

Transetosomas como sistema de encapsulación de *Agastache mexicana*

Vera Pérez Jonathan^{1*}, Martínez Cortés Dulce Maribel¹, Gómez y Gómez Yolanda de las Mercedes, Cerón Montes Genaro Iván², Quezada Cruz Maribel²

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Av. Acueducto s/n Barrio La Laguna, Ticomán Del. Gustavo A. Madero. México, D.F. C.P. 07340

²Universidad Tecnológica de Tecámac. Carretera Federal México - Pachuca, Km. 37.5, Predio Sierra Hermosa, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México.

*Autor para correspondencia: jonathan_vp15@live.com.mx

Recibido:

19/junio/2017

Aceptado:

25/octubre/2017

Palabras clave

Transetosomas,
encapsulación, *Agastache*.

Keywords

Transetosomes,
encapsulation, *Agastache*.

RESUMEN

El uso de plantas como *Agastache mexicana* en el tratamiento fitoterapéutico ante diferentes afecciones como trastornos relacionados al sistema nervioso central, enfermedades gastrointestinales y cardiovasculares, ha dado origen a la búsqueda de sistemas de encapsulación que aseguren el atrapamiento, la liberación, la manejabilidad y preservación de sus compuestos activos. En este trabajo se propone a los transetosomas como matriz de encapsulación debido a su biocompatibilidad, capacidad de atrapamiento entre otras propiedades fisicoquímicas atribuidas a su tamaño submicrométrico. Se logró encapsular un extracto etanólico de *Agastache mexicana* en transetosomas con un tamaño de 722nm, y morfología esférica, se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía DIC, mediante microscopía de fluorescencia y espectrometría FT-IR se comprobó el atrapamiento del extracto. Se comprobó que los transetosomas son capaces de encapsular un extracto etanólico de *A. mexicana*, con lo que se pretende que estos sistemas puedan ser utilizados en extractos de plantas semejantes.

ABSTRACT

The use of *Agastache mexicana* as a phytotherapeutic treatment for different affections such as disorders of the central nervous system, gastrointestinal and cardiovascular diseases has led to the search for encapsulation systems that ensure the entrapment, release, manipulation and preservation of the active compounds. In this work, there are proposed the transethosomes as encapsulation matrix, due to its biocompatibility, entrapment capacity among other physicochemical properties attributed to its submicrometric size. It was possible to encapsulate an ethanolic extract of *Agastache mexicana*, in transethosomes with a size of 722nm and spherical morphology, was characterized by scanning electron microscopy, DIC microscopy and by fluorescence microscopy and FT-IR spectrometry. It was verified that the transethosomes can encapsulate an ethanolic extract of *A. mexicana*, with what it is intended that these systems be used in similar plant extracts.

Introducción

El género *Agastache* pertenece a la familia *Lamiaceae*, que comprende 22 especies de hierbas medicinales, aromáticas y perennes, la mayoría de las plantas de este género crecen silvestres en el sudeste de Asia y América del Norte, de estas plantas 12 son endémicas de México siendo la especie *Agastache mexicana* una de las más importantes de este género debido a su enorme comercialización y a su uso extensivo en la medicina tradicional mexicana como sedante, antidepresivo, antihipertensivo, en problemas gastrointestinales, en diferentes tipos de dolor y como antifúngico, esto mediante extractos, compuestos puros, infusiones (tisanas o tés), tinturas, partes de las plantas cortadas o pulverizadas (Zielińska & Matkowski, 2014; Estrada-Reyes *et al.*, 2014; Salazar, 2009; Juárez *et al.*, 2015).

Los problemas actuales con el uso de moléculas bioactivas de esta y otras plantas están relacionados con la protección de sus propiedades frente a factores ambientales, su solubilidad tanto en agua como en biofluidos y en su biodisponibilidad, (Pinho *et al.*, 2013).

