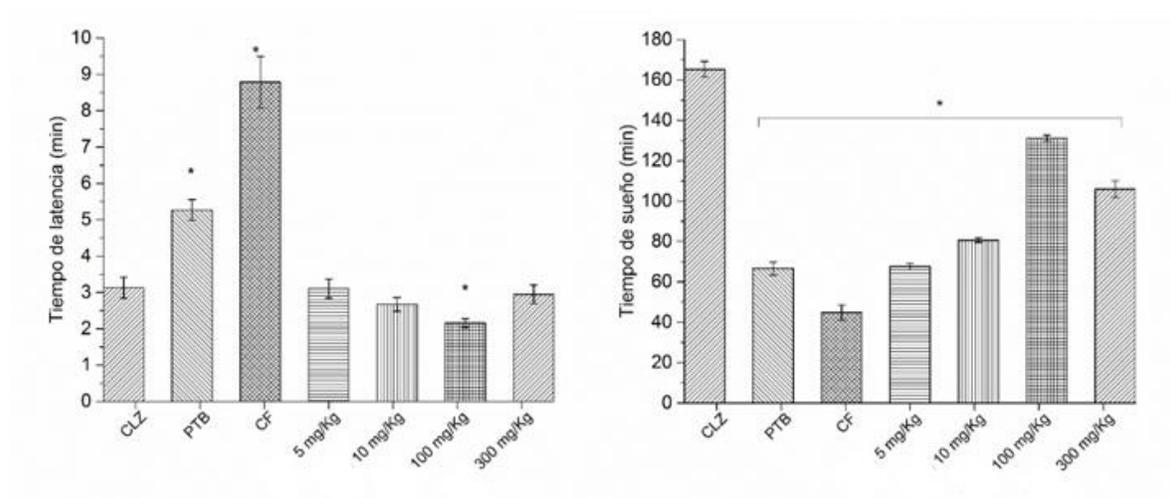


Figura 13.- Prueba de potenciación de sueño de *A. m. mexicana* microfiltrado

Donde CLZ: clonazepam, PTB: pentobarbital, CF: cafeína. Cada columna representa la media de 3 mediciones de grupos de n=11 y las barras verticales desviación estándar. *indican la diferencia significativa en comparación al control positivo CLZ ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos con *A. m. xolocotziana* microfiltrado (figura 14) fueron similares a los obtenidos con *A. m. mexicana* microfiltrado, las dosis que no presentaron diferencia significativa en los tiempos de latencia comparadas con clonazepam fueron a 5, 10 y 300 mg/Kg, la dosis de 100 mg/Kg si presentó diferencia significativa, en cuanto a tiempo de duración de sueño, se puede observar que si existe diferencia significativa entre las cuatro dosis administradas y el clonazepam, de igual manera la dosis de 100 mg/Kg fue la más cercana en tiempo de duración alcanzando un tiempo de 128.26 min. Este resultado es mayor al obtenido con la administración de pentobarbital y pentobarbital con cafeína.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede decir que para ambos toronjiles la mejor dosis fue a 100 mg de extracto seco por cada Kg/ratón, esta dosis fue la que se administró a los ratones en la prueba de potenciación de sueño con las películas.

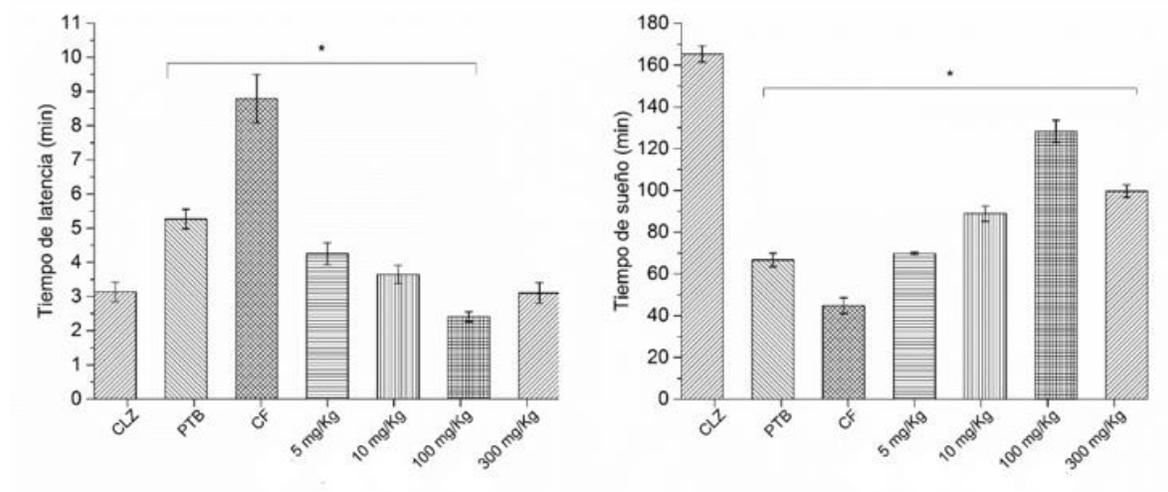


Figura 14.- Prueba de potenciación de sueño de *A. m. xolocotziana* microfiltrado

Donde CLZ: clonazepam, PTB: pentobarbital, CF: cafeína. Cada columna representa la media de 3 mediciones de grupos de n=11 y las barras verticales desviación estándar. *indican la diferencia significativa en comparación al control positivo CLZ ($p < 0.05$).

Estrada-Reyes *et al.*, (2014) evaluaron el efecto sedante de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* en este estudio reportaron que a una dosis de 100 mg/Kg o más se lograba ese efecto, siendo mayor la acción de *A. m. mexicana* que de *A. m. xolocotziana*.

Otro estudio similar se llevó a cabo por Estrada-Reyes *et al.*, en el 2010 en el que evaluaron el efecto depresor del SNC de un extracto acuoso de *Clinopodium mexicanum* (planta perteneciente a la familia Lamiáceas, al igual que *Agastache mexicana*), en este trabajo encontraron que el tiempo de latencia fue menor al obtenido con clonazepam y el tiempo de sueño fue mejor con 500 mg/Kg del extracto.

Estos resultados comprueban que los extractos etanólicos de *Agastache mexicana* contribuyen en la disminución del tiempo de latencia y en la prolongación del tiempo de sueño producidos por pentobarbital, este efecto puede atribuírsele a la presencia de grupos flavonoides que además actúan en el organismo como antioxidantes ante el daño que genera el estrés oxidativo a causa del insomnio.

6.2 Obtención y caracterización de películas de alginato

6.2.1 Obtención de películas

En la figura 15 se puede observar un fragmento de película de alginato, en ella se puede observar que después del proceso de secado de las soluciones de alginato se obtuvieron películas delgadas, lisas, transparentes y sin poros o fracturas visibles además las películas no presentaron problemas de adhesión al material en el que se elaboraron, permitiendo así una fácil recuperación de las películas sin la necesidad de adicionar en su formulación algún plastificante. Debido a la compactación del alginato las películas adoptaron la forma de la superficie sobre la que se llevó a cabo el proceso de secado, a excepción de las obtenidas al 1 y 1.25% que al estar secas presentaron una superficie menor e irregular a la del material en el que se elaboraron.



Figura 15.- Fragmento de película de alginato al 1.5%

6.2.2 Medición de grosor

Como puede observarse en la figura 16, las diferentes concentraciones permitieron obtener películas de diferente espesor al utilizar moldes de 30 cm², esta relación fue proporcional, a mayor concentración mayor grosor de las películas. Sin embargo, el grosor obtenido con las diferentes formulaciones fue menor al grosor medido de las películas comerciales que son aproximadamente de 64 µm, se puede observar que las películas más delgadas que se pudieron obtener fueron de 31 µm, casi la mitad del grosor de las comerciales conservando características visuales similares a éstas últimas.

De acuerdo con Karki *et al.*, (2016), la medición del espesor es necesaria ya que se correlaciona directamente con la cantidad de fármaco en la película, además, se requiere un espesor adecuado para la administración cómoda de películas, el espesor ideal de las películas bucales debe estar en el rango de 50 a 1000 µm. Las películas obtenidas a 2 y 1.75% de alginato se encuentran en el rango propuesto por los autores, además, fue posible obtener películas con menor espesor empleando soluciones de alginato a menor concentración.

En el estudio realizado por Xu *et al.*, (2014) obtuvieron películas de Alginato de sodio y de carboximetil almidón de sodio, las cuales presentaron espesores desde 90

hasta 130 μm . Cilurzo *et al.*, (2008) elaboraron películas de maltodextrina a concentraciones de 78, 80, 82 y 84 % (w/w) con glicerol y a 80 y 82% con polietilenglicol, las películas plastificadas con glicerol presentaron espesores desde 127 hasta 133 μm , mientras que el grosor de las que contenían polietilenglicol fue de 120 y 140 μm .

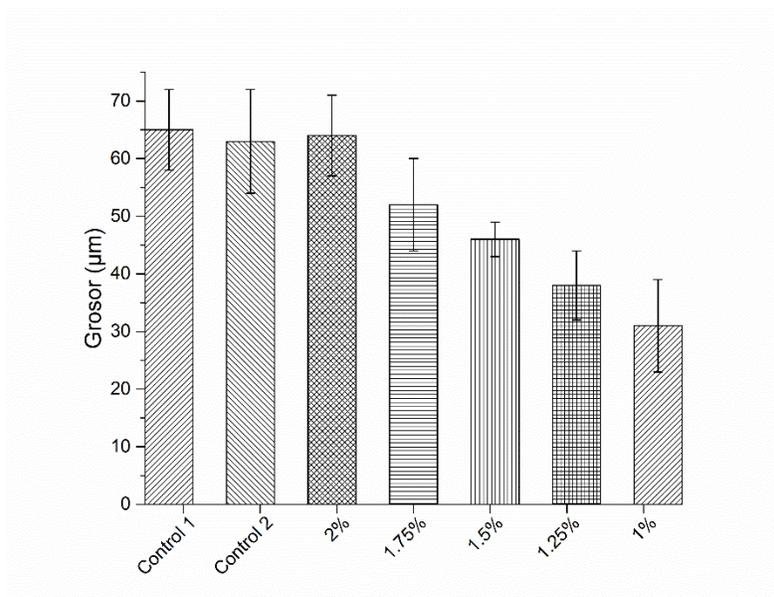


Figura 16.- Grosor promedio de las películas de alginato

6.2.1 Solubilidad

Para medir la solubilidad de las películas se utilizó el pico de absorción máxima de alginato de sodio obtenido a través de un barrido espectral en la región UV-VIS, el pico de mayor absorción fue a 205nm, esta longitud de onda es similar a la reportada por Awad y Aboul-Enein en el 2012, en donde ellos utilizan la longitud de 200 nm para determinar alginato de sodio en formulaciones farmacéuticas mediante HPLC.

De igual manera se determinó la longitud de onda para las películas comerciales mediante un barrido espectral, esto con la finalidad de poder monitorear la solubilidad de las películas en el buffer respecto al tiempo.

Los resultados de solubilidad obtenidos se muestran en la figura 17, en ella se puede ver que al igual que con el grosor, el tiempo que tarda en solubilizarse las películas disminuye conforme se disminuye la concentración, este parámetro depende de diferentes factores como pueden ser el espesor de las películas y el peso molecular de los polímeros (Gittings *et al.*, 2014). La película de 1.5% presentó menor tiempo de solubilidad que las películas control al igual que las de 1.25 y 1%, Sievens-Figueroa *et al.*, (2012) reportaron un tiempo de solubilidad de 20 min para sus películas a base de hidroxipropilmetilcelulosa.

De acuerdo con los resultados puede notarse que si comparamos las películas que presentan grosor similar (las películas control y la película de 2%), las películas control tuvieron tiempo de solubilidad menor, esto puede deberse al material del que están elaboradas las películas para el caso del control 1; pullulan, almidón modificado, glicerina, mentol, acesulfame potásico, aspartame, colorantes y saborizantes artificiales. Para el caso de la película control 2; almidón, xilitol, carragenina, ácido cítrico, aceite de menta, Acesulfame K, aspartamo, licorice, vitamina C y colorante azul FD&C #1.

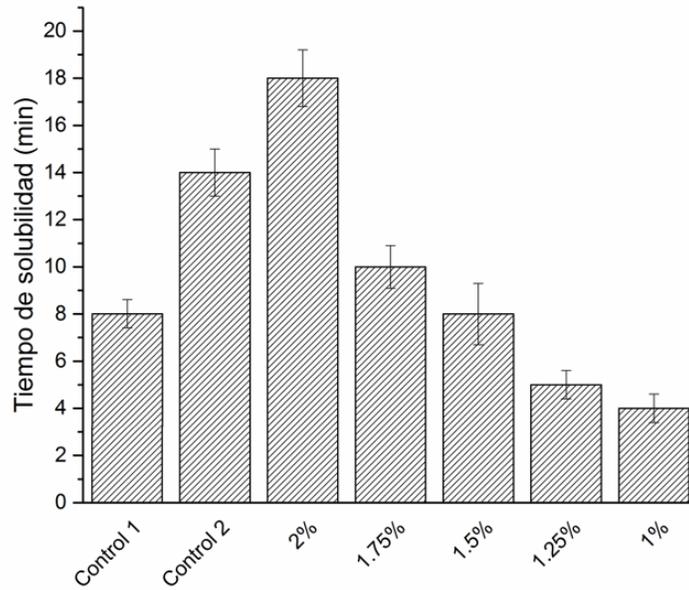


Figura 17.-Tiempo de solubilidad de las películas de alginato
La prueba se realizo en buffer de fosfatos a pH 6.4, 37 ± 0.5 ° C y 100 rpm.

