

INHIBICIÓN DEL DOLOR CON UN SISTEMA AFININA-EUGENOL EN MODELO ANIMAL

Fernández Navarro Andrea (1), Laguna Ramírez Miriam Mercedes (1), Zaragoza Delgado Sofía (1),
Lira Vallejo Jesús Jonathan (2), Bustos Gómez Chrystyan Iván (3)

- 1 [Bachillerato de Ciencias naturales y exactas, Escuela de Nivel Medio Superior de Irapuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [mm.lagunaramirez@ugto.mx]
- 2 [Bachillerato Bivalente Militarizado] | Dirección de correo electrónico: [jj.liravallejo@ugto.mx]
- 3 [Laboratorio de Biología, Escuela de Nivel Medio Superior de Irapuato, Colegio de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ci.bustos@ugto.mx]

Resumen

El objetivo del proyecto fue crear una formulación farmacéutica a partir de extractos de *H. longipes* (especie nativa de la región norte de Guanajuato conocida como chilcuague) y *S. aromaticum* (clavo de aroma), con características mucoadhesivas para la reducción del dolor y conjuntamente inhibir el crecimiento bacteriano en la cavidad bucal, la cual se caracteriza por ser una zona anatómica con una gran y diversa biota bacteriana que cuando se descontrola el crecimiento de las misma provoca una infección en la región periodontal en forma de gingivitis o periodontitis; Bajo estas consideraciones, se creó el gel con propiedades de liberación modificada del principio activo además de una capacidad mucoadhesiva para que se adhiriera a la zona afectada y se retenga el mayor tiempo posible prolongando su efecto biosida y anestésico en el sitio específico de la infección resistiendo el movimiento mecánico de zona periodontal y la solubilización de la saliva. Se adoptaron los extractos de *H. longipes* y *S. aromaticum* por sus propiedades antibacteriales de tipo bacteriostáticas, antiinflamatorias como inhibidoras de prostaglandinas y anestésicas por inhibir la transmisión sináptica por su alto contenido

de alcanidas (afinina) y derivados fenólicos (eugenol) respectivamente que en conjunto han demostrado tener un efecto sinérgico en pruebas de halos de inhibición *in vitro* con cultivos bacterianos aislados de *Lactobacillus* sp los cuales presentaron un efecto sinérgico de tipo sumativo a diferentes concentraciones; subsiguientemente para comprobar la estabilidad de la formulación se sometió el gel a pruebas de estabilidad química, térmica y de congelación descongelación, posterior a estos procedimientos se acreditaron las buenas características fisicoquímicas del gel y se mantuvo la fuerza mucoadhesiva.

Abstract

The objective of the project was to create a pharmaceutical formulation from extracts of *H. longipes* (native species of the northern region of Guanajuato known as chilcuague) and *S. aromaticum* (clove of aroma), with mucoadhesive characteristics for pain reduction and jointly inhibit bacterial growth in the oral cavity, which is characterized by being an anatomical area with a large and diverse bacterial biota that when uncontrolled the growth of them causes an infection in the periodontal region in the

form of gingivitis or periodontitis; Under these considerations, the gel was created with modified release properties of the active substance in addition to a mucoadhesive ability to adhere to the affected area and be retained as long as possible by prolonging its bioactive and anesthetic effect at the specific site of the infection resisting the mechanical movement of the periodontal area and the solubilization of saliva. Extracts of *H. longipes* and *S. aromaticum* were adopted for their antibacterial properties of bacteriostatic, anti-inflammatory type as inhibitors of prostaglandins and anesthetics for inhibiting synaptic transmission due to their high content of alkaloids (afinin) and phenolic derivatives (eugenol) respectively that together they have been shown to have a synergistic effect in tests of in vitro inhibition halos with bacterial cultures isolated from *Lactobacillus* sp which presented a synergistic effect of summative type at different concentrations; Subsequently, to check the stability of the formulation, the gel was subjected to tests of chemical stability, thermal and freeze defrosting, after these procedures the good physicochemical characteristics of the gel were accredited and the mucoadhesive force was maintained.