Ante estas problemáticas un enfoque eficaz es el empleo de la encapsulación que proporciona a los principios activos una barrera eficiente ante el medio ambiente y/ o interacciones químicas, así mismo la extensión de su vida útil. (Coronel y San Martín, 2014). Además, ofrece beneficios como; una mayor capacidad de venta, novedosa funcionalidad y una mejor biodisponibilidad, (Kanekanian, 2013; Pasukamonset *et al.*, 2016).

De los diferentes sistemas de encapsulación existentes se ha propuesto el uso de liposomas (cápsulas de bicapas de fosfolípidos construidos artificialmente, se describen como partículas esféricas con tamaños en el rango nanométrico al micrómetro) ya que ha sido utilizado ampliamente en áreas de alimentos y fármacos tanto en la investigación como en la industria. (Ghorbanzade *et al.*, 2016). De estos liposomas se deriva una nueva generación llamada transetosomas que están compuestos de fosfolípidos, etanol y un activador o surfactante, y que tienen una alta capacidad de atrapamiento de principios activos de hasta 325 Kda (Abdulbaqi *et al.*, 2016). Además de ofrecer numerosos beneficios, incluyendo la facilidad de manejo, estabilidad mejorada, protección contra la oxidación, retención de ingredientes volátiles y liberación controlada.

El objetivo de esta investigación es la encapsulación de un extracto etanólico de *Agastache mexicana* con transetosomas con el fin de proporcionar todos

los beneficios que conlleva el utilizar el sistema de encapsulación etosomal.

Materiales y métodos

Material vegetal

La planta *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*. (Toronjil blanco) fue adquirida en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México, el ejemplar de esta planta está depositado en el herbario del instituto mexicano del seguro social IMSS con número de voucher 16259.

Preparación del extracto etanólico de *A. mexicana xolocotziana*

Las partes aéreas de *A. mexicana xolocotziana* fueron secadas y pulverizadas, posteriormente se colocaron 10 g de este material vegetal en 90 mL de etanol, el extracto obtenido se filtró convencionalmente y se obtuvo un porcentaje de sólidos del 10.63 %.

Formulación de transetosomas y encapsulados

Se utilizó el método de inyección fría de Zhaowu *et al.*, 2009 con ligeras modificaciones, donde la fase orgánica (etanol) disuelve la lecitina de soya y Tween 80 en una relación 100:10 (p:p), con un sistema de goteo a un caudal de 200 μ L/min se inyecta la fase acuosa, después se homogeneiza en un baño de ultrasonido durante 5 min.

Para la formulación de los encapsulados transetosomales se empleó la misma metodología y en la fase hidrofílica se agregó el 2% de extracto de *A. Mexicana xolocotziana* respecto a la matriz lipídica.

Caracterización de la estructura y morfología de transetosomas y encapsulados

Microscopía de campo claro y de contraste diferencial interferencial (DIC, Nomarski)

Se utilizó un microscopio de la marca Leica de campo claro y con DIC para visualizar la estructura y morfología transparente de los etosomas, aprovechando los cambios del índice de refracción.

Microscopía electrónica de barrido

La estructura superficial de los transetosomas fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido empleando un microscopio electrónico de barrido JEOL JCM-6000 plus.

Determinación de tamaño

Se utilizó un microscopio Leica con la técnica DIC, una cámara Lumnera y el software Image-Pro Insight.

Comprobación del atrapamiento

Microscopía de fluorescencia

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon para observar el extracto atrapado en los transetosomas debido a la fluorescencia de clorofila.

Espectroscopía ATR-FTIR

Se analizó los transetosomas, el extracto antes y después de encapsular mediante espectrometría infrarroja en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum Two, en un intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} .