6.2.2 Color

El color es un parámetro vital en la identificación de muchos productos farmacéuticos, además de ser importante para la aceptación del consumidor. El color del producto debe ser uniforme dentro de la forma de dosificación (Bhattarai y Gupta 2015). Los valores de las coordenadas del espacio de color obtenidos mediante la norma CIELab para las diferentes películas se muestra en la tabla 10, estos resultados concuerdan con la apariencia visual de las películas, debido a que la película de alginato es casi incolora (transparente) mientras que las películas comerciales son de color amarillo y azul muy claro. En el estudio realizado por Arzate (2011), obtuvo para películas de alginato, valores de 92.76 para L, -0.36 para

a y 11.23 para b, la diferencia entre estos valores y los obtenidos pueden atribuírsele a la presencia de glicerol que se empleó en ese estudio como plastificante.

Tabla 10.- Valores de las coordenadas L, a y b de las películas

Película	L*	a*	b*
Alginato 2%	98.984	0.308	1.704
Alginato 1.75%	98.996	0.291	1.672
Alginato 1.5%	98.121	0.324	2.138
Alginato 1.25%	98.669	0.176	1.101
Alginato 1%	98.238	0.186	1.231
Control 1	98.465	-1.386	9.924
Control 2	97.966	-3.136	-0.412

6.2.3 Caracterización por FT-IR de películas

La figura 18 muestra el espectro IR de la película de alginato de sodio, en ella podemos ver las bandas de absorción de alginato cerca de 1605 y 1410 cm^{-1} que se asocian con las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de aniones carboxilato, respectivamente. El espectro de alginato de sodio también muestra una banda fuerte y ancha a 3293 cm^{-1} relacionada con el estiramiento de O-H y una banda de estiramiento C-H alifático débil a 2926 cm^{-1} . Debido a la estructura de los polisacáridos se observa un pico alrededor de la banda de 1298 cm^{-1} (estiramiento en C-O), 1124 cm^{-1} (estiramiento en C-C), 1086 cm^{-1} (estiramiento en C-O), 1031

cm⁻¹ (C-O-C Estiramiento) y 948 cm⁻¹ (estiramiento C-O). Sibaja *et al.*, (2015) reportaron que el alginato de sodio presenta picos distintos como sal de carboxilo: bandas de absorción fuertes a 1591 y 1405 cm⁻¹ debido a aniones carboxilo (vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas) (Kulig *et al.*, 2017).

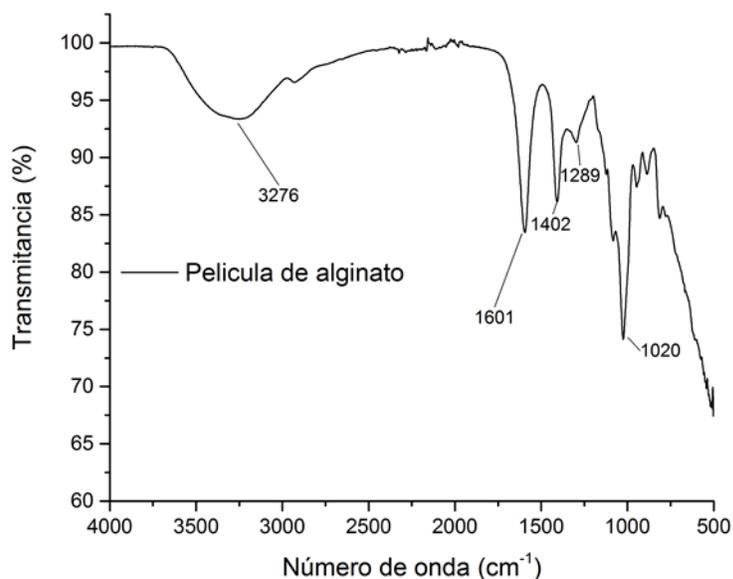


Figura 18.- Espectro FT-IR de la película de alginato de sodio

6.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de las películas de alginato

En la figura 19 se muestran las micrografías obtenidas de la película formulada a 1% de alginato de sodio en la figura 19A se muestra un fragmento de la película con un aumento de 10x, en esta se alcanza a observar una superficie homogénea. La figura 19B con un aumento de 200x permite visualizar que el fragmento de película presenta irregularidades en su superficie, además en la esquina inferior izquierda se presenta una amplificación de fragmento observado a 130x en la que se puede ver una estructura con porosidad, esto se nota de manera contrastada en una tonalidad más oscura que el resto de la superficie, de igual manera en una

tonalidad blanca y brillante se pueden observar ciertas irregularidades en la superficie de la película.

En un menor contraste blanco y opaco se pueden apreciar algunas marcas en forma de canales atribuidas al material en el que se llevó a cabo el secado de las películas. La figura 19C es un fragmento de la película desde un punto transversal a 24x, en donde de manera contrastada en blanco podemos observar el grosor de la película, tomando en cuenta la escala de la microscopia podemos ver que se trata de una película muy delgada aproximadamente de 17 μm , esto nos da una aproximación de su grosor sin embargo, recordemos que lo que se está observando es solo un fragmento muy pequeño de la película a diferencia de los resultados obtenidos en el punto 5.9 en donde se realizaron mayor número de mediciones con un micrómetro.

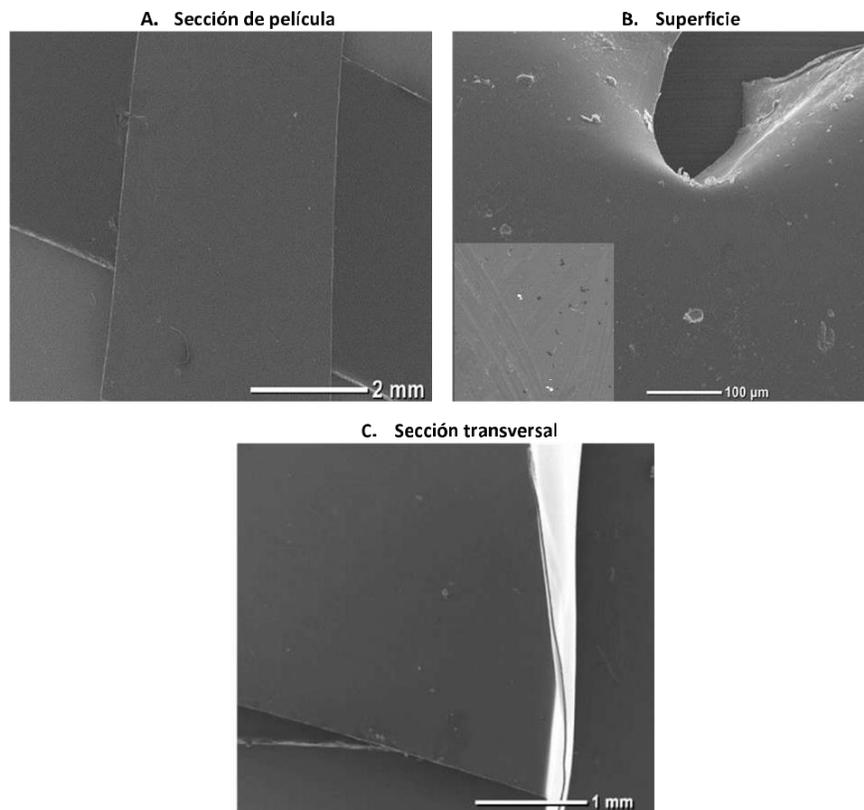


Figura 19.- Micrografías película a 1% de alginato

La figura 20 representa las micrografías de la película formulada a 1.25% de alginato de sodio, figura 20A realizada con un aumento de 34x nos muestra un fragmento de la película en la que se observa una superficie homogénea, con algunas imperfecciones en su superficie, también se puede observar ruptura del material ocasionado al momento de cortar el fragmento de película. La figura 20B obtenida con un aumento de 130x permite observar que la película tiene irregularidades, las podemos observar como pequeñas manchas blancas, además de que al igual que la película a 1% de alginato, presenta porosidades (pequeñas manchas de tonalidad más oscura que el resto de la superficie) de igual manera se pueden observar las marcas en forma de canales atribuidas al material en el que se llevó a cabo el secado de las películas, esto se ve como líneas oscuras de mayor tonalidad.

En la figura 20C a 130x se pueden ver desde la sección transversal con mayor claridad las marcas del material en el que se hicieron las películas, esto se puede ver como líneas blancas en mayor contraste a la superficie de la película, por otro lado, en color negro entre las dos secciones blancas podemos apreciar el grosor de la película que de acuerdo con las mediciones tomadas con ayuda del software del microscopio se observa que la película tiene un grosor aproximado de 19 μm .

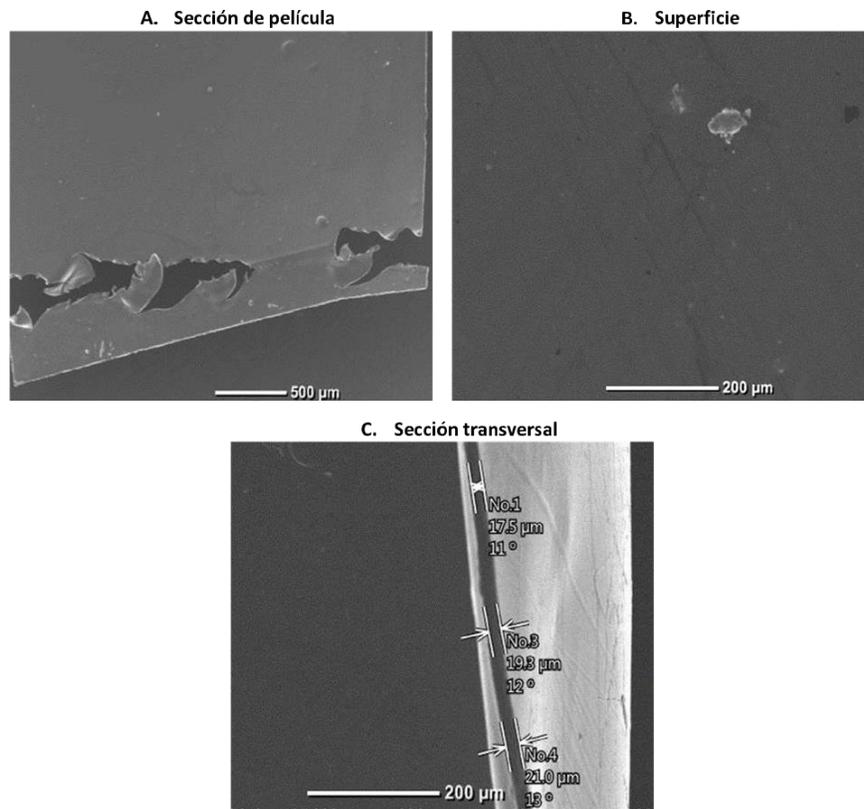


Figura 20.- Micrografías película a 1.25% de alginato

La figura 21 corresponde a las micrografías obtenidas de un fragmento de la película formulada a 1.5% de alginato de sodio, la figura 21A obtenida con un aumento de 10x nos muestra un fragmento de la película en la que se observa una superficie lisa y homogénea. En la figura 21B obtenida con un aumento de 700x se observan líneas en forma de canales con mayor pronunciación que en las micrografías anteriores, estas líneas se ven de una tonalidad grisácea que contrasta con el resto de la superficie de la película, de igual manera se pueden observar pequeñas manchas grisáceas que probablemente correspondan a imperfecciones de las películas por acumulación de material, en esta película no se alcanzó a observar porosidad. La figura 21C es la micrografía de la película vista transversalmente a 54x, en ella se siguen observando las líneas en forma de surcos atribuidos al material donde hicieron las películas, además se puede observar una estructura

mucho más densa que las anteriores y, por otro lado, también se midió el grosor en el que aproximadamente se tienen que mide 38 μm . Aun cuando los resultados del grosor no son iguales a los obtenidos mediante el uso del micrómetro, se puede observar que el grosor está relacionado directamente con la concentración de alginato, manteniendo la misma tendencia que se presenta en los resultados del punto 5.9.

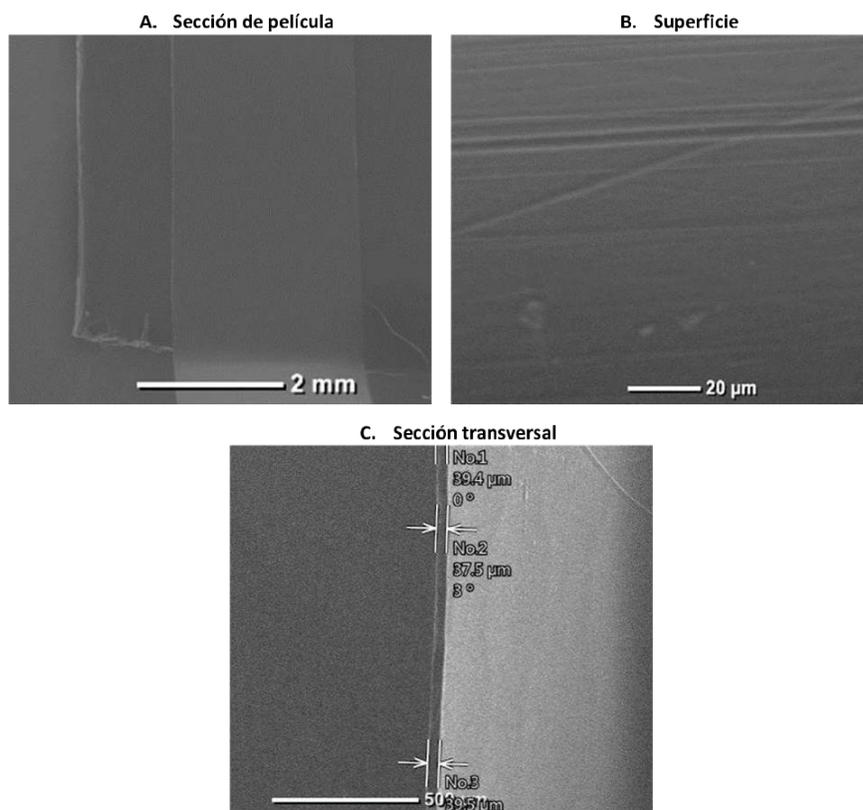


Figura 21.- Micrografías película a 1.5% de alginato

La figura 22 representa las micrografías de una sección de la película formulada a 1.75% de alginato de sodio, la figura 22A con un aumento de 34x nos muestra un fragmento de la película en la que se observa una superficie homogénea. En la figura 22B obtenida con un aumento de 700x se observan líneas en forma de canales con mayor pronunciación que en las micrografías anteriores, estas líneas se ven de una tonalidad grisácea que contrasta con el resto de la superficie de la

película, de igual manera se pueden observar pequeñas manchas grisáceas que probablemente correspondan a imperfecciones de las películas por acumulación de material, en esta película no se alcanzó a observar porosidad. La figura 22C es la micrografía de la película vista transversalmente a 75x, en ella se puede observar una superficie mucho más lisa, con meno imperfecciones, en un contraste negro se puede observar el grosor de la película que de acuerdo con el equipo es aproximadamente de 44 μm , manteniéndose la relación entre concentración de alginato y grosor.