Introducción

En la actualidad se han identificado una variedad de especies vegetales con propiedades farmacológicas. Estudios previos con extractos crudos de *H. longipes* han identificado propiedades farmacológicas como anestésico debido a su acción sobre el sistema nervioso, además de propiedades antiinflamatorias por la inhibición de prostaglandina y por último actividad bacteriostática y fungistática. Estas propiedades farmacológicas son atribuidas a un grupo de compuestos llamados alcanoides presentes principalmente en las raíces en altas concentraciones de hasta 9,369 µg/g de peso seco. Entre ellas la afinina [Imagen 2], que es la alcanida mayoritaria y principal responsable de los efectos biológicos como anestésico local, actividad insecticida y bactericida.

Por su parte, el Eugenol [Imagen 1] es el principio activo que se extrae del *S. aromaticum*, un derivado fenólico, es un bloqueador reversible de la conducción nerviosa y en concentraciones bajas, es capaz de reducir la transmisión sináptica de la zona neuromuscular. Varios estudios han concluido que el Eugenol inhibe la ciclooxi-

genasa, favoreciendo el efecto analgésico y anestésico al lograr la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. En altas concentraciones tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas, lo que resulta en daño a la membrana celular.

El vehículo ideal para el transporte de los principios activos son los geles mucoadhesivos [Imagen 3], los cuales se identifican por fijarse a los tejidos mucosos característicos de las cavidades corporales. Además de la buena adhesión del gel el tiempo de residencia a los fluidos es prolongada, por lo que el período de contacto es mayor, aumentando así su eficacia clínica; aunado estos geles tienen la capacidad de realizar una liberación controlada del principio activo. La aplicación práctica de estas formulaciones es el tratamiento de la periodontitis que es la inflamación de los tejidos de soporte de los dientes causada por un consorcio de bacterias en forma de biopelículas lo cual ocasiona destrucción tisular produciendo dolor específico. El tratamiento de esta enfermedad debe estar enfocado en el control de la inflamación con el uso adjunto de antibióticos en un sistema de liberación local, como lo son las formas farmacéuticas de liberación modificada que se caracterizan por tener una velocidad y lugar de liberación diferidas de sustancias activas como los sistemas bioadhesivos; estos están diseñados para aumentar el periodo de contacto del medicamento en el sitio de acción con la capacidad de resistir los procesos metabólicos y así suponer una ventaja en la biodisponibilidad.

Materiales y métodos

Extracción de Principios Activos (afinina y eugenol) Por maceración alcohólica con raíz y alcohol etílico al 99.5%; centrifugación durante 5 minutos; y evaporación con agitación magnética, hasta obtener el extracto final. (2%)

Formulación del Gel Alfa Se realizó una formulación con carbopol 940, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol, alcohol 75%, agua destilada y extractos crudos. Se colocaron en dos vasos de precipitado con carbopol y carboximetilcelulosa por separado mientras se les aplicó agitación magnética para finalmente mezclar éstos entre sí.

Pruebas de inhibición bacteriana Se hicieron medios de cultivo en Agar Sangre, para lo cual se utilizaron 4 placas bacterianas inoculadas

con *L. acidophilus* donde se colocó el gel Alfa en cuatro puntos de cada placa, esto para identificar la inhibición al crecimiento de bacterias. Pruebas térmicas Ambas formulación de gel Alfa se colocaron en dos tubos, para posteriormente someterse a variaciones de temperatura de 0° y 37° respectivamente.

Capacitación para el manejo de animales Se llevó a cabo una visita al Bioterio del Campus Celaya-Salvatierra, a cargo de un Dr. Investigador del área de salud quien actualmente se encuentra haciendo experimentación con ratones. Aceptamos su invitación para conocer acerca del trato con ratones; aprendimos los cuidados que se requieren al estar trabajando con ellos en un laboratorio, como su ciclo de vida, su alimentación, su método de hidratación, los ciclos de sueño, y técnicas para reducción de estrés.