Resultados y discusión

Caracterización de morfología y estructura

Microscopía de campo claro y DIC

El uso de la técnica DIC permite constatar de manera simplificada la formación de transetosomas. En la figura 1A, se observa la morfología esférica común de los liposomas y que comparte con los transetosomas, esto indica que la suspensión hidroalcohólica en la que se encuentran no modifica su morfología, en la imagen 1B se observa con detalle la morfología esférica de los transetosomas debido al desfase del índice de refracción que permite hacer esta técnica, logrando obtener imágenes con relieves en 3D, que ayuda a percibir la estructura multilamelar de los transetosomas, llamada así por la formación de multicapas. En ambas micrografías se observa diversos tamaños. Las micrografías obtenidas por DIC, permitieron calcular un tamaño promedio de 722 ± 35 nm. Sin embargo, el tamaño de los liposomas puede variar debido al método de ultrasonido como lo reporta Moreno et al., 2016.

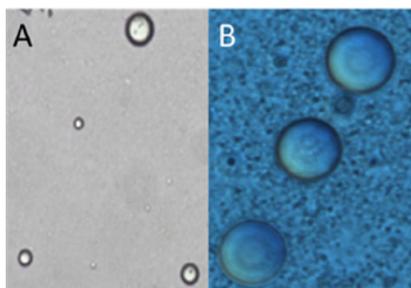


Figura 1. Micrografías de transetosomas obtenidas en campo claro(A) y mediante la técnica DIC (B), con acercamiento 80X.

Microscopía electrónica de barrido

La figura 2 muestra la micrografía a 15000 aumentos, en la cual se aprecia con mayor definición las vesículas presentes después del proceso de inyección fría. Se muestra una gran cantidad de partículas submicrométricas. Mediante esta técnica se puede saber el tamaño aproximado de vesícula, que en comparación de la técnica DIC es menor (500 nm). En esta micrografía se observan partículas esféricas y semiesféricas contrastadas de en color blanco. Debido a que la técnica se realiza a un alto vacío se muestra que algunas vesículas pierden su morfología y tienden a formar agregaciones. De acuerdo a Abdulbaqi et al., 2016, las vesículas con tamaños inferiores a un micrómetro son aptas para aplicaciones tópicas e inferiores a 300nm son adecuadas para aplicaciones dérmicas. El uso de MEB permite elucidar la morfología de los transetosomas y además de mostrar información complementaria a la microscopía DIC.

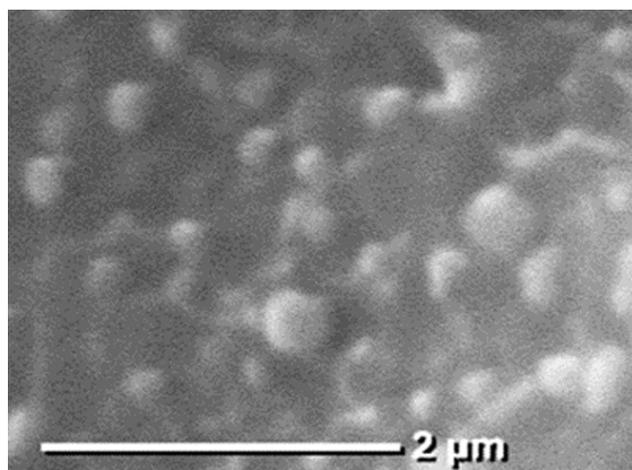


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de transetosomas vistas a 15000X.

Comprobación del atrapamiento

Análisis mediante espectroscopia infrarroja FT-IR

Se empleó la espectroscopia infrarroja con el fin de comprobar la encapsulación del extracto de *Agastache mexicana*. Para ello, una vez obtenidos los transetosomas con el extracto, se desestabilizó la suspensión obtenida a un pH de 2, se centrifugó y posteriormente se rompieron los etosomas con tritón X-100 y se hizo una extracción etanólica con el sedimento. Posteriormente se analizó mediante FT-IR.