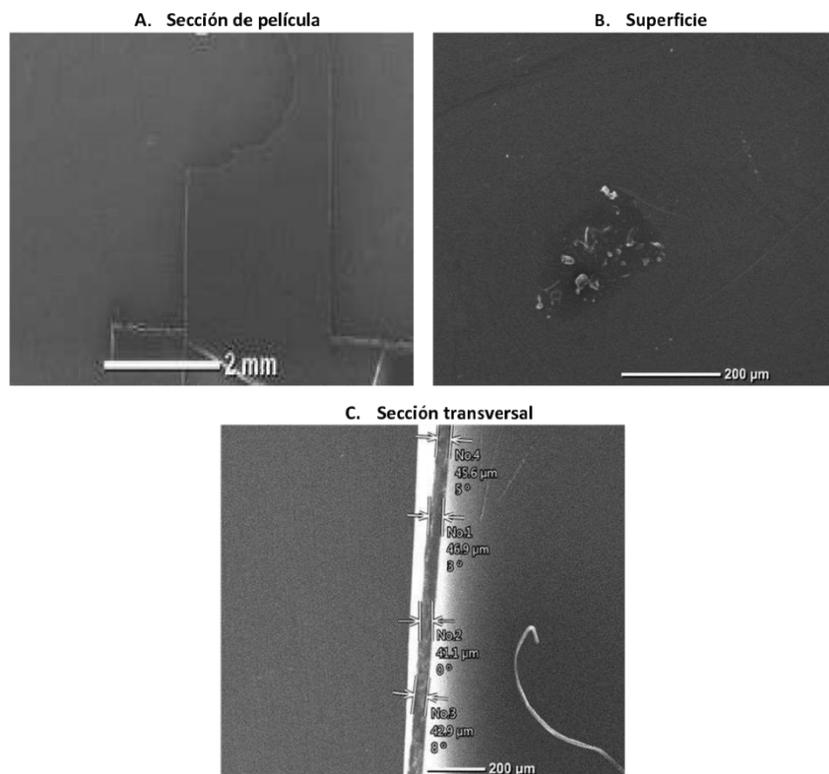


Figura 22.- Micrografías película a 1.75% de alginato

La figura 23 son las micrografías de la película formulada a 2% de alginato de sodio, la figura 23A con un aumento de 17x nos muestra un fragmento de la película en la que se observa una superficie homogénea con pocas imperfecciones que pueden verse como puntos blanquecinos. En la figura 23B obtenida con un aumento de 130x se observa una estructura lisa, homogénea, con pocas imperfecciones en la superficie, además de que no se alcanzan a observar porosidades, principalmente

por la alta densidad de material que tiene la película. La figura 23C es la micrografía de la película vista transversalmente a 34x, en ella se siguen observando algunas posibles acumulaciones de material, en cuanto al grosor las mediciones que se hicieron con el microscopio indican que se encuentra aproximadamente en 48 μm , siendo esta la película de mayor concentración y grosor.

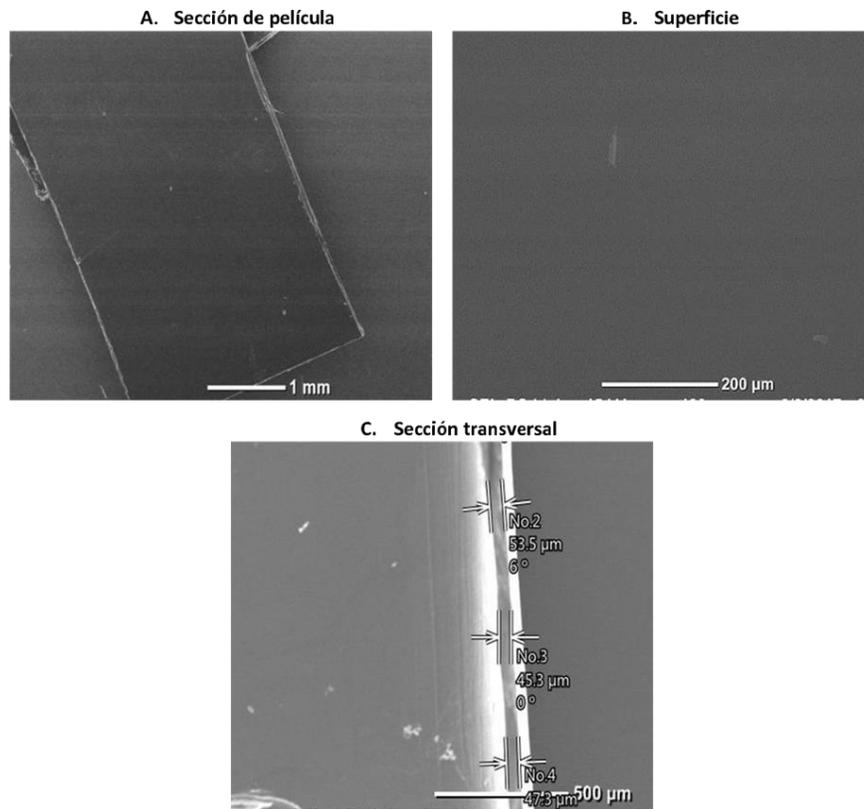


Figura 23.- Micrografías película a 2% de alginato

En la figura 24 se muestran las micrografías de la primera película comercial que se está empleando como control, en la figura 24A se muestra un fragmento de la película con un aumento de 22x, en esta se alcanza a observar una superficie lisa además de que se puede ver diferentes tonalidades de negro lo que nos hace suponer que la película no es completamente homogénea. La figura 24B con un aumento de 60x permite visualizar que el fragmento de película presenta irregularidades en su superficie, aquí también se notan las diferencias de contraste

de la superficie, además en la esquina superior derecha se presenta un fragmento de esta película observada a 200x en ella se puede ver una estructura altamente porosa (pequeñas manchas color negro), esta porosidad podría ser la que le da mayor solubilidad a las películas como ocurre con las tabletas orodispersables (Slavkova y Breitzkreutz, 2015).

En la esquina superior derecha de la figura 24B se puede observar una ampliación de la sección observada de la película, en ella se puede ver en una tonalidad blanca y brillante algunas irregularidades en la superficie de la película que bien podría ser material acumulado o posibles burbujas que se formaron durante el proceso de secado. La figura 24C es la película desde un punto transversal a 130x, en donde de manera contrastada en blanco podemos observar el grosor de la película, en la zona oscura podemos observar nuevamente la alta porosidad de este fragmento de película. Por otra parte, se midió el grosor de la película obteniendo que mide aproximadamente 35 μm de grosor.

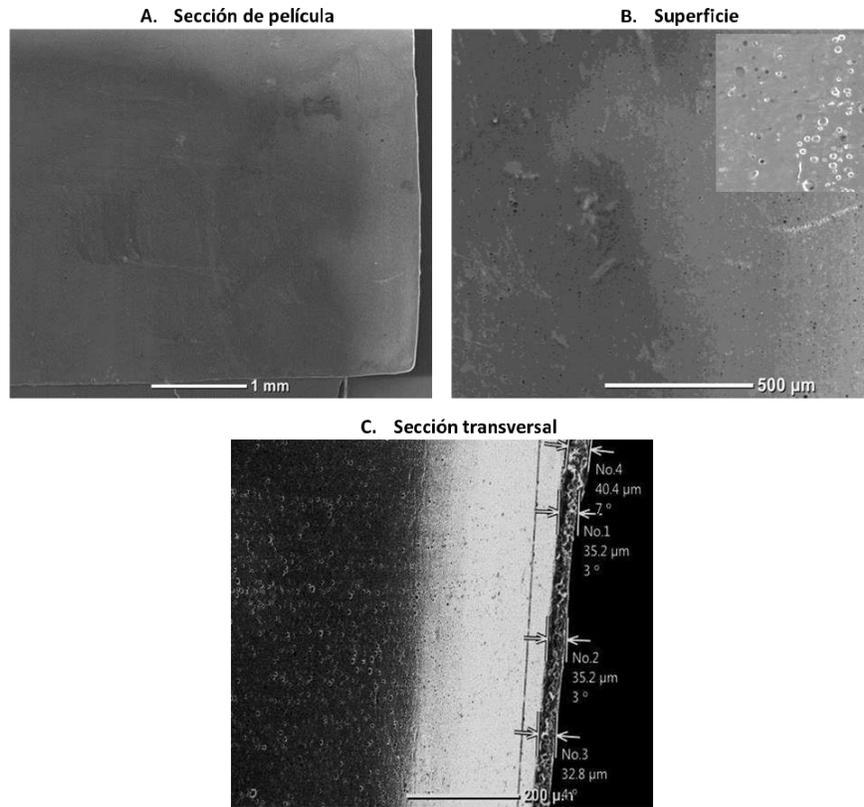


Figura 24.- Micrografías película comercial 1

En la figura 25 se muestran las micrografías de la segunda película comercial que se está empleando como control, en la figura 25A se muestra un fragmento de la película con un aumento de 17x, en esta se alcanzan a observar pequeños puntos más blancos que el resto de la superficie, posiblemente sean imperfecciones de las películas. La figura 25B con un aumento de 130x permite visualizar que el fragmento de película presenta ciertas irregularidades en su superficie, al igual que en la película anterior se puede ver una estructura altamente porosa (pequeñas manchas color negro). La figura 25C es la película desde un punto transversal a 130x, en donde de manera contrastada en blanco podemos observar el grosor de la película y parte de la superficie de esta, en la zona clara podemos observar material aglomerado en la superficie de la película, en la zona oscura podemos observar algunas manchitas de mayor oscuridad que bien pueden tratarse de los poros que

tiene la película o de material aglomerado como el que aparece en la superficie. En cuanto al grosor aproximado se tiene que es de $39\mu\text{m}$.

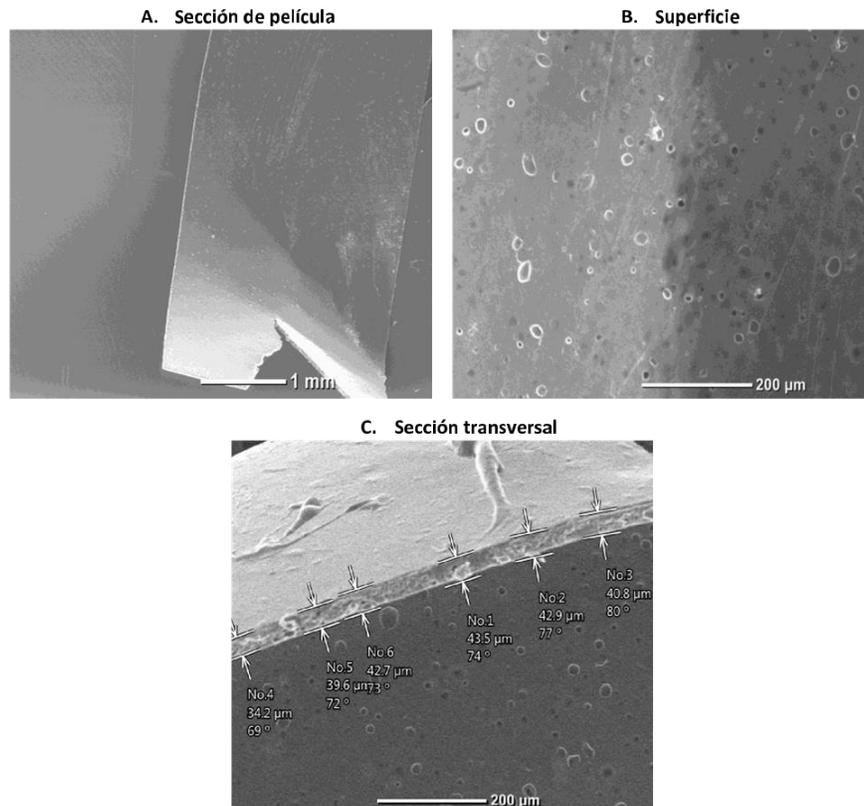


Figura 25.- Micrografías película comercial 2

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en un estudio realizado por Matiacevich *et al.*, (2015) donde elaboraron películas de alginato para encapsular carvacrol, como agentes encapsulantes emplearon trehalosa y Twenn 20 a diferentes concentraciones y condiciones de pH, mediante MEB pudieron observar que las películas con trehalosa presentaron estructuras homogéneas y lisas mientras que las películas con Twenn presentan estructuras rugosas. Las películas de alginato con iones de calcio obtenidas por Norajit *et al.*, (2010) presentaron mediante MEB morfología de superficie lisa y homogénea, la morfología de la sección transversal presentó una estructura fibrilar. Ke *et al.*, (2010) reportaron morfologías de superficie lisas para películas de alginato que contienen barberina.