Cuidado y uso de nuestros animales Primeramente, se obtuvieron del bioterio de la Universidad de Guanajuato. Fueron transportaron al laboratorio de la ENMS Irapuato donde fue adaptado un espacio cuidando las características de ventilación, humedad, luz regulable y temperatura, con libre acceso a comida adecuada a su especie y completa en cuanto a nutrientes y agua..

Pruebas de sensibilidad Se utilizaron dos ratones para las pruebas, los dos machos. Se les rasuró 1cm el abdomen, se les limpió y desinfectó la zona, para posteriormente picarles de forma superficial con una aguja estéril de 1mm. Esto para observar su reacción a la punción. Después, se realizó la misma prueba de punción con el gel inhibidor.

Resultados y discusión

Los principios activos se intentaron extraer utilizando diferentes solventes orgánicos como tolueno, acetona, tetracloruro de carbono, cloroformo. De éstos pudimos observar que el etanol nos proporcionaba buenos resultados como método de evaporación; sin embargo lo declinamos ya que su uso era tardío, por lo que después lo intentamos con óxido de zinc como quelante siendo éste el mejor método de extracción. El siguiente paso a realizar fue la formulación de los geles alfa1 y alfa 2. Obtuvimos 22.5 g de gel. La combinación de estos reactivos nos proporcionó un gel con propiedades mucoadhesivas, cuya apariencia física y homogeneidad era buena: presentaba una tonalidad amari-

lla-marrón, consistencia y adherencia alta. Las pruebas de estabilidad térmica y homogeneidad resultaron positivas ya que esta misma formulación de gel base ha reportado buenos resultados en estudios anteriores. Por su parte la prueba de inhibición bacteriana mostro un halo de inhibición de 0.45 cm en la formulación demostrando una sensibilidad a estos principios activos. Respecto a la prueba de punción los ratones mostraron una anulación del dolor debido a la presencia y acción de las afinina y eugenol en sinergia. Los resultados se puedes observar en la tabla 1.

Conclusiones

Los dos geles formulados (alfa 1 y alfa 2) mantuvieron sus características físico-químicas iniciales igual que las propiedades biosidas y finalmente demostraron su capacidad inhibidora de la sensibilidad para posteriormente realizarse las pruebas antinociceptivas a futuro.

Agradecimientos

Al Campus Celaya-Salvatierra por toda la ayuda brindada, especialmente al Dr. Cuahutémoc Sandoval por las capacitaciones y equipo para el trabajo con ratones. Asimismo, a la directora de la ENMSI, la MDD. Rauquel Castro, por su apoyo en todo momento.

Referencias

- 1.The Physiological Society of Japan, 29 de marzo 2002, Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences, Records Vol. 64, p. 143-146.
- 2.Baños J. E., Ruiz-Barría G., 30 de noviembre 2006, La Evaluación del Dolor Experimental en el Laboratorio: los Modelos de Dolor Neuropático en Animales, p. 542-551.
- 3.V. G. Cilia-López, B. I. Juárez-Flores, J. R. Aguirre-Rivera & J. A. Reyes-Agüero (2010) Analgesic Activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system, *Pharmaceutical Biology*, 48:2, 195-200.
- 4.Ríos-Gómez Y., Aguilar A., 14 octubre 2006, Analgesic Activity of Affinin an alkamide from *Heliopsis longipes* (compositae), *Journal of Ethnopharmacology*, p. 362-367.
- 5.Cruciani R. A., Nieto M. J., 15 de enero 2006, Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes, p. 313-327.
- 6.CCPA, 1998, Control del Dolor Animal en la Investigación, la Enseñanza y las Pruebas,

Anexos

Pruebas	Eugenol	Afinina	Gel Alfa 1 y 2
Térmica (0°C y 37°C)	-	-	✓
Homogeneidad	✓	✓	✓
Placa Bacteriana (Halos de inhibición en cm)	1.6	0.29	0.45
Sensibilidad (Punciones)	11 máximo	17 máximo	13 máximo

Tabla 1: resultados de pruebas a extractos crudos y formaciones.



IMAGEN 1: Extracto de Eugenol con ZnO



IMAGEN 2: Extracto de Afinina.



IMAGEN 3: Gel base alfa 1 y Gel base alfa 2