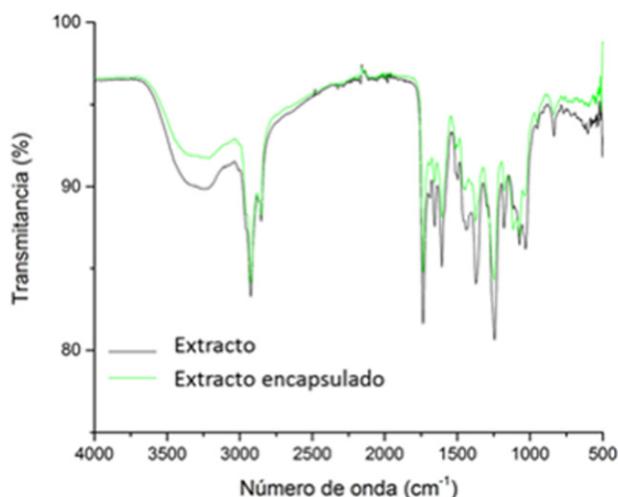


Figura 3. Espectro infrarrojo de extracto etanólico de *A. mexicana* antes y después de encapsular.

La figura 3 muestra como resultado los dos espectros del extracto de *Agastache mexicana*, en donde se muestra una macro composición semejante, diferenciada solo por la intensidad de la transmitancia, indicando mayor concentración en el espectro del extraño inicial. La similitud de las bandas después del proceso de encapsulación indica que se están conservando las características (grupos funcionales). Se identifica la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides a los que se les atribuyen las actividades biológicas mencionadas en la introducción. En ambos espectros de acuerdo a 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 a 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.

De manera complementaria se muestran los espectros infrarrojos en la figura 4 de los transetosomas en suspensión líquida y de la matriz seca. Donde la suspensión indica una fuerte señal en las bandas de 3700-3100 y 1700-1600 cm⁻¹ que corresponden a la vibración del grupo O-H, lo que indica la presencia de agua, que no permite la identificación de los grupos funcionales de los precursores. Sin embargo, la amplitud del pico ubicado

aproximadamente en 3700 cm⁻¹ indica una interacción de los grupos O-H del agua y de los componentes de lecitina de soya (Popova et al., 2016). Mientras tanto el espectro de la matriz muestra vibraciones de tensión correspondientes a los enlaces C-H del residuo acilo de los fosfolípidos que dan lugar a bandas de absorción en la región de 2800-3100 cm⁻¹. Las bandas más fuertes en el espectro de un fosfolípido generalmente corresponden a las de tensión antisimétrica (2920 cm⁻¹) y simétrica (CH₂ 2850 cm⁻¹) del grupo -CH₂. Los picos 1742 y 1728 cm⁻¹ son característicos de los grupos carbonilos de la lecitina de soya.

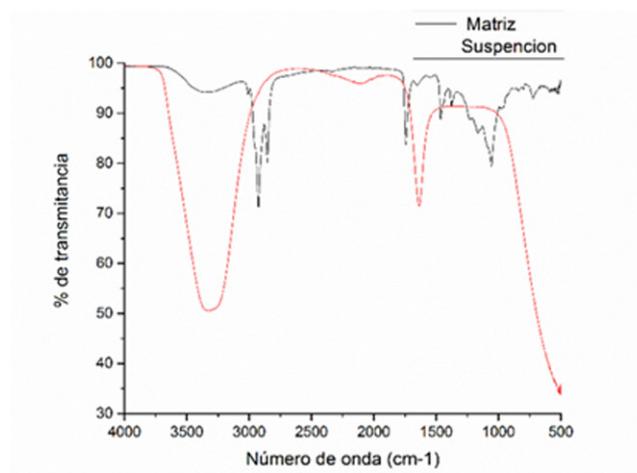


Figura 4. Espectro infrarrojo de liposomas elásticos en suspensión acuosa (suspensión) y en estado sólido (matriz).