6.2.5 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

La figura 26A muestra la imagen topográfica de la superficie de una película de alginato de sodio en un área de escaneo de $225 \mu\text{m}^2$, en la imagen se observa que la película de alginato tiene una superficie heterogénea y rugosa, del lado derecho de la imagen se encuentra una escala de color que corresponde a la presencia de valles (zonas más oscuras) y crestas (zonas más claras), esto puede distinguirse de mejor manera en la figura 26B que es una imagen topográfica 3D de la sección analizada en la que se puede apreciar la rugosidad de la película. El microscopio de fuerza atómica con ayuda del software NanoScope, además de permitir obtener imágenes topográficas de la superficie de las películas, permite obtener parámetros cuantitativos de rugosidad Ra (rugosidad promedio aritmética) y Rq (rugosidad media cuadrática), para la película de alginato se obtuvo un valor de $Rq=93.6 \text{ nm}$ y $Ra=72.8 \text{ nm}$.

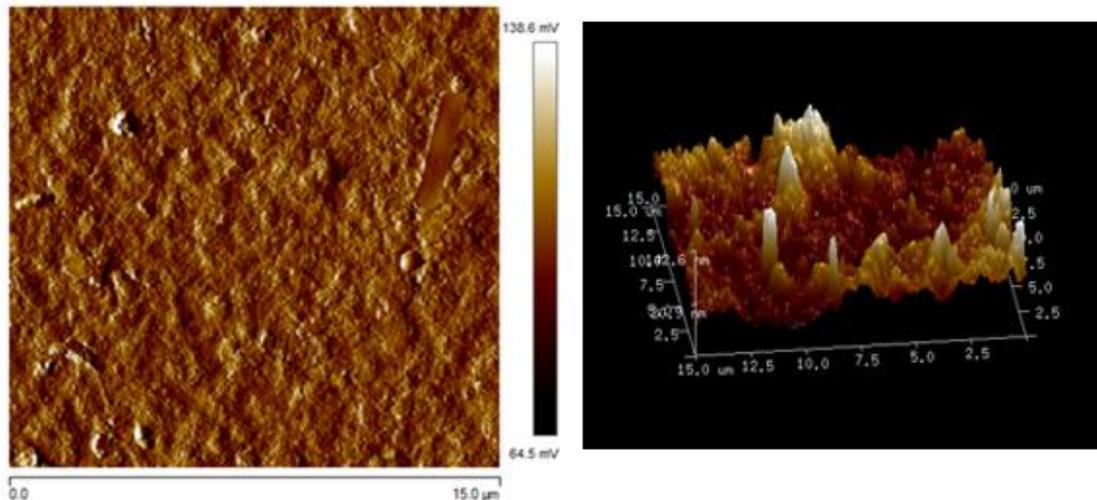


Figura 26.-Imagen topográfica de película de alginato

En el trabajo realizado por Wang *et al.*, (2017) obtuvieron imágenes topográficas de películas de alginato de sodio, en la que reportan protuberancias en tonalidades brillantes debido a la auto agregación del alginato de sodio, además los valores de

rugosidad que reportan para esta película son $R_q=24.3$ nm y $R_a=18.5$ nm y para las películas con colesterol presentaron valores de $R_q=10.07$, 2.16 y 6.05 nm y $R_a=8.08$, 1.52 y 5.12, con estos resultados los autores indican que la adición de colesterol disminuye la rugosidad de las películas y esto se ve en la disminución de los parámetros de rugosidad.

6.2.6 Nanoindentación

Se determinaron algunos parámetros mecánicos mediante nanoindentación con una punta Berkovich (figura 27). Los valores obtenidos fueron; dureza= 71.8 ± 13.5 MPa, módulo de elasticidad= 0.53 ± 0.07 y desplazamiento de indentación= 9.2 ± 1.4 % (parámetro que se define como el cambio en la profundidad que ocurre a una carga constante). El valor de dureza obtenido fue mayor al reportado por Arzate (2011) para películas de alginato de sodio con glicerol, las cuales tuvieron un valor de 37.82 ± 5.79 MPa, de igual manera el módulo de elasticidad fue ligeramente mayor al reportado por el autor 0.44 ± 0.06 GPa, lo que indica que la película obtenida es más elástica aun cuando la otra película contiene glicerol, sin embargo, esto hace que presente un mayor porcentaje de desplazamiento de indentación 11.75 ± 1.82 %



Figura 27.- Impresión residual realizadas con una punta Berkovich.

6.3 Obtención y caracterización de películas orales con extractos

6.3.1 Obtención de películas

De acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 8.2, se consideró emplear la solución de alginato al 1.5% como solución formadora de películas debido a que es una película delgada cuyo tiempo de disolución es bajo, además de que su superficie es homogénea, lisa y sin porosidades.

En la figura 28 se pueden observar dos secciones A y B pertenecientes a las películas con extractos de *A. m. mexicana microfiltrado* (P. *A. m. mexicana microfiltrado*) y *A. m. xolocotziana microfiltrado* (P. *A. m. xolocotziana microfiltrado*) respectivamente. Las películas obtenidas son de color verde, transparentes y conservan el brillo que tenían las películas de alginato. La P. *A. m. mexicana microfiltrado* presentó en su superficie mayor presencia de gránulos que la P. *A. m. mexicana microfiltrado*, esto podría atribuírsele a que no se llevó a cabo una buena solubilidad de los metabolitos del extracto *A. m. mexicana microfiltrado* al momento de preparar las soluciones, a pesar de ello, ambas películas presentan una buena apariencia visual.

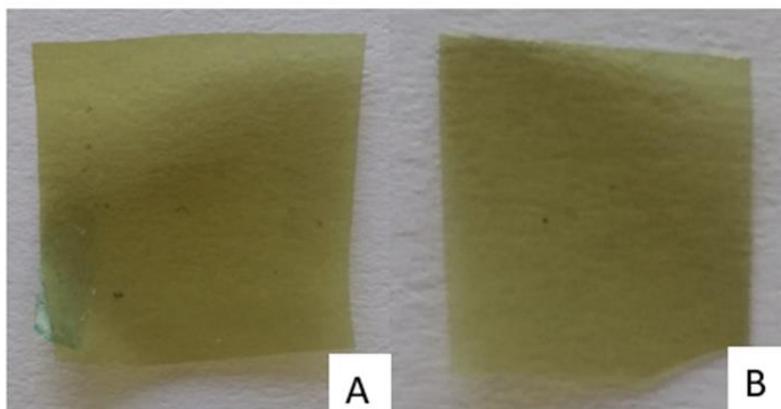


Figura 28.-Películas con extractos de *A. m. mexicana* microfiltrado y *A. m. xolocotziana* microfiltrado

6.3.2 Medición de grosor

Se midió el espesor de las películas de alginato con extracto de *A. m. mexicana* microfiltrado y *A. m. xolocotziana* microfiltrado, al comparar los resultados con los obtenidos previamente de la película de alginato al 1.5% se puede observar (figura 29) que después del proceso de atrapamiento de los extractos, las películas siguen siendo menores a 50 μm . Las películas de *A. m. mexicana* microfiltrado fueron las que aumentaron más su grosor, esto puede atribuírsele a la presencia de gránulos en su superficie, que fueron mayores a los presentados en la película de *A. m. xolocotziana*. Estos valores de espesor corresponden de acuerdo con Bala *et al.*, (2013), a películas de liberación rápida ya que se encuentran en un rango de 20 a 70 μm además de ser de una sola capa y tener como objetivo su aplicación en la superficie de la lengua.

En un estudio realizado por Norajit *et al.*, (2010) donde encapsulan un extracto de ginseng en películas de alginato con glicerol obtuvieron películas de alginato con un espesor de 70 μm , después del proceso de atrapamiento del extracto las películas alcanzaron un grosor de 105 a 114 μm , aumentando más del 30% de su espesor

inicial al adicionarles el extracto de ginseng. A diferencia de este estudio, las películas *P. A. m. mexicana microfiltrado* y *P. A. m. xolocotziana microfiltrado*, aumentaron menos del 5% de su espesor inicial al adicionar cerca del 24% de extractos de *A. m. mexicana microfiltrado* y *A. m. xolocotziana microfiltrado* en su formulación. En otro estudio realizado por Wang *et al.*, (2017) obtuvieron películas de alginato de sodio y películas de colágeno con alginato de sodio, las primeras fueron de 11 μm y las de colágeno con alginato a diferentes concentraciones fueron de 31 a 33 μm .

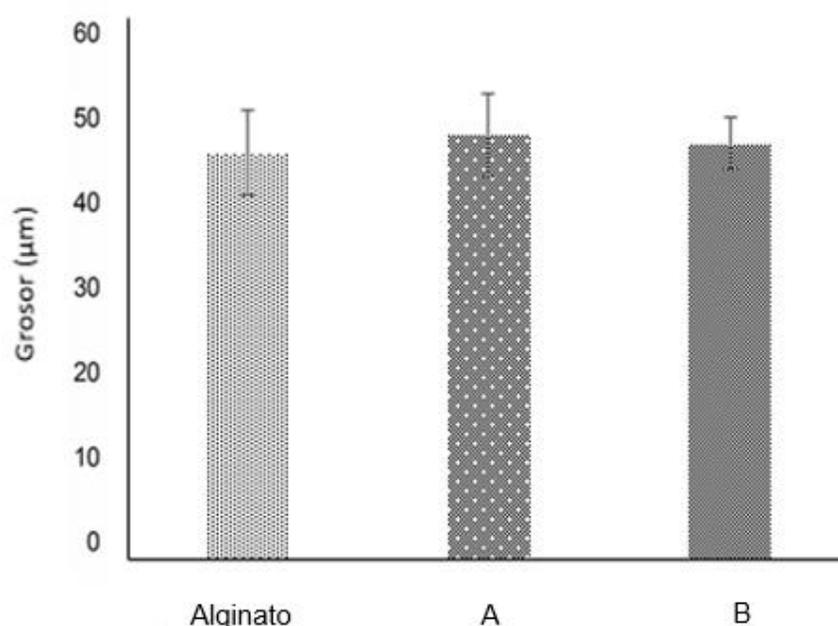


Figura 29.-Grosor promedio de las películas *P. A. m. mexicana microfiltrado* (A) y *P. A. m. xolocotziana microfiltrado* (B)

6.3.3 Solubilidad

Para medir la solubilidad de las películas se utilizó el pico de absorción máxima de los extractos obtenido a través de un barrido espectral en la región UV-VIS, el pico de mayor absorción fue a 560 nm. Se midió el tiempo de solubilidad para las películas *P. A. m. mexicana microfiltrado* y *P. A. m. xolocotziana microfiltrado*, comparando estos resultados con los obtenidos previamente en películas de

alginato al 1.5% (figura 30), se puede observar que el tiempo aumento de 8 a 9 min después del proceso de atrapamiento de los metabolitos de *A. m. mexicana microfiltrado* y *A. m. xolocotziana microfiltrado*, sin embargo, debemos tener en cuenta que estos resultados deben ser considerados como representativos para poder predecir el comportamiento de estas películas en ensayos *in vivo*, debido a que el método para determinar la solubilidad no imita de manera satisfactoria las condiciones fisiológicas involucradas (Borges *et al.*, 2015).

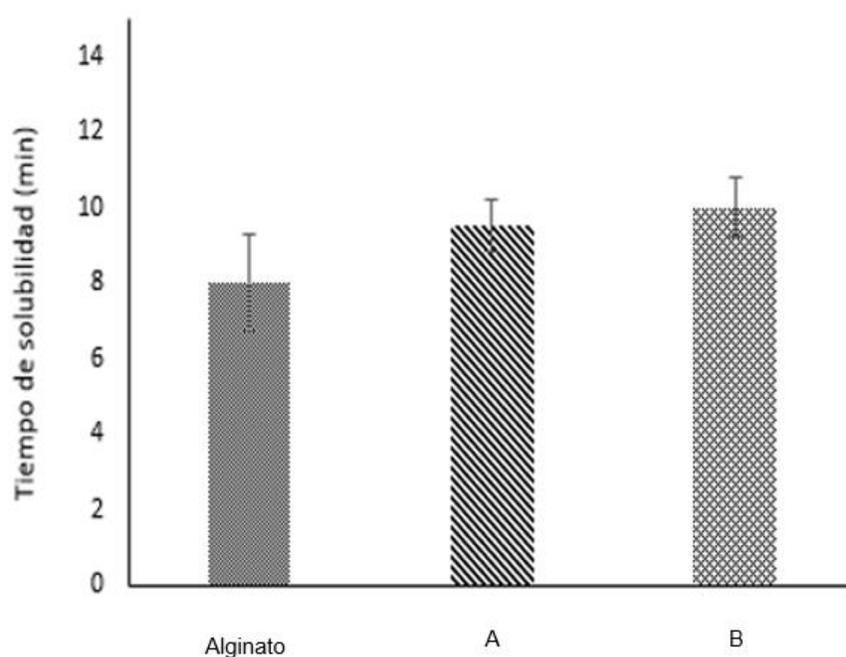


Figura 30.-Tiempo de solubilidad de las películas P. A. m. mexicana microfiltrado y P. A. m. xolocotziana microfiltrado.

La prueba se realizo en buffer de fosfatos a pH 6.4, 37 ± 0.5 ° C y 100 rpm.

6.3.4 Color

El color de las películas puede influenciar la preferencia del consumidor hacia un producto por lo que es una propiedad importante de evaluar en estos materiales. En la tabla 11 se resumen los valores de las coordenadas del espacio de color CIE $L^*a^*b^*$. Recordando que el parámetro L^* indica que tan luminoso (100) u oscuro (0) es el color, podemos observar que las películas son menos luminosas que las

películas sin extracto ya que estas presentaron una $L^*=98.121$, por otra parte el parámetro a^* que se refiere a las coordenadas rojo (+b) -verde (-b), las películas presentaron valores dentro del color verde y finalmente el parámetro b^* que se refiere a las coordenadas amarillo (+b) - azul (-b) las películas presentaron valores hacia las coordenadas cromáticas del amarillo. Estos resultados concuerdan con la apariencia visual de las películas, ya que la película como se había mencionado anteriormente las películas de alginato con extractos tiene un color verde.

Tabla 11.-Valores de las coordenadas L, a y b de las películas con extractos

Película	L^*	a^*	b^*
<i>P. A. m. mexicana</i> microfiltrado	65.359	-1.728	32.381
<i>P. A. m. xolocotziana</i> microfiltrado	69.284	-3.623	54.402

6.3.5 Caracterización por FT-IR de películas con extractos

La figura 31 muestra el espectro infrarrojo de las películas con extractos, en ella se puede ver que tanto *P. A. m. mexicana microfiltrado* y *P. A. m. xolocotziana microfiltrado* tienen una huella macromolecular similar en la que se distinguen especialmente los picos característicos del alginato de sodio debido a la baja concentración de los extractos en las películas, en el espectro podemos observar en la región de 1605 y 1410 cm^{-1} que se asocian con las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de aniones carboxilato, respectivamente. Además de la banda fuerte y ancha a 3293 cm^{-1} relacionada con el estiramiento de O-H, este pico presento un alargamiento debido a la presencia del extracto ya que estos presentaban un pico ancho a 3262 cm^{-1} , el cual corresponde a la asociación intermolecular (polímero) del grupo funcional OH, reportado en la presencia de la familia de los fenoles y alcoholes en las bandas de $3200 - 3400\text{ cm}^{-1}$.

Las películas *P. A. m. mexicana* microfiltrado y *P. A. m. xolocotziana* microfiltrado también presentan la banda de estiramiento C-H alifático débil a 2926 cm^{-1} , y los picos alrededor de 1298 cm^{-1} (estiramiento en C-O), 1124 cm^{-1} (estiramiento en C-C), 1086 cm^{-1} (estiramiento en C-O), 1031 cm^{-1} (C-O-C Estiramiento), 948 cm^{-1} (estiramiento C-O), 1591 y 1405 cm^{-1} debido a aniones carboxilo (vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas). Los picos ubicados en la región de 1000 a 1600 cm^{-1} presentaron un alargamiento posiblemente por la presencia de los metabolitos, como se había descrito anteriormente los grupos funcionales $-\text{NO}_2$ alifáticos y aromáticos originados por la vibración molecular $\nu\text{ NO}$ asimétrica presentan señal a 1380 cm^{-1} , los grupos hidroxilo debida a la presencia de fenoles por la vibración $\delta\text{ O-H}$ emiten un pico a 1263 cm^{-1} y la presencia de aminas se expresa en el espectro por la vibración molecular $\nu\text{ C-N}$ a 1015 cm^{-1} .

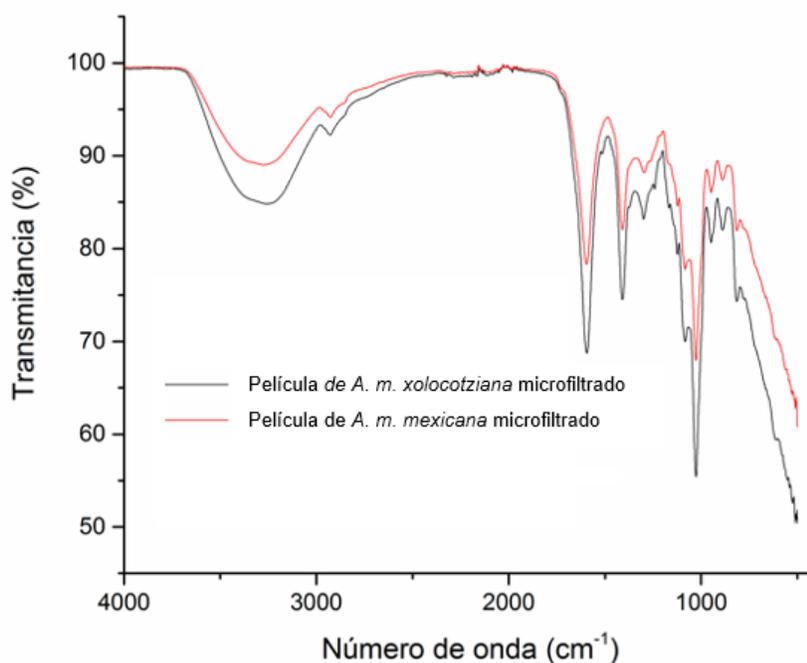


Figura 31.-Espectro FT-IR de películas *P. A. m. xolocotziana* microfiltrado y *P. A. m. mexicana* microfiltrado

6.3.6 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de las películas con extractos

En la figura 32 se muestran las micrografías obtenidas de la película formulada a 1.5 % de alginato de sodio y extracto de *A. m. mexicana microfiltrado*, en la figura 32A se muestra un fragmento de la película con un aumento de 10x, en esta se alcanza a observar una superficie lisa, pero con imperfecciones en su superficie. La figura 32B con un aumento de 110x permite visualizar que el fragmento de película es heterogéneo, presenta irregularidades en su superficie, esto se puede observar en una tonalidad blanca y brillante que contrasta con el resto de la superficie. La película presenta pequeñas protuberancias que pueden atribuírsele a la presencia de los metabolitos de *A. m. mexicana microfiltrado*, como se mencionó en la sección 6.3.1, estas películas presentaban gránulos en su superficie, lo que hace que la película no sea del todo homogénea.

La figura 32C es un fragmento de la película desde un punto transversal a 110x, en esta imagen podemos observar la porosidad que presentan las películas, además se puede apreciar el grosor de la película que de acuerdo a las mediciones tomadas con ayuda del software del microscopio la película tiene un grosor promedio de 21 μm , sin embargo esto solo nos indica el grosor promedio de un fragmento de la película, mientras que en la sección 6.3.2 se muestran los resultados obtenidos mediante un micrómetro.

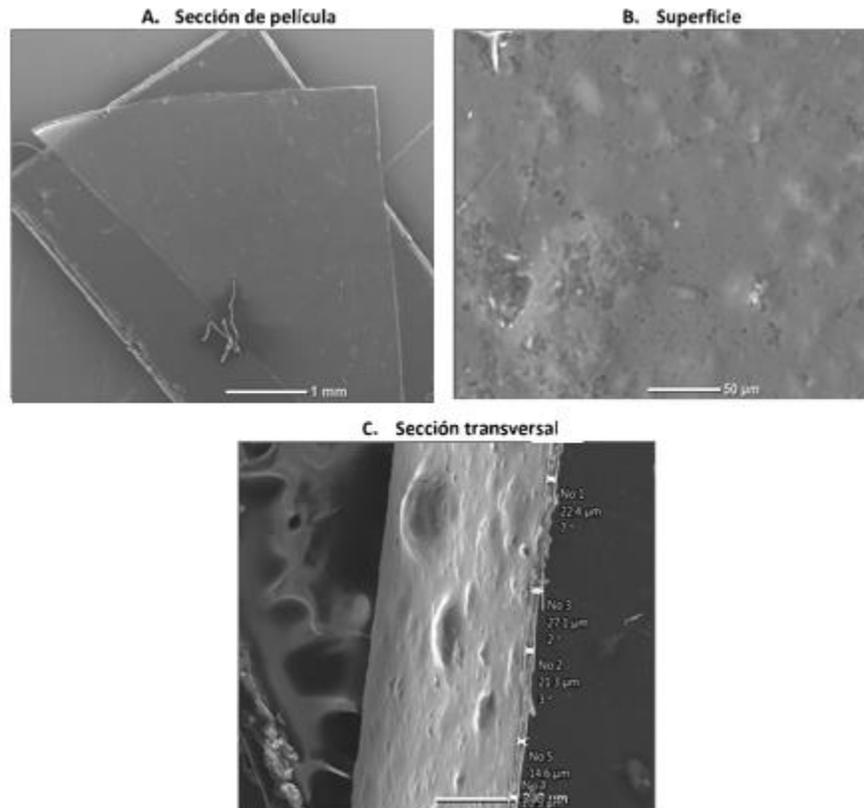


Figura 32.-Micrografía de P. A. m. mexicana microfiltrado

En la figura 33 se muestran las micrografías obtenidas de la película formulada a 1.5 % de alginato de sodio y extracto de *A. m. xolocotziana microfiltrado*, en la figura 33A se muestra un fragmento de la película con un aumento de 20x, en esta se alcanza a observar una superficie lisa, con imperfecciones en su superficie y con líneas en tonalidad blanca. La figura 33B con un aumento de 540x permite visualizar que el fragmento de película es homogéneo, también se puede observar en un tono blanco la presencia de irregularidades en su superficie, estas irregularidades se les atribuyen a los metabolitos de *A. m. xolocotziana microfiltrado*. La figura 33C es un fragmento de la película desde un punto transversal a 80x, en esta imagen se pueden apreciar líneas en tonos blancos, además se puede apreciar el grosor de la película que de acuerdo a las mediciones tomadas con ayuda del software del

6.3.7 Microscopía de Fuerza Atómica

La figura 34A muestra la imagen topográfica de la superficie de la película de alginato de sodio en un área de escaneo de $225 \mu\text{m}^2$, en la imagen se observa que la película *P. A. m. mexicana microfiltrado* tiene una superficie heterogénea y rugosa, la figura 34B es una imagen topográfica 3D de la sección analizada en la que se puede apreciar la rugosidad de la película, la cual se expresa en una escala de color ubicada en el lado derecho de la imagen 34A, las zonas con una coloración oscura corresponden a la presencia de valles y las zonas más claras corresponden a las crestas. Mediante el software NanoScope, se obtuvieron los parámetros cuantitativos de rugosidad R_a (rugosidad promedio aritmética) y R_q (rugosidad media cuadrática), para la película *P. A. m. mexicana microfiltrado* se obtuvo un valor de $R_q = 27.5 \text{ nm}$ y $R_a = 21.3 \text{ nm}$.

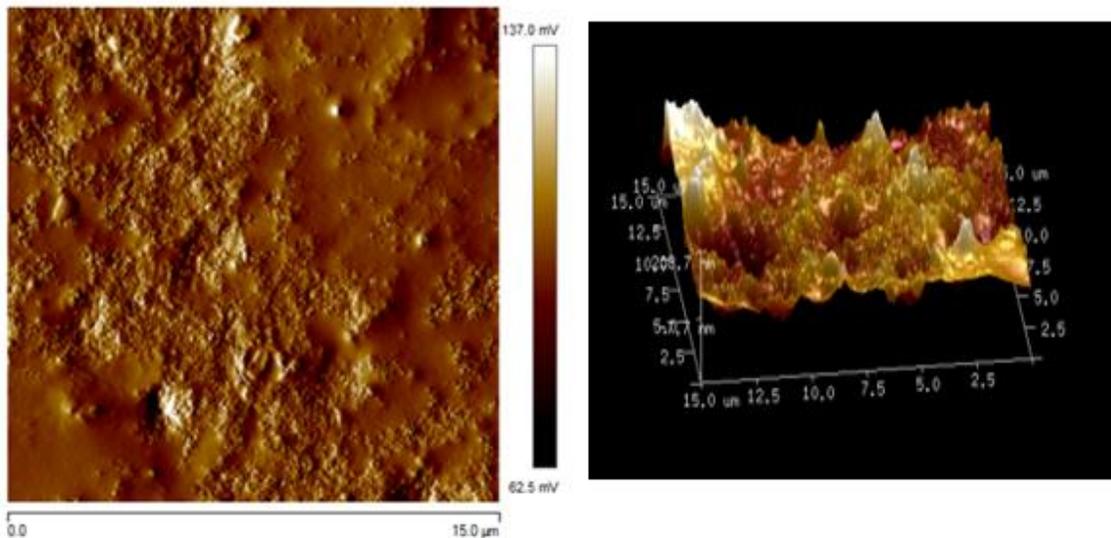


Figura 34.-Imagen topográfica de *P. A. m. mexicana microfiltrado*

La figura 35A muestra la imagen topográfica de la superficie de la película de alginato de sodio en un área de escaneo de $225 \mu\text{m}^2$, al igual que con *P. A. m. mexicana microfiltrado*, en la imagen se observa que la película *P. A. m.*

xolocotziana microfiltrado tiene una superficie heterogénea y rugosa de la que puede observarse en la figura 35B la rugosidad de la película mediante una imagen topográfica 3D de la sección analizada. en la que se puede apreciar la rugosidad de la película, la cual se expresa en una escala de color ubicada en el lado derecho de la imagen 35A, las zonas con una coloración oscura corresponden a la presencia de valles y las zonas más claras corresponden a las crestas. Con ayuda del software NanoScope, se obtuvieron parámetros cuantitativos de rugosidad para la película de P. A. m. *xolocotziana microfiltrado* se obtuvo un valor de $Rq= 45.1 \text{ nm}$ y $Ra=33.7 \text{ nm}$.