Microscopía de fluorescencia

Debido a que los extractos etanólico de *A. mexicana* tiene una gran cantidad de clorofila y que esta emite fluorescencia (García et al, 2015), se optó por emplear la microscopía de fluorescencia con el fin de observar la distribución del extracto y su encapsulación en los transetosomas. En la figura 5A se observan los transetosomas en campo claro con una tonalidad verde característica del extracto, indicando que la encapsulación se llevó a cabo, en la figura 5B se observa la misma micrografía pero mediante la técnica de fluorescencia donde se muestra los transetosomas con una tonalidad rojiza que indica que el extracto está en la estructura del transetosomas, debido a la gran cantidad de vesículas y para apreciar los encapsulados, se seleccionó la sección donde se muestran dos vesículas que rondan cerca de los 5 micrómetros, sin embargo el fondo rojizo de la micrografía 5B es causado por la fluorescencia de las vesículas con menor tamaño.

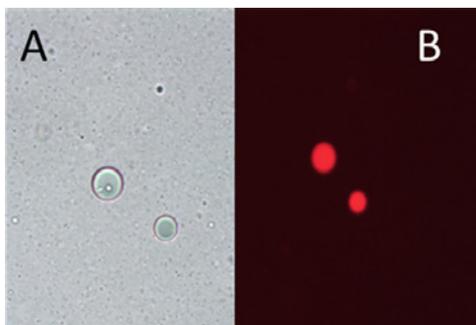


Figura 5. Micrografías a 80x de transetosomas como encapsulantes de *A. mexicana*. Micrografía en campo claro (A), micrografía de fluorescencia (B).

Conclusiones

En este trabajo se obtuvieron transetosomas esféricos submicrométricos que van de los 500 a los 700 nm en promedio y que son capaces de encapsular un extracto de *A. mexicana*, con la finalidad de preservar sus componentes, los cuales pueden ser monitoreados por FT-IR y comprobar que el proceso de encapsulación se llevó a cabo mediante las propiedades fluorescentes de la clorofila. Estas aportaciones permiten proponer a los transetosomas como vehículos novedosos para la encapsulación de extractos etanólicos de matriz compleja. Cabe resaltar que ensayos complementarios como la medición de la estabilidad, la vida de anaquel y la eficiencia de atrapamiento pueden proporcionar más información para la mejora de estos vehículos transetosomales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional y a la Universidad Tecnológica de Tecámac.

Referencias

Abdulbaqi I. M., Darwis Y., Khan N. A. K., Assi R. A., Khan, A. A. (2016). Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 2279.

Coronel-Aguilera C. P., San Martín-González M. F. (2014). Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *LWT-Food Science and Technology*.

Estrada-Reyes, R., López-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.

García P. J. L., Gutierrez-Contreras R. (2015). Red fluorescence of chlorophyll| Fluorescencia roja de la clorofila.

Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2016). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152.

Juárez, Z. N., Hernández, L. R., Bach, H., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2015). Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. xolocotziana and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Industrial Crops and Products*, 74, 178-182.

Kanekanian A. (2013). Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals (2012), edited by N. Garti and DJ

McClements, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. ISBN 978-1-8456-9801-0. *International Journal of Dairy Technology*, 66(3), 458-459.

Moreno Y. L., Becerra N., Chaparro S. P., Reyes C. J. (2016). Evaluación de la sensibilidad colorimétrica para la determinación de nanoestructuras compuestas de polidiacétileno/lípidos, usando espectroscopia de absorción electrónica y UV-Vis fluorescencia. *Acta Agronómica*, 65(3), 268-275.

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

Pasukamonset P., Kwon O., Adisakwattana S. (2016). Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 61, 772-779.

Pereira V. A., de Arruda I. N. Q., Stefani R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180-188.

Pinho E., Grootveld M., Soares G., Henriques M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate polymers*, 101, 121-135.

Popova A. V., Hinch D. K. (2016). Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(12), 3050-3060.

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.

Zhaowu Z., Xiaoli W., Yangde Z., Nianfeng L. (2009). Preparation of matrine ethosome, its percutaneous permeation in vitro and anti-inflammatory activity in vivo in rats. *Journal of liposome research*, 19(2), 155-162.

Zielińska S., Matkowski A. (2014). Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry Reviews*, 13(2), 391-416.