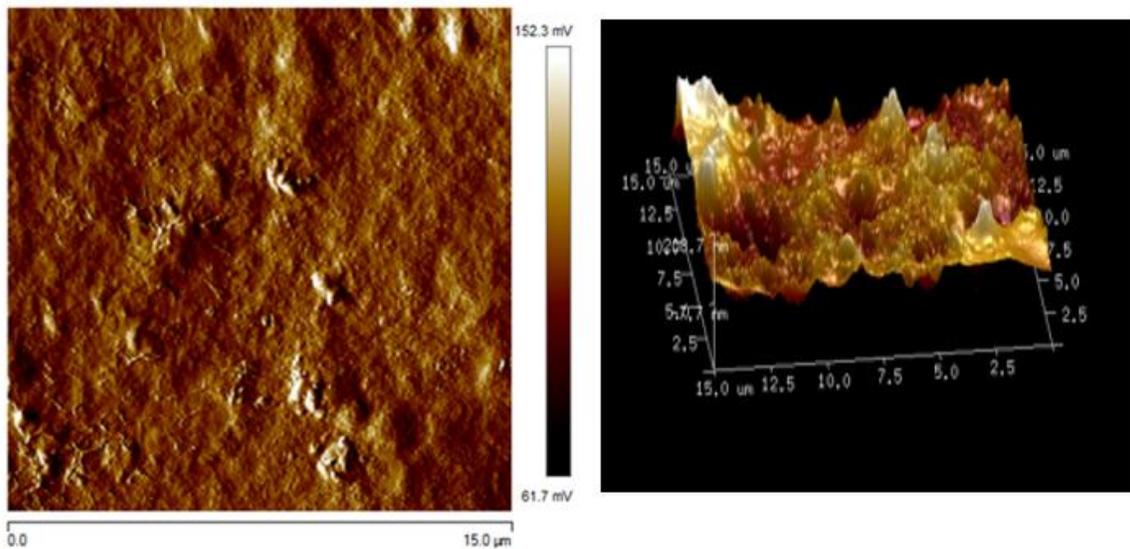


Figura 35.-Imagen topográfica de P. A. m. *xolocotziana microfiltrado*

Los valores de rugosidad obtenidos en las películas P. A. m. *mexicana microfiltrado* y P. A. m. *xolocotziana microfiltrado*, fueron menores a los valores obtenidos en la película de alginato de sodio, entre las dos películas la que presentó menor rugosidad fue la P. A. m. *mexicana microfiltrado*, sin embargo, recordemos que

estos valores no se obtuvieron de una película completa, sino que pertenecen a una sección de 225 μm^2 de cada película.

6.3.8 Nanoindentación

Se determinaron los parámetros mecánicos de *P. A. m. mexicana microfiltrado* y *P. A. m. xolocotziana microfiltrado* de la misma manera que con las películas de alginato de sodio, los valores obtenidos se encuentran en la tabla 12. Comparando los resultados obtenidos de las dos películas y de la película de alginato de sodio, se puede observar que al incluir los extractos de Tmm y *A. m. xolocotziana microfiltrado*, las películas se vuelven más duras, pero también se vuelven más elásticas.

Tabla 12.-Valores de las propiedades mecánicas de las películas

Película	Dureza (MPa)	Modulo elástico (GPa)	Desplazamiento de indentación %
P. A. m. mexicana mf.	123.57 \pm 3.42	1.73 \pm 0.05	7.71 \pm 0.33
P. A. m. xolocotziana mf.	133.97 \pm 12.73	1.49 \pm 0.05	7.94 \pm 0.48
Película de alginato	71.886 \pm 13.501	0.538 \pm 0.072	9.2 \pm 1.4

6.3.9 Potenciación del sueño con pentobarbital de las películas con extractos

Se realizó la prueba de potenciación de sueño a las películas P. *A. m. mexicana* microfiltrado y P. *A. m. xolocotziana* microfiltrado con la finalidad de comprobar que el efecto de los extractos se mantenía después del proceso de atrapamiento en las películas. Como puede verse en la figura 36 el tiempo de latencia y el tiempo de duración de sueño de P. *A. m. mexicana* microfiltrado se mantuvieron menores al de clonazepam, sin embargo, el tiempo de sueño fue mayor que el obtenido por pentobarbital. Estos resultados son similares a los obtenidos por los extractos antes del proceso de atrapamiento.

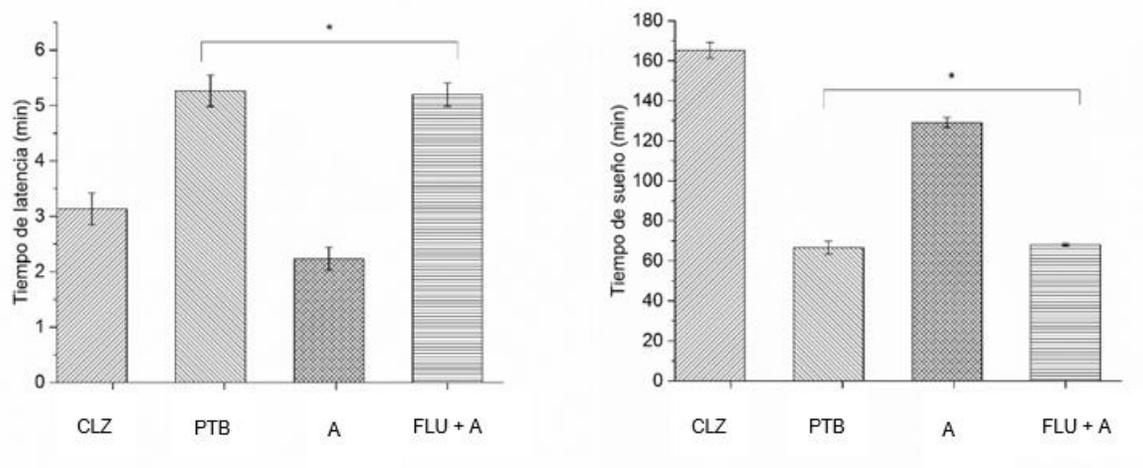


Figura 36.- Prueba de potenciación de sueño de P. *A. m. mexicana* microfiltrado

Donde CLZ: clonazepam, PTB: pentobarbital, A: Película de *A. m. mexicana* microfiltrado, FLU: flumazenil. Cada columna representa la media de 3 mediciones de grupos de n=11 y las barras verticales desviación estándar. *indican la diferencia significativa en comparación al control positivo CLZ ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos con P. *A. m. xolocotziana microfiltrado* fueron similares a los obtenidos con los extractos de *A. m. xolocotziana microfiltrado*, como puede verse en la figura 37, el tiempo de latencia y de duración de sueño también son menores a clonazepam y el tiempo de duración de sueño al igual que con P. *A. m. mexicana microfiltrado* es mayor al obtenido con pentobarbital.

De acuerdo con estos resultados podemos inferir que el alginato de sodio solo está actuando como un acarreador de los metabolitos de *Agastache mexicana* y este no interfiere con el efecto potenciador de sueño que presentan los extractos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana*.

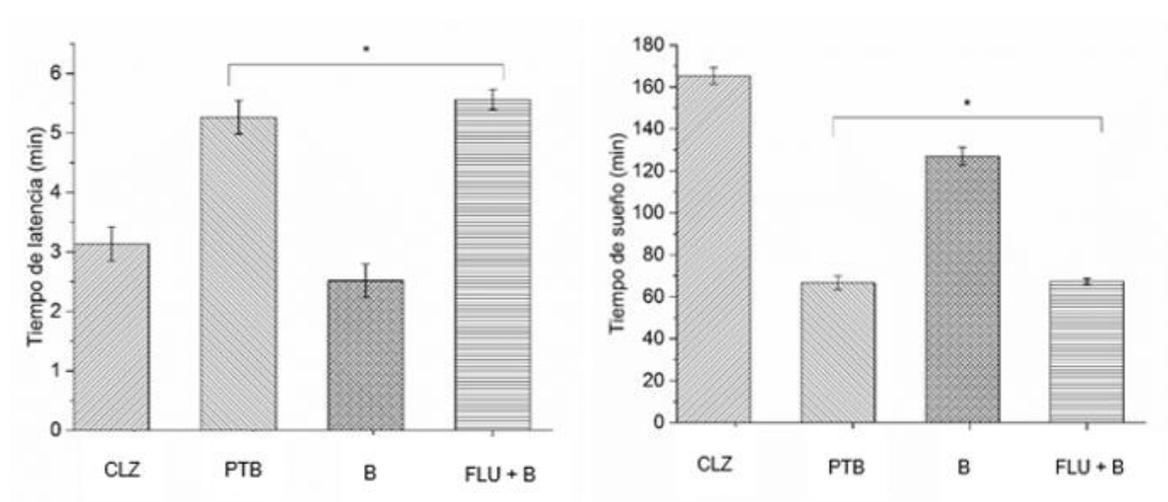


Figura 37.- Prueba de potenciación de sueño de P. Película de *A. m. xolocotziana* microfiltrado

Donde CLZ: clonazepam, PTB: pentobarbital, B: Película de *A. m. xolocotziana* microfiltrado, FLU: flumazenil. Cada columna representa la media de 3 mediciones de grupos de n=11 y las barras verticales desviación estándar. *indican la diferencia significativa en comparación al control positivo CLZ (p<0.05).

Con la finalidad de evaluar el posible mecanismo de acción antes de administrar las películas se administró flumazenil, antagonista GABAérgico que produce el bloqueo específico por inhibición competitiva de los efectos ejercidos en SNC por sustancias que actúan a través de receptores benzodiazepínicos (Bernik *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos tanto para *P. A. m. mexicana microfiltrado* y *P. A. m. xolocotziana microfiltrado* muestran que el tiempo de latencia aumentó a más de 5 min, mientras que el tiempo de sueño disminuyó, alcanzando casi el mismo tiempo que los ratones administrados únicamente con pentobarbital. En el 2015, González-Trujano *et al.*, obtuvieron resultados similares al evaluar tilianina en presencia de flumazenil y WAY100635 (antagonista de los receptores 5-HT de serotonina), debido a que el efecto ansiolítico de tilianina fue prevenido con flumazenil y no con WAY100635 sugieren que el sistema GABAérgico está involucrado en el mecanismo de acción.

Debido al efecto presentado por las películas y considerando que flumazenil es un antagonista GABAérgico se puede sugerir que los metabolitos de los extractos interactúan con el sistema GABAérgico promoviendo la depresión del SNC, sin embargo, es necesario realizar pruebas más específicas que permitan conocer el mecanismo de acción involucrado, como en el caso de la prueba de medición de flujo de iones Cl⁻, la cual de manera *in vitro* permite identificar si el mecanismo de acción es por la vía GABAérgica al existir flujo de iones mediante el canal de cloro en células neuronales.

VII. CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos completos y microfiltrados de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* fueron caracterizados, lo que permitió conocer que después del proceso de microfiltración se preservan los metabolitos que están relacionados con la potenciación de sueño y que se preserva una alta actividad antioxidante. Además, se comprobó que los extractos no son tóxicos en ratones CD1 ($DL_{50} > 5000$ mg/Kg) ni citotóxicos en las líneas celulares C6 y SH-SY5Y ($IC_{50} > 20$ µg/mL).

Los extractos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* a dosis mayores de 10 mg/Kg contribuyeron en la disminución del tiempo de latencia y aumentaron el tiempo de duración del sueño, la mejor dosis fue 100 mg/Kg para ambos extractos.

La caracterización de las películas a diferentes concentraciones de alginato de sodio permitió seleccionar la película para el atrapamiento de los extractos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana* con la finalidad de ser utilizados en una vía de administración oral como películas orodispersables (película a 1.5%).

Por otra parte, los metabolitos contenidos en estas películas preservan la actividad farmacológica de los extractos. Esta actividad fue inhibida mediante el antagonista flumazenil, por lo que se infiere que el posible mecanismo de acción involucra la vía GABAérgica. Las películas obtenidas en este trabajo están dirigidas a contribuir en el área de fitoterapia como un sistema de administración oral capaz de contener, preservar y entregar de manera rápida y eficiente los metabolitos extraídos.

Como perspectiva de este trabajo se pretende realizar estudios específicos que permitan elucidar el mecanismo de acción de los extractos de *A. m. mexicana* y *A. m. xolocotziana*. También se pretende realizar pruebas que permitan complementar la caracterización fisicoquímica de las películas.

VIII. REFERENCIAS

- Alamgir, A. N. M. (2017). Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1: Pharmacognosy (Vol. 73). Springer.
- Al-Lawati, N. M., Patel, S. R., & Ayas, N. T. (2009). Epidemiology, risk factors, and consequences of obstructive sleep apnea and short sleep duration. *Progress in cardiovascular diseases*, 51(4), 285-293.
- Antle M. C. (2015). Sleep: Neural Systems en Wright, J. D. *International Encyclopedia of the Social and Behavioral Sciences*.
- Arzate, I. (2011). Aplicación del análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de superficies biológicas (Doctoral dissertation, Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias de alimentos. Instituto Politécnico Nacional).
- Ashikin, W. H. N. S., Wong, T. W., y Law, C. L. (2010). Plasticity of hot air-dried mannuronate and guluronate-rich alginate films. *Carbohydrate Polymers*, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.02.002.
- Attard E., Attard H., Tanti A., Azzopardi J., Sciberras M., Pace V., Buttigieg N., Randon A. M., Rossi B., Parnis M.J., Vella K., Zammit M. and Inglott A. S. (2015). The Phytochemical Constitution of Maltese Medicinal Plants—Propagation, Isolation and Pharmacological Testing en Rao A. V. & Rao L. G. *The Phytochemical Constitution of Maltese Medicinal Plants – Propagation, Isolation and Pharmacological Testing*. AvE4EvA
- Avidan A, Barkoukis T. (2012) "Review of Sleep Medicine". Third edition. Elsevier., pag 645
- Avidan A. Y. (2010) Normal Sleep en Kryger, M. H. *Atlas of clinical sleep medicine*. Elsevier Health Sciences.
- Awad, H., & Aboul-Enein, H. Y. (2012). A validated HPLC assay method for the determination of sodium alginate in pharmaceutical formulations. *Journal of chromatographic science*, 51(3), 208-214.
- Ayas, N. T., Malhotra, A., & Parthasarathy, S. (2013). To Sleep, or Not to Sleep, That is the Question. *Critical care medicine*, 41(7), 1808.
- Ayola, Y., & Hernandez, M. (2010). Uso de recubrimiento a base de alginato y su efecto en la calidad de la fresa (*fragaria ananasa*) cv. Camarosa. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 9(1).

- Bala, R., Pawar, P., Khanna, S., & Arora, S. (2013). Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. *International journal of pharmaceutical investigation*, 3(2), 67.
- Bernik, M., Ramos, R. T., & Graeff, F. (2017). Effect of single doses of pindolol and d-fenfluramine on flumazenil-induced anxiety in panic disorder patients. *Behavioural brain research*.
- Bhadane, B. S., & Patil, R. H. (2017). Isolation, purification and characterization of antioxidative steroid derivative from methanolic extract of *Carissa carandas* (L.) leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 216-223.
- Bhattarai M, Gupta AK, Fast Dissolving Oral Films: A Novel Trend to Oral Drug Delivery System. *STCJ* 2015;2(1): 58-68
- Bonnet, M. H., Burton, G. G., & Arand, D. L. (2014). Physiological and medical findings in insomnia: implications for diagnosis and care. *Sleep medicine reviews*, 18(2), 111-122.
- Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F., & Simões, S. (2015). Oral films: current status and future perspectives: I—galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*, 206, 1-19.
- Borges, J. G., & Carvalho, R. A. (2015). Orally disintegrating films containing propolis: properties and release profile. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(4), 1431-1439.
- Both, S. Strube, J, Cravatto, G. (2015). Mass transfer enhancement for solid-liquid extractions en Chemat, F., & Strube, J. (Eds.). *Green extraction of natural products: theory and practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Castro, P. M., Fonte, P., Sousa, F., Madureira, A. R., Sarmiento, B., & Pintado, M. E. (2015). Oral films as breakthrough tools for oral delivery of proteins/peptides. *Journal of Controlled Release*, 211, 63-73.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Chaudhary, H., Gauri, S., Rathee, P., & Kumar, V. (2013). Development and optimization of fast dissolving oro-dispersible films of granisetron HCl using Box–Behnken statistical design. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51(2), 193-201.
- Chokroverty, S. (2011). *Medicina de los trastornos del sueño: aspectos básicos, consideraciones técnicas y aplicaciones técnicas*. Elsevier España.

- Cilurzo, F., Cupone, I. E., Minghetti, P., Selmin, F., & Montanari, L. (2008). Fast dissolving films made of maltodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(3), 895-900.
- Contreras, S. Andrea, (2013). Insomnio: generalidades y alternativas terapéuticas de última generación. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(3), 433-441.
- Da Silva, M. A., Krause, A. C., y Kieckbush, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736-742.
- Dasgupta, A., & Klein, K. Combating Oxidative Stress with a Healthy Lifestyle-Chapter 17 en Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease*. Academic Press.
- Daud, A. S., Sapkal, N. P., & Bonde, M. N. (2014). Development of Zingiber officinale in oral dissolving films: Effect of polymers on in vitro, in vivo parameters and clinical efficacy. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 5(3).
- de Castro, F. L., Rodríguez, O. F., Ortega, M. M., & Agüero, L. F. (2012). Abordaje terapéutico del insomnio. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, 38(4), 233-240.
- de Castro-Manglano, P., & Oteo, F. S. (2011). Protocolo diagnóstico y terapéutico del insomnio. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada acreditado*, 10(85), 5772-5776.
- Dinge, A., & Nagarsenker, M. (2008). Formulation and evaluation of fast dissolving films for delivery of triclosan to the oral cavity. *AAPS PharmSciTech*, 9(2), 349-356.
- Doghramji, K., & Choufani, D. (2010). Taking a sleep history. *Foundations of Psychiatric Sleep Medicine*, 95.
- dos Santos, C. D., Scherer, R. K., Cassini, A. S., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2016). Clarification of red beet stalks extract by microfiltration combined with ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, 185, 35-41.
- Dutra, R. C., Pittella, F., Dittz, D., Marcon, R., Pimenta, D. S., Lopes, M. T., & Raposo, N. R. (2012). Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), 971-978.
- Estrada-Reyes, R., Hernández, E. A., García-Argáez, A., Hernández, M. S., Linares, E., Bye, R., & Martínez-Vázquez, M. (2004). Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical systematics and ecology*, 32(7), 685-694.

- Estrada-Reyes, R., Lopez-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O. A., Dorantes-Barrón, A. M., Heinze, G., Aguilar, J. M., & Martínez-Vázquez, M. (2014). Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of ethnopharmacology*, 153(1), 98-110.
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., & Moreno, J. (2010). Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 1-8.
- Franco-Pérez, J., Ballesteros-Zebadúa, P., Custodio, V., & Paz, C. (2012). Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia. *Rev Invest Clin*, 64(2), 182-192.
- Fuller P. M., Zee P. C., & Buxton O. (2010). *Sleep Mechanisms* en Kryger, M. H. *Atlas of clinical sleep medicine*. Elsevier Health Sciences.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueito, E., & Larrahondo, J. E. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development*.
- Gittings, S., Turnbull, N., Roberts, C. J., & Gershkovich, P. (2014). Dissolution methodology for taste masked oral dosage forms. *Journal of Controlled release*, 173, 32-42.
- González-Trujano, M. E., Ponce-Muñoz, H., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., & Estrada-Soto, S. (2015). Depressant effects of *Agastache mexicana* methanol extract and one of major metabolites tilianin. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 8(3), 185-190.
- Guzmán Gutiérrez, S. L., Reyes Chilpa, R., & Bonilla Jaime, H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 591-608.
- Handa S. S. (2008). *An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants* en United Nations Industrial Development Organization, Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.
- Hanrahan, J. R., Chebib, M., & Johnston, G. A. (2015). Chapter Seven-Interactions of Flavonoids with Ionotropic GABA Receptors. *Advances in pharmacology*, 72, 189-200.
- Harbourne N., Marete E., Jacquier J. C., O'Riordan D. (2013). Conventional extraction techniques for phytochemicals en Tiwari, B. K., Brunton, N. P., & Brennan, C. (Eds.). *Handbook of plant food phytochemicals: Sources, stability and extraction*. John Wiley & Sons.

Hardin k. A. y Pandya C. M. (2013). Sleep Loss: Impact on Self-reported Sleepiness, Effort, Performance, and Motivation en Kushida, C. Encyclopedia of sleep. Academic Press.

Hernández-Abreu, O., Durán-Gómez, L., Best-Brown, R., Villalobos-Molina, R., Rivera-Leyva, J., & Estrada-Soto, S. (2011). Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 487-491.

Hong, K. B., Park, Y., & Suh, H. J. (2016). Sleep-promoting effects of the GABA/5-HTP mixture in vertebrate models. *Behavioural brain research*, 310, 36-41.

Hurtado Mariles A. J. (2016) Producción de extractos de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* y evaluación de la actividad anticonvulsiva. Tesis de maestría. UPIBI, IPN.

Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D. M., Hernández-Sandoval, L., & Martínez, M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical biology*, 48(7), 732-739.

Irfan, M., Rabel, S., Bukhtar, Q., Qadir, M. I., Jabeen, F., & Khan, A. (2015). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*.

Jeon, S. J., Park, H. J., Gao, Q., Lee, H. E., Park, S. J., Hong, E., & Ryu, J. H. (2015). Positive effects of β -amyrin on pentobarbital-induced sleep in mice via GABAergic neurotransmitter system. *Behavioural brain research*, 291, 232-236.

Jiménez Medina L. E. (2015). Evaluación farmacológica del efecto sedante de dos subespecies de toronjil. Memoria presentada para obtener el título de Técnico Superior Universitario. Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense.

Johnston, G. A. (2015). Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. *Neurochemistry international*, 89, 120-125.

Karki, S., Kim, H., Na, S. J., Shin, D., Jo, K., & Lee, J. (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 11(5), 559-574.

Ke, G., Xu, W., & Yu, W. (2010). Preparation and properties of drug-loaded chitosan-sodium alginate complex membrane. *International Journal of Polymeric Materials*, 59(3), 184-191.

Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial crops and products*, 61, 41-48.

Konishi, T. (2014). 5 Dual Function of Food Factors as Pharmacological Molecules. *Clinical Aspects of Functional Foods and Nutraceuticals*, 87.

Kryger M., Roth T., Dement W. "Principles and Practice of Sleep Medicine, Fifth Edition: Pharmacologic Treatment". 2011, Chapter 82, 916-930

Kuete, V., Seo, E. J., Krusche, B., Oswald, M., Wiench, B., Schröder, S., & Efferth, T. (2013). Cytotoxicity and pharmacogenomics of medicinal plants from traditional Korean medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Kulig, D., Zimoch-Korzycka, A., & Jarmoluk, A. (2017). Cross-linked alginate/chitosan polyelectrolytes as carrier of active compound and beef color stabilizer. *Meat Science*, 123, 219-228.

Kumar, D. S. (2016). *Herbal Bioactives and Food Fortification: Extraction and Formulation (Vol. 4)*. CRC Press.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25(4), 726-732.

Leach, M. J., & Page, A. T. (2015). Herbal medicine for insomnia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep medicine reviews*, 24, 1-12.

Li S., Shahidi F., y Ho C-T. (2016). Chemistry of Functional Beverages en Shahidi, F., & Alasalvar, C. (Eds.). *Handbook of Functional Beverages and Human Health (Vol. 11)*. CRC Press.

Lin, D., Zhao, Y., (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 6: 60-76.

López-Rubalcava, C., & Estrada-Camarena, E. (2016). Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Journal of ethnopharmacology*, 186, 377-391.

Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54(4), 275-287.

Makkar, H., Blümmel, M., Borowy, N. K., & Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2), 161-165.

- Matiacevich, S., Riquelme, N., & Herrera, M. L. (2015). Conditions to prolonged release of microencapsulated carvacrol on alginate films as affected by emulsifier type and pH. *International Journal of Polymer Science*, 2015.
- Matias I., Buosi, A. S., & Gomes, F. C. A. (2016). Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. *Neurochemistry international*, 95, 85-91.
- Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Abreu O. A., Molina E., & Yordi E. G. (2015). Coumarins—An Important Class of Phytochemicals.
- Mendelson W. (2010). Pharmacology en Kryger, M. H. Atlas of clinical sleep medicine. Elsevier Health Sciences.
- Modell, W., y Place, D. J. (2013). *The Use of Drugs: Principles of Pharmacology and Therapeutics for Nurses*. Springer.
- Möhler H. (2010). Physiology and Pharmacology of the GABA System: Focus on GABA Receptors en Monti, J. M., Pandi-Perumal, S. R., & Möhler, H. (Eds.). *GABA and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*. Springer Science & Business Media.
- Mohler H. (2015). The Legacy of the Benzodiazepine Receptor: From Flumazenil to Enhancing Cognition in Down Syndrome and Social Interaction in Autism en *Advances In Pharmacology Diversity and Functions of GABA Receptors: A Tribute to Hanns Mohler, Part A*. Academic Press, Elsevier.
- Naman, C. B., Benatrehina, P. A., & Kinghorn, A. D. (2017). Pharmaceuticals, Plant Drugs en *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd edition, Volume 2, Elsevier., page 93.
- Navarrete, F. F., & Aguirre, Y. V. (2012). Diagnóstico y tratamiento del insomnio. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(23), 1406-1411.
- Norajit, K., Kim, K. M., & Ryu, G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 377-384.
- Ortega G. M., Bermello, A., Guerra, M., Michelena, G. L., Castillo, G., Armenteros, S., & Legrá, S. (2007). Estudios de separación y caracterización de pigmento en caldos de fermentación de *Botryodiplodia theobromae*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(3), 27
- Ostrowska-Czubenko, J., y Gierszewska-Druzynska, M. (2009). Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, 77, 590-598.
- Ozdemir, M., y Floros, J. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*. 84:116–123.

- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 299-301.
- Parati G., Lombardi C, Mancía G. (2013). Sleep and the Cardiovascular System en Kushida, C. *Encyclopedia of sleep*. Academic Press.
- Pereira, V. A., de Arruda, I. N. Q., & Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180-188. l a
- Pollak, C., Thorpy, M. J., & Yager, J. (2010). *The encyclopedia of sleep and sleep disorders*. InfoBase publishing.
- Rama, A. N., & Zachariah R. Normal human sleep en Kushida, C. (2013). *Encyclopedia of sleep*. Academic Press.
- Ramana, M. V. (2014). Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *thrysiflorum*. *European Journal of Academic Essays*, 1(5), 5-9.
- Re, R., & et.al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rhim, J. W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT*, 37: 323-330.
- Roth T., Roehrs T. (2010) "Medications and Sleep Pharmacotherapy for Insomnia". *Sleep Medicine Clinics*, Volume 5, Issue 4, Pages 529-539.
- Rzedowski, G. C. de, y J. Rzedowski. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología A. C., y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
- Salazar Aranda, R., Rodríguez, T., Yael, C., Alanís Garza, B. A., Pérez López, L. A., & Waksman de Torres, N. (2009). Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. *Medicina universitaria*, 11(44), 156-164.
- Santillán-Ramírez, M. A., López-Villafranco, M., 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(2), 513-524.
- Sarris, J., Panossian, A., Schweitzer, I., Stough, C., & Scholey, A. (2011). Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. *European neuropsychopharmacology*, 21(12), 841-860.

Sateia M. J. & Thorpy M. J. (2017). Classification of Sleep Disorders en Principles and Practice of Sleep Medicine. Elsevier.

Sateia, M. J. (2010). Current Advances in the Pharmacotherapy of Insomnia: Pipeline Agents en Sateia, M. J., & Buysse, D. (Eds.). Insomnia: Diagnosis and Treatment. CRC Press.

Shaik, S., Mkize, L., Khumalo, M., & Singh, N. (2015). Green synthesis of nano-silver particles from leaf and stem extracts of Iboza (*Tetradenia riparia*). African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 12(6), 33-38.

Sibaja, B., Culbertson, E., Marshall, P., Boy, R., Broughton, R. M., Solano, A. A., & Auad, M. L. (2015). Preparation of alginate–chitosan fibers with potential biomedical applications. Carbohydrate polymers, 134, 598-608.

Sievens-Figueroa, L., Bhakay, A., Jerez-Rozo, J. I., Pandya, N., Romañach, R. J., Michniak-Kohn, B., ... & Davé, R. N. (2012). Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS Class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. International journal of pharmaceutics, 423(2), 496-508.

Silva, B. M., Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F., & Simões, S. (2015). Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. International journal of pharmaceutics, 494(1), 537-551.

Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal Enology Viticulture, 16, 144-158.

Slavkova, M., & Breitzkreutz, J. (2015). Orodispersible drug formulations for children and elderly. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 75, 2-9.

Slavkova, M., & Breitzkreutz, J. (2015). Orodispersible drug formulations for children and elderly. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 75, 2-9.

Sullivan S. (2010) "Sleep Medicine Insomnia Pharmacology". Medical Clinics of North America, Volume 94, Issue 3, Pages 563-580

Sun, Q., Han, Z., Wang, L., & Xiong, L. (2014). Physicochemical differences between sorghum starch and sorghum flour modified by heat-moisture treatment. Food chemistry, 145, 756-764.

Tedesco, M. P., Monaco-Lourenço, C. A., & Carvalho, R. A. (2017). Characterization of oral disintegrating film of peanut skin extract—Potential route for buccal delivery of phenolic compounds. International journal of biological macromolecules, 97, 418-425.

Valencia, G., Garín, M. (2010). Manual de prácticas de productos naturales (1a Ed.). México D.F.

Verano, J., González-Trujano, M. E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., & Pellicer, F. (2013). Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 110, 255-264.

Villet, S., Vacher, V., Colas, A., Danno, K., Masson, J. L., Marijnen, P., & Bordet, M. F. (2016). Open-label observational study of the homeopathic medicine *Passiflora Compose* for anxiety and sleep disorders. *Homeopathy*, 105(1), 84-91.

Visser, J. C., Eugresya, G., Hinrichs, W. L., Tjandrawinata, R. R., Avanti, C., Frijlink, H. W., & Woerdenbag, H. J. (2017). Development of orodispersible films with selected Indonesian medicinal plant extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 7, 37-46.

Wang, Z., Hu, S., & Wang, H. (2017). Scale-Up Preparation and Characterization of Collagen/Sodium Alginate Blend Films. *Journal of Food Quality*, 2017.

Wei, B., Li, Q., Fan, R., Su, D., Chen, X., Jia, Y., & Bi, K. (2014). Determination of monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in rat brain samples by UFLC-MS/MS for the study of the sedative-hypnotic effects observed during treatment with *S. chinensis*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 88, 416-422.

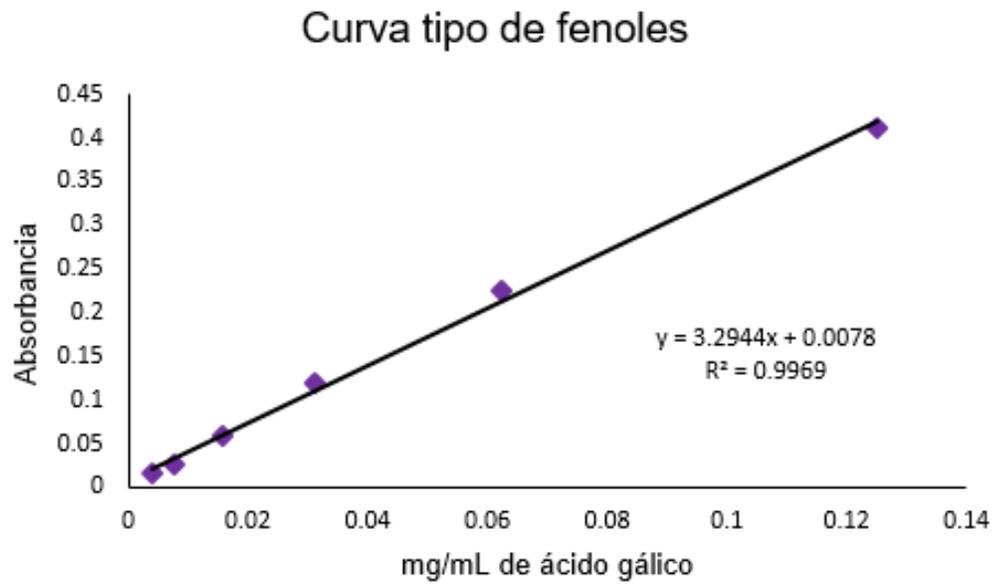
Xu, L. L., Shi, L. L., Cao, Q. R., Xu, W. J., Cao, Y., Zhu, X. Y., & Cui, J. H. (2014). Formulation and in vitro characterization of novel sildenafil citrate-loaded polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer-based orally dissolving films. *International journal of pharmaceutics*, 473(1), 398-406.

Zhang, Y., Li, M., Kang, R. X., Shi, J. G., Liu, G. T., & Zhang, J. J. (2012). NHBA isolated from *Gastrodia elata* exerts sedative and hypnotic effects in sodium pentobarbital-treated mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(3), 450-457.

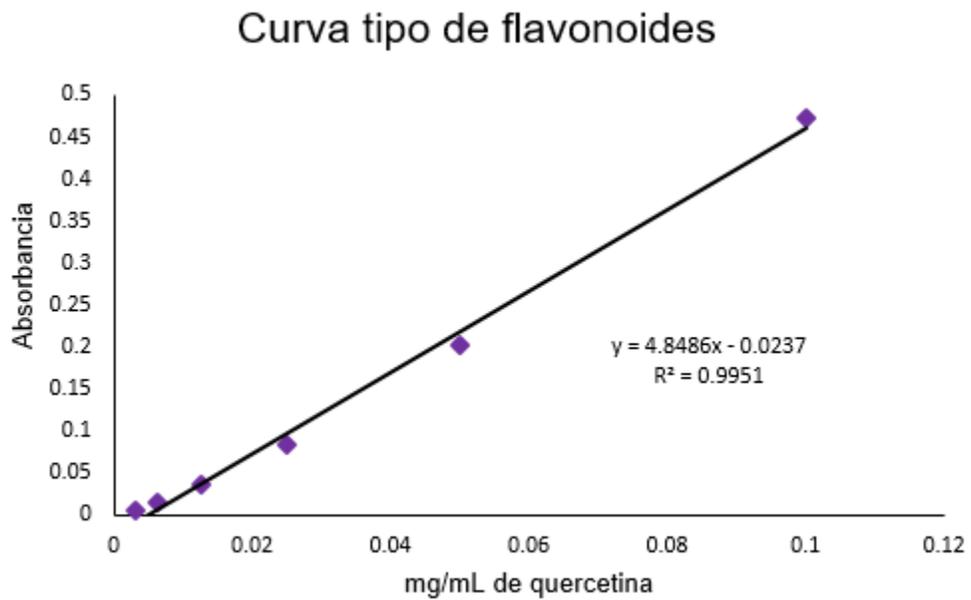
Zhao, Y., Quan, P., & Fang, L. (2015). Preparation of an oral thin film containing meclizine hydrochloride: In vitro and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*, 496(2), 314-322.

IX. ANEXOS

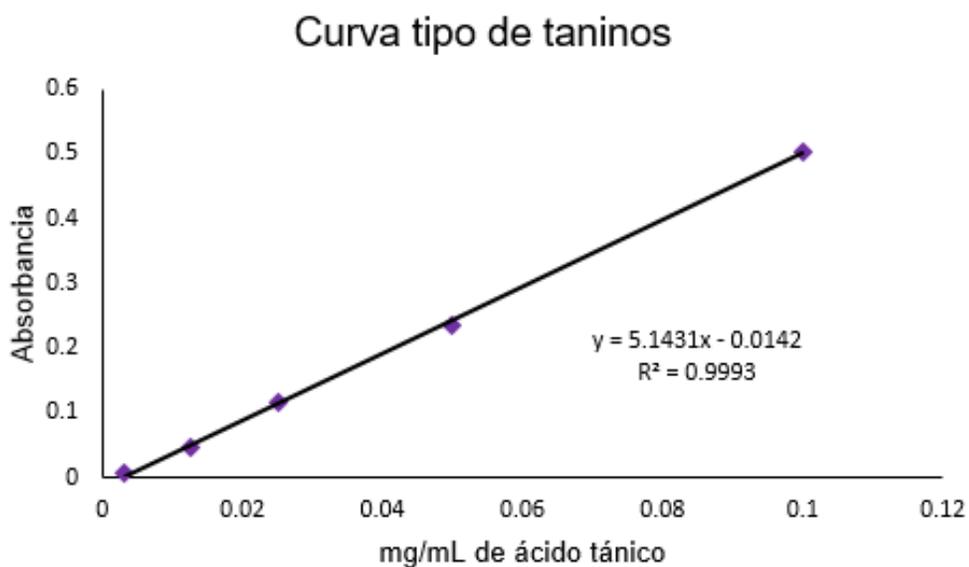
Anexo 1



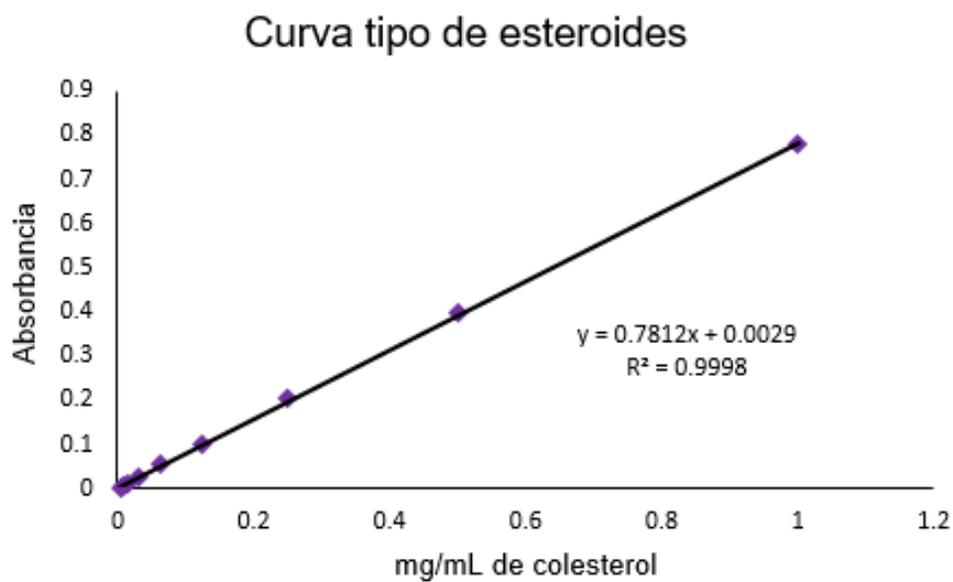
Anexo 2



Anexo 3

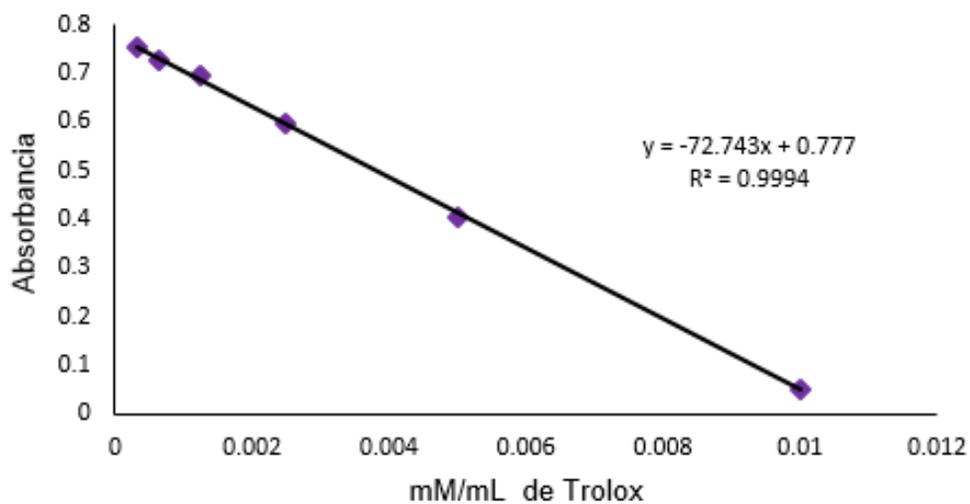


Anexo 4



Anexo 5

Curva tipo de Trolox para DPPH



Anexo 6

Curva tipo de Trolox para ABTS

